

UM MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE
AFLATOXINAS B₁, M₁ E ZEARALENONA EM TECIDOS DE
ORIGEM ANIMAL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM
CAMADA DELGADA

S.D.
S

52

02/93

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UM MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE
AFLATOXINAS B₁, M₁ E ZEARALENONA EM TECIDOS DE
ORIGEM ANIMAL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM
CAMADA DELGADA

Parecer

Este exemplar corresponde
à redação final da tese
defendida por Eduardo
Vicente e aprovada pela
comissão Julgadora em
14.01.93.

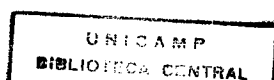
EDUARDO VICENTE
Bacharel em Ciências Biológicas

Lucia Valente Soares

Prof.ª Dr.ª LUCIA MARIA VALENTE, SOARES
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS, S.P. - 1993



BANCA EXAMINADORA

Lucia Valente Soares

Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Valente Soares
(orientadora)

Heloisa M. Cecchi

Prof^ª. Dr^ª. Heloisa Máscia Cecchi
(membro)

Suplente

Prof^ª. Dr^ª. Maria Cecília de Figueiredo Toledo
(membro)

Myrna Sabino

Prof^ª. Dr^ª. Myrna Sabino
(membro)

Campinas, 14 de Janeiro de 1993.

À Marisa,
pelo amor e
compreensão...

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Lucia Maria Valente Soares, pela orientação, apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas à redação final da tese.

À CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro ao desenvolvimento do trabalho.

À ABIA, pelas cópias da tese.

Aos amigos do laboratório de Análise de Alimentos, pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos meus pais, Inge e Avimar, pelo apoio e incentivo em todas as horas.

A todas as pessoas que de alguma forma possibilitaram a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
índice de tabelas	i
índice de figuras	iv
Resumo	v
Summary	vi
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 Aflatoxinas B1 e M1	3
2.1.1 Natureza química	3
2.1.2 Efeitos tóxicos	5
2.1.3 Ocorrência em produtos de origem animal ..	10
2.1.4 Ocorrência em tecidos vegetais	13
2.1.5 Metodologia analítica	14
2.2 Zearalenona	17
2.2.1 Natureza química	17
2.2.2 Efeitos tóxicos	18
2.2.3 Ocorrência em produtos de origem animal ..	20

2.2.4 Ocorrência em tecidos vegetais	21
2.2.5 Metodologia analítica	22
2.3 Ocratoxina A	24
2.3.1 Natureza química	24
2.3.2 Efeitos tóxicos	25
2.3.3 Ocorrência em produtos de origem animal ..	27
2.3.4 Ocorrência em tecidos vegetais	28
2.3.5 Metodologia analítica	29
2.4 Imunoensaios	31
2.5 Interação com microorganismos	32
2.6 Distribuição nos tecidos e fluidos animais	32
2.7 Ocorrência simultânea	33
2.8 Sinergismo	34
2.9 Limites de tolerância	35
2.10 Determinação simultânea de micotoxinas	36
3. Material e métodos	37
3.1 Reagentes e Equipamento	37
3.2 Amostras	37

3.3 Padrões de micotoxinas	38
3.3.1 Preparo das soluções estoque	38
3.3.2 Soluções de trabalho	38
3.3.3 Avaliação de pureza dos padrões	38
3.4 Contaminação artificial dos tecidos animais	39
3.5 Métodos avaliados para análise de tecidos animais	39
3.6 Seleção de solventes para extração	43
3.7 Avaliação de precipitantes	43
3.8 Seleção de adsorventes para limpeza em coluna cromatográfica	45
3.9 Avaliação de fases móveis para eluição das colunas de limpeza	45
3.9.1 Eluição direta de todas as toxinas em uma única fração	45
3.9.2 Eluição das toxinas em frações separadas ..	45
3.9.3 Avaliação de marcas de éter etílico utilizado na eluição de interferentes	45
3.10 Remoção de lipídeos	50

3.11	Avaliação de sistemas de limpeza alternativos .	51
3.11.1	Sistema específico para zearalenona	51
3.11.2	Sistema específico para ocratoxina A ...	51
3.12	Seleção de fases móveis para desenvolvimento em cromatografia em camada delgada	52
3.13	Teste de rusticidade	52
3.14	Metodologia proposta	54
3.15	Limites de detecção	56
3.16	Teste de recuperação	57
3.16.1	Procedimento	57
3.16.2	Tratamento estatístico	57
3.17	Comparação com o método da A.O.A.C. (1990)	58
4.	Resultados e discussão	59
4.1	Avaliação dos métodos disponíveis	59
4.2	Escolha do solvente para extração	60
4.3	Purificação do extrato	60
4.3.1	Precipitação das proteínas	60
4.3.2	Desengorduramento	63

4.4	Avaliação de limpeza em coluna	64
4.4.1	Seleção de adsorventes e fases móveis	64
4.4.2	Avaliação das marcas de éter etílico	65
4.5	Sistemas de limpeza alternativos	66
4.5.1	Zearalenona	66
4.5.2	Ocratoxina A	66
4.6	Seleção das fases móveis para cromatografia em camada delgada	67
4.7	Teste de rusticidade	69
4.8	Recuperação em diferentes níveis	73
4.8.1	Resultados	73
4.8.2	Tratamento estatístico	75
4.9	Limites de detecção em camada delgada	75
4.10	Comparação entre o método proposto e o método oficial da A.O.A.C. (1990).....	79
5.	Conclusões	82
6.	Referências bibliográficas	85

ÍNDICE DE TABELAS

1. Níveis máximos de ingestão de aflatoxina B1 sem efeitos adversos observáveis	8
2. Transmissão de aflatoxina B1 do alimento para os tecidos e fluidos de diferentes animais I.	9
3. Transmissão de aflatoxina B1 do alimento para os tecidos e fluidos de diferentes animais II.	9
4. Técnicas e limites de detecção de métodos para determinação de aflatoxinas em tecidos e fluidos animais	17
5. Correlação entre a dose de zearalenona ingerida e o nível detectado nos tecidos e fluidos animais	20
6. Técnicas e limites de detecção dos métodos para determinação de zearalenona em tecidos e fluidos de origem animal	24
7. Transmissão de ocratoxina A para tecidos de suínos .	27
8. Adsorventes avaliados para limpeza em coluna cromatográfica	46
9. Fases móveis e adsorventes avaliados para a eluição simultânea e direta das toxinas	47
10. Seleção de fases móveis para eluição das toxinas em frações separadas	48
11. Condições básicas e alternativas avaliadas no teste de rusticidade	53

12. Níveis de contaminação utilizados para os testes de recuperação do método proposto	58
13. Seleção de solventes para extração	61
14. Avaliação da precipitação em etapa única utilizando um precipitante	62
15. Avaliação da precipitação em etapa única utilizando dois precipitantes	62
16. Avaliação de precipitação em duas etapas utilizando dois precipitantes	63
17. Características dos adsorventes avaliados	64
18. Triagem de fases móveis para a separação e quantificação de ZEA	67
19. Avaliação de fases móveis para separação e quantificação de micotoxinas em extratos de tecidos de origem animal	68
20. Recuperações absolutas utilizando diferentes combinações de fatores (teste de rusticidade).....	70
21. Individualização da influência das condições avaliadas no teste de rusticidade	71
22. Ordem de influência das variáveis avaliadas no teste de rusticidade	71
23. Recuperação da aflatoxina B ₁ em fígado bovino.....	73
24. Recuperação da aflatoxina M ₁ em fígado bovino.....	74

25. Recuperação da zearalenona em fígado bovino.....	74
26. Limites de detecção do método proposto	79
27. Comparação entre o método proposto e o método oficial da A.O.A.C. (1990)	81

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estrutura da aflatoxina B ₁	4
2. Estrutura da aflatoxina M ₁	4
3. Estrutura da zearalenona	18
4. Estrutura da ocratoxina A	25
5. Dispersão e desvios individuais da recuperação da aflatoxina B ₁ de fígado bovino utilizando o método proposto	76
6. Dispersão e desvios individuais da recuperação da aflatoxina M ₁ de fígado bovino utilizando o método proposto	77
7. Dispersão e desvios individuais da recuperação da zearalenona de fígado bovino utilizando o método proposto	78

RESUMO

A presença de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em rações tem sido relatada nas principais regiões produtoras de suínos e aves do Brasil. A possibilidade de que, através da cadeia alimentar, as toxinas venham a contaminar tecidos de animais destinados ao consumo humano, justifica a preocupação existente na área de saúde pública. Os métodos até agora desenvolvidos para a análise de tecidos animais têm encontrado aplicação limitada em laboratórios nacionais devido ao alto custo do equipamento envolvido e a utilização de reagentes dispendiosos com especificações estritas quanto a sua pureza.

Numa tentativa de minimizar a lacuna causada pelos métodos atualmente disponíveis, foi desenvolvido um procedimento tolerante a pequenas variações nas condições de trabalho e reagentes, de baixo custo relativo e capaz de quantificar simultaneamente as aflatoxinas B₁ e M₁ e zearalenona. A recuperação média é de 91%, 66% e 81% e os coeficientes de variação 7%, 7% e 9% respectivamente para as micotoxinas acima mencionadas. São valores que podem ser considerados satisfatórios para um método multitoxina, que opera na faixa de décimos de ng/g. Os limites de detecção conseguidos de 0,08 ng/g, 0,13 ng/g e 2,3 ng/g para aflatoxinas B₁ e M₁ e zearalenona, respectivamente, permitem a detecção em tecidos contaminados nos níveis de ocorrência natural que são de maior risco potencial para exposições a longo prazo. Uma variante do método pode também ser utilizada para a triagem de ocratoxina A em tecidos animais.

SUMMARY

The presence of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in feeds has been reported in the main Brazilian swine and poultry producing regions. The possibility of residue transmission from feed to animal tissues is a matter of concern for the human population involved. Analytical methods developed so far have found limited use in local laboratories due to the high cost of equipment and high degree of purity of the reagents they specify.

In an attempt to minimize the difficulties posed by present day methods a procedure has been developed which is tolerant to small changes on work and reagents conditions, exhibits a relative low cost, and is suitable to quantify simultaneously aflatoxins B₁ and M₁ and zearalenone. The mean recoveries are 91%, 66% and 81% and the coefficients of variation 7%, 7%, and 9%, for aflatoxins B₁ and M₁ and zearalenone, respectively. Such values were considered suitable for a multitoxin method for the working range of tens of ng/g. The detection limits obtained were 0,08 ng/g, 0,13 ng/g and 2,3 ng/g for aflatoxins B₁ and M₁ and zearalenone respectively and allow the detection of mycotoxins in contaminated tissues at natural occurrence levels which happen to be the greatest potential risk levels for long term exposure. A variation of the method may also be used for screening of ochratoxin A in animal tissues.

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas têm sido associadas ao surgimento de patologias de origem alimentar em animais. Dentre os principais efeitos relatados estão a carcinogenicidade e citotoxicidade das aflatoxinas, o efeito nefrotóxico da ocratoxina A e o potencial estrogênico da zearalenona. Muitas vezes é difícil relacionar os sintomas com a presença das toxinas, pois estes podem ser mascarados ou modificados por diversos fatores, tais como a presença de outras micotoxinas e infecções adventícias. A transmissão de micotoxinas de rações para os tecidos e fluidos animais têm sido objeto de muitos estudos. Embora inúmeros trabalhos tenham tentado estabelecer níveis de risco mínimo para consumo de alimentos contaminados com micotoxinas, muitas dúvidas ainda permanecem quanto à validade de estudos "in vitro", a extrapolações de resultados obtidos com animais experimentais, a diferenças devido a variabilidade genética e ao estado nutricional dos indivíduos. Contudo, emerge claramente deste quadro que a possibilidade de consumo de micotoxinas através de tecidos contaminados deve ser considerada como um risco para a saúde pública.

A presença de aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A e outras micotoxinas têm sido constatada em produtos agrícolas brasileiros. Dentre os principais produtos contaminados estão milho, amendoim, farinha de caroço de algodão, farelo de trigo, cevada e sorgo, muitas vezes destinados à alimentação animal. Um agravante deste quadro é o fato que as micotoxinas têm sido detectadas principalmente nos estados da região sul e sudeste, responsáveis por grande parte da produção de suínos e aves.

Alguns métodos específicos para a análise de tecidos animais têm sido relatados na literatura. Uma característica comum a todos eles é o emprego de equipamentos caros e reagentes com elevado grau de pureza. Os reagentes disponíveis no mercado nacional apresentam grande variação na qualidade, o que dificulta a utilização destes métodos. Além disso, a carência de recursos

da maioria dos laboratórios nacionais exige métodos que utilizem equipamento simples e que determinem várias toxinas simultaneamente. Os objetivos estabelecidos para o presente trabalho foram o desenvolvimento de uma metodologia multitoxina simples, de baixo custo, e que suporte uma faixa razoável de variações nas condições de trabalho e na qualidade de reagentes, compatíveis com a realidade nacional. A comparação com um método de referência foi utilizada para a avaliação do método desenvolvido e verificação de sua flexibilidade de aplicação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aflatoxinas B₁ e M₁

2.1.1 Natureza química

As aflatoxinas são cumarinas altamente substituídas fundidas com cadeias diidrofurofuranóicas e constituem um grupo de metabólitos secundários de fungos. A separação dos grupos B e G foi baseada na intensa fluorescência azul ou verde (no inglês blue e green respectivamente), quando os compostos eram observados sob luz ultra-violeta (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a). Os fungos Aspergillus flavus e A. parasiticus têm sido indicados como os únicos produtores das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (STOLOFF, 1977).

A Aflatoxina B₁ (AFLAB₁) (figura 1), quimicamente conhecida como 2, 3, 6a, 9a, tetraidro - 4 - metoxi, (6a R-cis) - ciclopenta [c] furo [3', 2' :4,5] furo [2,3-H] [1] benzopiran - 1, 11 - diona, (CIRILLI, 1986) foi uma das primeiras micotoxinas estudadas. Um produto derivado da AFLAB₁, resultante do metabolismo de mamíferos, mas que também pode ser produzido por fungos, apresenta estrutura bastante semelhante à da toxina original. A molécula do metabólito difere apenas pela presença de uma hidroxila na posição 4 [10 segundo a nomenclatura da I.U.P.A.C (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a)], apresenta fluorescência azul sob luz ultra-violeta e recebeu o nome de aflatoxina M₁ (AFLAM₁) (figura 2) por ter sido inicialmente detectada em leite.

O comportamento em solução mostra que os metabólitos monohidroxilados da AFLAB₁, entre os quais estão incluídos as aflatoxinas M₁, P₁, Q₁, e B_{2a}, apresentam solubilidade em clorofórmio. O produto de degradação, 2,3 dihidrodiol, de maior polaridade, pode ainda ser dissolvido em água (COLLEY & NEAL, 1979).

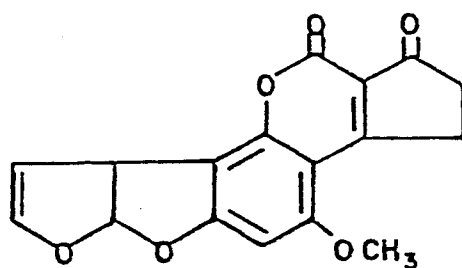


Figura 1. Estrutura química da aflatoxina B₁

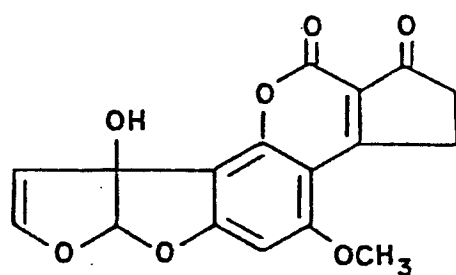


Figura 2. Estrutura química da aflatoxina M₁

O ciclohexano, heptano e tolueno foram testados em substituição ao benzeno como solvente para as aflatoxinas. Os resultados confirmaram a superioridade do benzeno, pois este permitiu apenas 15% de fotodegradação, enquanto os demais permitiram total destruição da toxina (VELASCO 1981).

As AFLAB1 e AFLAM1 são instáveis quando dissolvidas em clorofórmio, mas a mistura benzeno-acetonitrila (9+1) proporcionou soluções estáveis por 13 meses a -20°C. A adsorção irreversível da AFLAM1 foi observada quando soluções padrão eram secadas em vidro comum, o que não aconteceu com extratos que continham impurezas juntamente com a toxina (STUBBLEFIELD, 1980).

Com relação à estabilidade diante de processamento, a amoniacação tem demonstrado ser um dos mais eficazes métodos para a detoxificação de aflatoxinas. Contudo, os produtos assim tratados não são aceitos para o consumo humano em virtude de alterações de sabor, odor e cor. A destruição das aflatoxinas B₁ e B₂ durante o cozimento (176 °C com uma temperatura interna correspondente de 71 °C) e/ou processamento (cura e defumação ou cura, defumação e cozimento) de carnes naturalmente contaminadas foi da ordem de 15-30%, sugerindo a grande estabilidade das aflatoxinas. Dentre os tratamentos citados, o cozimento é o mais eficiente, diminuindo em 26% a concentração inicial da toxina (FURTADO et alii, 1981).

2.1.2 Efeitos tóxicos

Dentre os principais efeitos atribuídos às aflatoxinas estão a carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade embriotoxicidade (WOGAN, 1977) e citotoxicidade (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a).

As aflatoxinas, assim como outros xenobióticos, são primariamente metabolizadas oxidativamente pelo sistema microsomal existente nas células hepáticas (citocromo P450), mas que também ocorre nos rins, pele e demais órgãos. O metabolismo

da toxina leva à formação de derivados hidroxilados solúveis em água, que podem ser eliminados na forma de ésteres conjugadas com ácido glucurônico ou sulfatos. Estes conjugados são imediatamente eliminados via urina ou bile, geralmente levando à detoxificação. Entretanto, durante o metabolismo, podem ser gerados metabólitos altamente reativos com capacidade de interagir com centros nucleofílicos de macromoléculas celulares como ácido desoxirribonucléico (ADN), ácido ribonucléico (ARN) e proteínas (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a).

PATTERSON (1977) apontou os principais metabólitos que podem ser formados pelas enzimas hepáticas, a partir da AFLAB1: A AFLAM1, que pode se acumular em produtos animais destinados à alimentação humana e a aflatoxina B_{2a}, virtualmente não tóxica, mas que interage com aminoácidos e proteínas, afetando o metabolismo hepático, promovendo necrose celular e que tem sido considerada como uma toxina de efeito agudo.

As aflatoxinas podem atuar ao nível de ADN, transcrição e tradução de ARN, síntese protéica, em diversas reações do metabolismo de carboidratos e lipídeos, na fosforilação oxidativa e no metabolismo mitocondrial. A AFLAB1, que é um carcinógeno secundário, tem a capacidade de ligar-se irreversivelmente aos ácidos nucleicos, através de seu metabólito 2,3 epóxido, embora também possam ocorrer interações não covalentes fracas e reversíveis. Em mamíferos, este metabolismo prévio da toxina até o derivado 2,3 epóxido é imprescindível para formação das interações covalentes (KIESSLING, 1986).

A ligação da AFLAB1 com as gamaglobulinas e da aflatoxina G₁ com as soroalbuminas (WEI & LEE, 1971), assim como a interação entre AFLAB1 e guanina (AUTRUP et alii, 1985) já foram detectadas. AUTRUP et alii (1985) afirmam que embora estudos epidemiológicos tenham sugerido a AFLAB1 como o agente etiológico do câncer de fígado humano, existem dificuldades para a determinação dos níveis exatos de exposição individual necessários para este efeito.

A AFLAB1 seria metabolicamente ativada, no homem, a uma forma intermediária que se ligaria à soroalbumina, provavelmente o 8,9 dihidro-8,9 epoxi (I.U.P.A.C.), o que ainda não foi devidamente comprovado (GROOPMAN & DONAHUE, 1988).

Limitações metodológicas foram responsabilizadas por GARNER et alii (1985) pelo insucesso na incriminação conclusiva das aflatoxinas como carcinógeno humano, o que seria de grande importância para a saúde pública e prevenção do câncer.

A reversibilidade da reação catalizada pela enzima redutase, encontrada na fração S-10 de preparações de fígado, sustenta uma teoria que indica o aflatoxicol como um reservatório biológico da AFLAB1 (HSIEH et alii, 1977).

A AFLAB1 é uma toxina que atua de forma aguda em um grande número de organismos, mas o grau de sensibilidade pode ser muito diferente. A dose letal suficiente para matar 50% de uma população (DL₅₀) de coelhos, uma das espécies mais sensíveis, foi estabelecida em 0,3 mg/Kg. Já os camundongos, muito mais resistentes, apresentam DL₅₀ de 40 mg/Kg. A AFLAB1 apresenta maior toxidez que a aflatoxina G₁ em ratos machos. Observa-se que a toxidez depende de idade, sexo, linhagem e fatores relacionados à dieta. O potencial carcinogênico em ratos e trutas é da mesma ordem de toxicidade (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a).

A hidroxilação da molécula de AFLAB1, que ocorre durante sua transformação nos metabólitos H₁, P₁ e Q₁, quase que elimina a toxicidade e mutagenicidade da toxina. Por outro lado, os efeitos tóxico, carcinogênico e mutagênico, além da capacidade de ligar-se ao ADN tem sido atribuídos à AFLAM1, que também possui uma hidroxila (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a).

PATERSON (1977) afirma existir uma equivalência de toxicidade entre AFLAB1 e AFLAM1, porém experimentos com ratos Fischer machos indicaram que o potencial carcinogênico da AFLAM1 na dieta destes animais é menor do que a AFLAB1 (CULLEN et alii, 1988).

As teorias para explicar a interação do metabólito aflatoxina B_{2a} com aminoácidos indicam haver a possibilidade de um mecanismo via base de Schiff com os grupamentos alfa e epsilon amina de proteínas e aminoácidos (ASHOOR & CHU, 1975).

KEYL & BOOTH (1971) conduziram experimentos, com diferentes animais, para a avaliação dos níveis máximos de ingestão de AFLAB1 sem que nenhum efeito adverso correspondente pudesse ser observado (tabela 1). Os autores ainda relataram as diferenças de sensibilidade existente entre 17 raças de galinhas alimentadas com 800 µg/Kg no intervalo de 2 a 6 semanas de vida das aves. Fêmeas de suínos em gestação apresentam uma predisposição especial aos efeitos da aflatoxinas (FIORENTIN, 1986).

Valores da razão entre a concentração de AFLAB1 na alimentação (µg/Kg) e os resíduos nos principais tecidos e fluidos dos animais (µg/Kg ou L) estão resumidos na tabela 2.

Dados de outros experimentos indicaram valores diferentes de transmissão da AFLAB1 do alimento para os tecidos e fluidos animais (Tabela 3). Estas diferenças, segundo FURTADO et alii (1982), podem ser atribuídas não somente a variações entre os animais, mas também à maior sensibilidade das metodologias utilizadas.

Tabela 1. Níveis máximos de ingestão de aflatoxina B1 sem efeitos adversos observáveis

Animal	Nível sem efeitos adversos/Duração
bovino (corte)	300 µg/Kg/78 dias
suíno (engorda)	233 µg/Kg / 120 dias
suíno (reprodução)	450 µg/Kg/ cresc./prenhez/lactação
frangos (corte)	400 µg/Kg/1 dia a 8 semanas

Tabela 2. Transmissão de aflatoxina B₁ do alimento para os tecidos e fluidos de diferentes animais I (RODRICKS & STOLOFF, 1977).

Animal	Tecido ou fluido	Resíduo encontrado	Razão de transmissão
bovino	leite	M ₁	300
bovino	rins	M ₁	1736
bovino	rins	B ₁	5434
bovino	fígado	B ₁	14000
bovino	fígado	M ₁	7800
suíno	fígado	B ₁	800
frangos	fígado	M ₁	1200
poedeiras	ovos	B ₁	2200

Tabela 3. Transmissão de aflatoxina B₁ do alimento para os tecidos e fluidos de diferentes animais II.

Tecido	Animal	Resíduo	Razão	Referência
leite	bovino	M ₁	66:1	SCOTT (1989)
leite	bovino	M ₁	75:1	"
rins	suíno	B ₁	918:1	FURTADO et alii (1982)
rins	suíno	M ₁	605:1	"
fígado	suíno	B ₁	648:1	"
fígado	suíno	M ₁	1967:1	"

Em um trabalho visando verificar a transmissão de aflatoxinas de rações contaminadas para os tecidos de bovinos, constatou-se que a maior parte da toxina era excretada após 24 horas da ingestão e que pequenas quantidades ficavam retidas. Os níveis de AFLAB₁ transmitidos para fígado e rins foram similares, porém a concentração de AFLAM₁ foi 3,6 vezes maior em rins do que em fígado (STUBBLEFIELD & SHOTWELL, 1981). Grande parte (90%) da excreção de AFM₁-em leite e urina de carneiros ocorreu dentro das 48 horas iniciais, enquanto a excreção fecal foi maior entre 1,5 a 3,5 dias após a administração da toxina. Em vacas leiteiras foi observada uma excreção máxima de AFLAM₁ nas fezes, leite e urina

dentro de 24 horas (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981a). Já em galinhas, um estudo realizado com aflatoxina marcada com C₁₄, indicou que a excreção das aflatoxinas parece ter como rota principal a bile, via intestinos. A maior parte da excreção ocorreu primeiras 24 horas e o tempo de meia vida no animal foi de 67 horas (SAHWNEY et alii, 1973).

Embora o fígado seja o órgão alvo das aflatoxicoses, as AFLAB₁, AFLAB₂ e AFLAM₁ tem sido detectadas em outros tecidos. Através de métodos autoradiográficos, detectou-se por exemplo, a ligação da AFLAB₁ não metabolizada à melanina dos olhos e folículos pilosos de ratos. Algum tipo de interação hidrofóbica parece influenciar esta ligação (LARSSON et alii, 1988).

2.1.3 Ocorrência em produtos de origem animal

Os níveis de resíduos de aflatoxinas que ocorrem naturalmente em carnes são inferiores a 1,0 ng/g, ainda assim, recomenda-se que tecidos contaminados em qualquer nível detectável não sejam comercializados (STUBBLEFIELD & SHOTWELL, 1981).

Embora o problema de aflatoxinas em carnes não possa ser considerado como de grande risco para o ser humano, KULMBACH (1978) justifica a necessidade da pesquisa de resíduos de aflatoxinas em produtos alimentícios de origem animal, nas seguintes situações:

- Produtos cárneos, nos quais seja desejável o desenvolvimento de fungos, porém onde não são controlados os microorganismos presentes;
- Em carnes onde o desenvolvimento microbiano não é desejado, mas pode ter sido eliminado ilicitamente a fim de permitir a comercialização;
- Nos casos onde exista suspeita de micotoxicose de animais que, não necessariamente, apresentem lesões macroscópicas e que poderiam passar pelo exame de inspeção;

- Aparecimento de doença aguda ou subaguda de caráter endêmico e alta mortalidade de porcos, bovinos e aves, que não seja de origem viral ou bacteriana;
- Ocorrência de doença subaguda a crônica, com mortalidade baixa a moderada em suínos e aves, que possam estar ligadas a bactérias ou vírus (devido a uma imunossupressão).

Realmente, muitas vezes as lesões podem não ser aparentes, mesmo estando a toxina presente. Um destes casos foi observado em porcos alimentados por 21 dias com dieta artificialmente contaminada (662, 273, 300 e 285 $\mu\text{g/g}$ de B_1 , B_2 , G_1 , e G_2 respectivamente) e que não apresentaram lesões grosseiras no exame após o abate. Os animais foram sacrificados 16 horas depois do afastamento do alimento contaminado e em seus tecidos foram detectadas as aflatoxinas B_1 e B_2 , mas não G_1 ou G_2 . Os metabólitos, aflatoxinas M_1 e B_{2a} , também foram determinados em todos os tecidos. Em outro experimento, carcaças de animais que consumiram rações naturalmente contaminadas não apresentaram evidências para condenação, podendo ser aprovadas para o consumo humano (FURTADO et alii, 1979).

O tempo de afastamento necessário para a eliminação das aflatoxinas dos tecidos de suínos alimentados com ração contaminada (551 $\mu\text{g/Kg}$ de B_1 e 355 $\mu\text{g/Kg}$ de B_2 por até 32 dias) foi estabelecido como sendo 4 dias, embora quantidades significativas da micotoxina tenham sido eliminadas após o primeiro dia (FURTADO et alii, 1982).

FURTADO et alii (1979), em concordância com observações feitas por outros autores, indicaram o fígado como o melhor tecido para monitoração de aflatoxinas em suínos.

TRUCKSESS et alii (1983) pesquisaram aflatoxicol, AFLAB1 e AFLAM1 em ovos e tecidos de galinhas poedeiras que consumiram ração contaminada com 8 $\mu\text{g/g}$ de aflatoxinas durante 7 dias. Os animais do experimento não exibiram grandes diferenças em relação ao controle, exceto quanto ao peso relativo do fígado e ovários. Os níveis dos resíduos detectados foram: 0,04-0,1 ng/g de AFLAM1 apenas nos rins; 0,11 a 0,83 ng/g de AFLAB1 e

aflatoxicol em fígado; ND (Não Detectado) a 0,56 ng/g de AFLAB1 e ND a 0,1 ng/g de AFLAM1 em rins e menores níveis em músculo e ovas. O tempo de meia vida para AFLAB1 e aflatoxicol foi estimado em 20 horas.

Os maiores níveis de aflatoxinas, em outro experimento com galinhas poedeiras, foram determinados no fígado e rins. O consumo de rações contendo 3310 µg/Kg de AFLAB1 e 1680 µg/Kg de aflatoxina B₂ resultaram em quantidades inferiores a 3 µg/Kg nos tecidos. A existência de diferenças individuais quanto à velocidade de eliminação dos resíduos também foi observada (WOLZAC et alii, 1986).

Uma pesquisa revelou que, devido a diferenças metabólicas ou no tipo de tratamento dos animais, os níveis de resíduos de AFLAB1 e AFLAM1 em frangos e galinhas poedeiras são diferentes. Foram detectados 0,01 µg/Kg de AFLAB1 e 0,36 µg/Kg de AFLAM1 no fígado dos frangos, após o tratamento com ração contaminada com 50 µg/Kg de AFLAB1 por 64 dias. Os fígados das poedeiras, alimentadas com a mesma ração por 169 dias, continham 0,1 µg/Kg de AFLAB1 e níveis inferiores ao limite de detecção (0,01 µg/Kg) de AFLAM1. Os níveis de contaminação utilizados neste experimento seriam uma representação real das contaminações naturais. É interessante salientar que os animais tratados a estes níveis apresentaram-se mais pesados que os controles e poderiam ter as carcaças aprovadas para o consumo pelo serviço de inspeção (MICCO et alii, 1988b).

A AFLAM1 também foi detectada em amostras de urina humana, proveniente de indivíduos que não apresentavam lesões hepáticas (LOVELACE et alii (1983) e ZHU et alii (1987)).

De interesse para o Brasil, está o fato que nos últimos 5 anos, 16,5% das aves e 7,6% dos suínos necropsiados no estado do Rio Grande do Sul apresentaram lesões características de aflatoxicose (SANTURIO, 1990).

Amostras de leite, provenientes de fazendas localizadas no vale do Paraíba, foram analisadas para AFLAM1 e AFLAM2. A alimentação destes animais era feita a base de rações armazenadas e os resíduos de AFLAM1 encontrados variaram entre 0,1 e 1,68 µg/L (SABINO, 1989).

Em um levantamento realizado em rins e fígados de suínos, provenientes dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foi detectada AFLAM1 a nível de traços em uma amostra de tecido renal de ave e AFLAB1 em uma amostra de tecido hepático de suíno ao nível de 27 ng/g. Neste mesmo trabalho, estudos preliminares não identificaram AFLAB1, AFLAM1 ou aflatoxicol em fígados humanos provenientes de autópsias cujos óbitos foram atribuídos a câncer hepático (SABINO, 1990).

2.1.4 Ocorrência em tecidos vegetais

A ocorrência natural de aflatoxinas, em níveis variáveis, têm sido relatada em milho (armazenado e no campo), farinha de amendoim e de semente de algodão, girassol, arroz, sorgo, trigo, soja, cevada, alfafa, mandioca e outros produtos agrícolas procedentes de diversos países (SCOTT, 1978). A importância da ampla distribuição das toxinas em tecidos vegetais reside na possibilidade destes produtos atuarem como um veículo para a contaminação dos produtos de origem animal.

No Brasil as aflatoxinas têm sido detectadas em diversos produtos vegetais, como milho, aveia, farelo de arroz, soja e rações destinadas ao consumo animal, produzidos nos estados do sul (SANTURIO, 1988). Em um levantamento realizado em milho cultivado no estado de Santa Catarina, um dos maiores produtores de suínos do país, eram comuns concentrações de 200 µg/Kg de AFLAB1. As contaminações variavam durante o ano, com picos chegando até a 26% das amostras analisadas, os quais coincidiam com as épocas mais chuvosas da região sul. A incidência de aflatoxinas em amostras de milho provenientes de granjas, onde as técnicas de produção e armazenamento de milho

eram precárias, foi maior em relação ao material coletado em fábricas de ração e cooperativas. (AFLATOXINAS, 1987). Segundo dados da distribuição mundial de aflatoxinas, publicados por JELINEK (1989), entre os anos de 1979-1983, os níveis em amendoim e derivados no Brasil variaram entre 8 e 890 $\mu\text{g/Kg}$ e no ano de 1981, a contaminação média em milho foi menor do que 8 $\mu\text{g/Kg}$. Porém, com poucas exceções, os níveis no Brasil eram geralmente superiores aos encontrados nos demais países envolvidos na pesquisa.

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de milho, estando a maior parte da produção concentrada nos estados São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina. Amostras de milho foram coletadas nestes estados entre os meses de abril de 1985 e março de 1986, e 12,3 % delas continham AFLAB1 em quantidades que variavam entre 10 e 900 $\mu\text{g/Kg}$ (SABINO, et alii, 1989).

2.1.5 Metodologia analítica

KULMBACH (1978) numa revisão pioneira constatou que, até então, cerca de 30 trabalhos abordando resíduos de aflatoxinas em tecidos haviam sido publicados na literatura mundial. Os métodos utilizados para determinação de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), na maioria das vezes, haviam sido desenvolvidos para outros produtos e também eram aplicados para tecidos.

As aflatoxinas B_1 , G_1 e seus metabólitos M_1 , B_{2a} , G_{2a} e aflatoxicol I e II tem sido analisados em leite, sangue, urina (LOVELACE et alii, 1982), fígado, rins, coração e outros tecidos e fluidos de origem animal.

O clorofórmio tem sido adotado como solvente extrator em um grande número de métodos para tecidos e fluidos biológicos (EL-NAWAWY, 1974 (citado por KULMBACH, 1978); TRUCKSESS & STOLOFF, 1981 e TRUCKSESS et alii, 1982). Todavia, segundo TYCZKOWSKA et alii (1987), a extração de fígado com clorofórmio levava quase sempre a problemas de formação de emulsão.

Outro solvente utilizado para a extração das aflatoxinas de tecidos animais é o diclorometano, escolhido por evitar emulsões e pela menor toxicidade para o analista em relação ao clorofórmio (STUBBLEFIELD & SHOTWELL, 1981; STUBBLEFIELD et alii, 1982 e A.O.A.C., 1990¹).

A acetona foi o solvente empregado para a extração de aflatoxinas em ovos (TRUCKSESS, 1977) e posteriormente em adaptações utilizadas na análise de outros fluidos e tecidos animais (TRUCKSESS & STOLOFF, 1979; GREGORY & MANLEY, 1981/1982; MESSRIPOUR & NESHEIM, 1977 (citado por LOVELACE et alii, 1982)).

Todavia, a grande polaridade da AFLAM1 torna necessária para a extração a escolha de agentes mais poderosos, do que a solução de cloreto de sódio saturada empregada para AFLAB1 em ovos. A utilização de ácido cítrico foi então proposta, tendo em vista a seu poder quelante e acidulante sobre os componentes da matriz (TRUCKSESS & STOLOFF, 1979). Talvez em razão de sua maior polaridade, o metanol tem sido utilizado para a extração de aflatoxinas em tecidos animais (MALIK et alii, 1979), algumas vezes com cloreto de sódio (QUIAN & YANG, 1984). Uma mistura de metanol, acetona e uma solução de bicarbonato de sódio já foi utilizada para a extração de AFLAM1 em leite com baixos níveis de contaminação (DOMINGUEZ et alii, 1987).

BROWN et alii (1973) avaliaram vários solventes para extração de AFLAM1: acetona-clorofórmio-água; clorofórmio; acetona e metanol. Os resultados demonstraram a superioridade do metanol.

1- A citação A.O.A.C. (1990) foi adotada neste trabalho para melhor identificação do método que, segundo as normas da NB-66 da A.B.N.T. de 1978, foi catalogado como SCOTT, P.M. (1990) que é o editor do capítulo onde o método foi publicado.

A limpeza em coluna de sílica parece ser uma das técnicas mais difundidas nas metodologias para aflatoxinas em tecidos (BROWN et alii, 1973; STUBBLEFIELD & SHOTWELL, 1981 e 1982; TRUCKSESS & STOLOFF, 1979; TRUCKSESS & STOLOFF, 1981; TRUCKSESS et al, 1982; GREGORY & MANLEY, 1981 e 1982; MICCO et alii, 1987). Outra alternativa aplicada para limpeza é a coluna de octadecisilil (C_{18}) (QUIAN & YANG, 1984).

Alguns métodos incluem como uma etapa prévia à passagem pela coluna, a transferência do extrato em clorofórmio para metanol, seguida de desengorduramento por partição com hexano (TRUCKSESS e STOLOFF, 1981; TRUCKSESS et alii, 1982). A precipitação de proteínas e outros interferentes, quando utilizada, também precede a passagem em coluna. O acetato de chumbo e gel férrico foram empregados com este fim por LOVELACE et alii (1982). TRUCKSESS & STOLOFF (1979) avaliaram a eficiência de limpeza do acetato de chumbo ácido 20%, sulfato de amônio, sulfato de zinco 20%-cloreto de alumínio 0,5%, e sulfato de cobre saturado, optando pelos dois primeiros.

A quantificação das aflatoxinas em tecidos e fluidos animais têm sido executada por cromatografia em camada delgada (CCD) (BROWN et alii, 1973; TRUCKSESS & STOLOFF, 1979). Porém, nos últimos anos, a cromatografia líquida de alta eficiência tem conquistado mais adeptos (GREGORY & MANLEY, (1981 e 1982) STUBBLEFIELD & SHOTWELL (1981); COLEY & NEAL, 1979; TYCZKOWSKA et alii (1987). As técnicas e os respectivos limites de detecção dos métodos para análise de tecidos (fígado, coração, rins, músculo), assim como para fluidos (leite, ovos, sangue e urina) de origem animal são apresentados na tabela 4.

Vários métodos que utilizam derivação com o ácido trifluoroacético para confirmação de AFLAB1 e AFLAM1 têm sido propostos (PRZYBYLSKI, 1975; VAN EGMOND et alii, 1978; STUBBLEFIELD, 1987; STUBBLEFIELD et alii, 1982; VAN EGMOND & STUBBLEFIELD, 1981). Esta derivação permite a hidratação da toxina, resultando em compostos com polaridades diferentes e fluorescência mais intensas que as estruturas originais.

Tabela 4. Técnicas e limites de detecção de métodos para determinação de aflatoxinas em tecidos e fluidos animais.

Técnica	Toxina	L. D. ¹ (µg/Kg)	Referência
CLAE ² -df ³	B ₁ /M ₁	0,01	MICCO et alii (1988a) ⁴
CLAE-df	B ₁ /M ₁	0,05/0,1	GREGORY & MANLEY (1981)
CCD ⁵ -visual	B ₁ /M ₁	0,03/0,05	TRUCKSESS et alii (1982)
CCD-visual	B ₁	0,2	EL-NAWAWY (1974) ⁶
CCD-dn ⁷	B ₁ /M ₁	0,1	STUBBLEFIELD & SHOTWELL (1981)
CLAE-df	B ₁ /M ₁	0,1	QIAN & YANG (1984)
CCD-dn	B ₁	0,05	BROWN et alii (1973)
CCD-dn	B ₁ /M ₁	0,05	FURTADO et alii (1979)
CCD/visual	B ₁ /M ₁	0,3/1,0	LOVELACE et alii (1982)
CLAE-df	M ₁	0,3	BEEBE & TAKAHASHI (1980)
CCD/visual	M ₁	0,004	TUINSTRA & BRONGSGEEST (1975)

1 - Limite de detecção

2 - Cromatografia líquida de alta eficiência

3 - Detector de fluorescência

4 - Utilizado o método de GREGORY & MANLEY (1982)

5 - Cromatografia em camada delgada

6 - Citado por KULMBACH (1978)

7 - Fluorodensitometria

2.2 Zearalenona

2.2.1 Natureza química

A (S)-Zearalenona ou toxina F2, 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-beta-ácido resorsílico lactona (figura 3), foi isolada inicialmente de culturas de Gibberella zeae, que corresponde ao estágio sexual do fungo Fusarium roseum (Graminearum). Também, pode ser produzida por Fusarium tricinctum, F. oxysporum, F. lateritium e F. moniliiforme (MIROCHA et alii, 1977; SCOTT, 1978; BUSBY Jr. & WOGAN, 1981b).

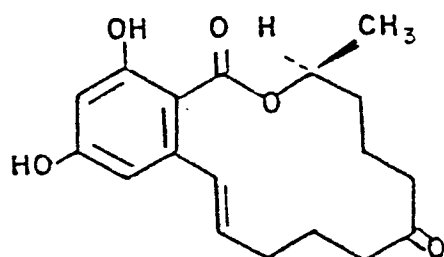


Figura 3. Estrutura química da zearalenona

Apresenta solubilidade progressivamente maior em solventes orgânicos como benzeno, acetonitrila, cloreto de metileno, metanol, etanol e acetona, mas é pouco solúvel em água (0,002g/100mL) (HIDY, et alii, 1977). Uma característica importante, utilizada em alguns métodos analíticos, é a grande solubilidade em alcali aquoso (KUIPER-GOODMAN et alii, 1987).

Dados experimentais demonstraram haver estabilidade da ZEA frente ao tratamento térmico mas, ao contrário das aflatoxinas, a destruição da toxina pela amoniação foi apenas parcial. A inativação de 94% da toxina foi possível após um tratamento com formaldeído a 50°C (BENNETT et alii (1980 e 1981), citado por KUIPER-GOODMAN, 1987).

2.2.2 Efeitos tóxicos

A ZEA e seus metabólitos possuem atividade estrogênica como principal forma de ação. O consumo de ração contaminada com fungos produtores de ZEA provocam o aumento de vulva e glândulas mamárias, e em alguns casos prolapso de vagina e reto nos animais afetados. A interação com receptores citoplasmáticos específicos ocorre através de interações não covalentes, de maneira

competitiva com o hormônio específico, levando a um aumento de permeabilidade uterina aos açúcares, nucleosídeos e aminoácidos. O metabolismo da ZEA leva à formação de alfa e beta zearalenol, sendo que o primeiro possui atividade estrogênica 3 a 4 vezes superior à molécula originária. Este metabólito é conjugado ao ácido glucurônico, imediatamente após sua formação. Parece também haver alguma competição por sítios ativos de enzimas que metabolizam esteróides (KIESSLING, 1986; UENO et alii, 1977).

A citotoxicidade de ZEA foi observada em culturas de células de testículos de bovinos, suínos e perus, mas nenhum efeito foi observado em fibroblastos de embrião de galinhas e células de tireóide de suínos. Também tem sido relatadas a atividade uterotrópica em ratos e a indução de modificações nos níveis hormonais de macacos (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981b).

A ZEA foi incluída entre os produtos com limitadas evidências positivas de carcinogenicidade (HASEMAN et alii (1984), citado por KUIPER-GOODMAN et alii (1987)).

KUIPER-GOODMAN et alii (1987) reuniram dados na literatura que possibilitaram estabelecer os níveis teoricamente seguros para ingestão de ZEA por humanos, chegando ao valor de 0,1 µg/Kg de peso corpóreo/dia. Este valor foi estabelecido com base na extrapolação de experimentos com animais e levou em consideração variações intra e interespécies e outros fatores ligados ao modelo de extrapolação. Não existem, no entanto, dados para humanos de sub-populações mais sensíveis, como por exemplo crianças, já que os estudos são realizados com adultos. Além disso, pode haver diferenças de susceptibilidade devido à variabilidade genética. O nível seguro estabelecido para galinhas foi de 15 g/Kg de peso corpóreo (dose única), o que sugere a pequena sensibilidade destes animais. Já os suínos são sensíveis a quantidades menores que 3,5 mg/Kg de peso corpóreo. A dose onde não há efeito hormonal para macacos é inferior a 50 µg/Kg de peso corpóreo. Os autores recomendaram ainda a monitoração de produtos que estejam sujeitos a baixos níveis de contaminação, como o trigo e o leite.

Após uma dose única (10 mg/Kg) de C₁₄-ZEA em galinhas poedeiras, 94% foram excretados após 72h, dos quais 1/3 foi identificado como ZEA não modificada e outro 1/3 como um metabólito de maior polaridade. Também não houve um sítio de retenção principal, apesar de níveis persistentes de metabólitos lipofílicos terem sido detectados na gema do ovo ($\pm$ 2ppm) (DAILEY et alii, 1980). A ingestão de 1-2 ppm de ZEA causou enfraquecimento da casca de ovos de galinhas (PATTERSON et alii, 1977).

2.2.3 Ocorrência em produtos de origem animal

Evidências experimentais têm revelado haver alguma transmissão de ZEA e alfa e beta zearalenol para o leite de carneiras, vacas e porcas, quando consumido alimento com contaminações superiores a 25 μ g/g. Entretanto, a transmissão para produtos animais através de dietas com baixos níveis de ZEA (menores que 5 μ g/g) não tem sido comprovada (KUIPER-GOODMAN et alii, 1987). Nesta mesma revisão foram coletados dados que relacionam níveis de ingestão de ZEA com os resíduos detectados nos diferentes tecidos e fluidos animais (tabela 5).

Tabela 5. Correlação entre dose ingerida e o nível de toxina detectado nos tecidos e fluidos animais

Animal	Dose/Período	Quantidade detectada (ng/g)	Tecido/Fluido analisado
Suíno	40 ppm/4 semanas	78-128	fígado
Suíno	40 ppm/9-14 dias	130	leite
Galinha	100 ppm/8 dias)	59-103	músculo/fígado
Bovino	25 ppm/7 dias	481 ¹	leite
Bovino	250 ppm/2 dias	104 ¹	leite
Bovino	250 ppm/1 dia	45	leite
Carneiro	1,8 g/dose única	1-2	leite

1 - incluindo conjugados

Uma pequena transmissão de ZEA e seus metabólitos para leite e plasma de vacas, alimentadas com rações artificialmente contaminadas foi comprovada por PRELUSKY et alii (1990). Nenhum resíduo foi detectado em leite ou plasma quando a dose ingerida era de 50 ou 165 mg/dia durante períodos de 21 dias (limites de detecção de 0,5 ng/mL para leite e 2 a 3 vezes superior para plasma). A transmissão foi observada apenas com doses de 544,5 mg/dia (2,5 ng/mL no leite e 3,0 ng/mL no plasma) ou com doses únicas de 1,8 ou 6,0 g (com o máximo de transmissão de 6,1 ng/mL para leite e 13 ng/mL para plasma na maior dosagem testada). Em todas as determinações positivas foram detectados apenas resíduos nas formas conjugadas, hidrolisáveis com beta-glucuronidase e aril sulfatase. Os baixos níveis detectados foram atribuídos à barreira constituída pelo rúmen, à rápida excreção observada com moléculas semelhantes à ZEA e a características da toxina, ainda a serem determinadas (volume de distribuição, ligação à proteínas, etc.).

2.2.4 Ocorrência em tecidos vegetais

A ocorrência de ZEA em milho, cevada, aveia, trigo e sorgo tem sido relatada. O milho é o grão mais implicado com surtos de hiperestrogenismo em suínos (BENNETT & SHOTWELL, 1979).

Embora ZEA seja tipicamente um problema de países de clima temperado, países como a Zâmbia já apresentaram problema de contaminação em milho (SCOTT 1978).

A maioria dos casos de ocorrência de ZEA em milho e outros grãos e rações mistas, nos anos 1977-1978, estava associada com hiperestrogenismo em suínos e gado nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Escócia, Finlândia, França, Iugoslávia, Hungria e Rússia. O maior nível detectado foi de 2900 µg/g, mas a maioria das amostras continha em média 20 µg/g (KUIPER-GOODMAN et alii, 1987).

Um levantamento revelou a presença de ZEA no milho produzido nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina, entre os meses de abril de 1985 e março de 1986. De 328 amostras analisadas, 4,5% apresentaram níveis de 653 a 9830 $\mu\text{g/Kg}$ (SABINO, et alii, 1989).

2.2.5 Metodologia analítica

A literatura apresenta para determinação de ZEA e seus metabólitos em tecidos e fluidos animais métodos onde o clorofórmio é utilizado para a extração. Alguns destes métodos utilizam tratamento enzimático prévio e/ou ácidos para auxiliar a retirada da toxina da matriz (OLSEN et alii, 1985). A hidrólise enzimática, seguida de extração com metanol foi adotada por ROYBAL et alii (1988). A extração de tecidos de galinhas têm sido feita com acetonitrila (TURNER et alii, 1983) e também com acetona-água (95+5) (MEDINA & SHERMAN, 1986). Já SCOTT & LAWRENCE (1988) lançaram mão da acetonitrila básica, para a extração de leite e plasma de bovinos. Uma mistura de éter etílico-isopropanol (10+1) foi empregada para a extração de ZEA e metabólitos de plasma sanguíneo (TRENHOLM, et alii, 1981). O diclorometano, após uma desnaturação térmica de proteínas foi indicado para a extração de ZEA e estrógenos anabólicos (MEDINA & SCHWARTZ, 1987).

A solubilidade de ZEA em soluções alcalinas permitiu o emprego de uma partição solvente orgânico/alcali, seguida de acidificação e nova partição da fase aquosa para o solvente orgânico, como técnica de limpeza dos extratos de tecidos animais (TRENHOLM et alii, 1980; OLSEN et alii, 1985; ROYBAL et alii, 1988).

Outras alternativas para a limpeza têm sido adotadas, como a partição para hexano, que permite a retirada de interferentes apolares, seguida de partição contra acetato de etila (TURNER, et alii, 1983); coluna de alumina básica (MEDINA & SHERMAN, 1986); coluna de Sephadex (MEDINA & SCHWARTZ, 1987) e extração em coluna defase sólida de aminopropil (SCOTT & LAWRENCE, 1988).

A detecção por cromatografia em camada delgada de alta eficiência ou convencional foi empregada por MEDINA & SCHWARTZ (1987), os quais desenvolveram um método para triagem de estrógenos anabólicos, estradiol, DES ou zearanol em extrato de tecido muscular de galinhas, utilizando vapores de iodo para permitir a detecção. Frequentemente utilizada para a determinação de ZEA em produtos agrícolas, a cromatografia gasosa também tem sido aplicada para a análise de tecidos e fluidos animais (TRENHOLM et alii, 1980).

Cromatografia líquida de alta eficiência (TURNER et alii, 1983) com detecção por ultra-violeta (JAMES et alii, 1982; MEDINA e SHERMAN, 1986), eletroquímica (ROYBAL et alii, 1988) ou fluorescência (TRENHOLM et alii, 1981; OLSEN et alii, 1985; SCOTT & LAWRENCE, 1988) tem sido usada para determinação de ZEA e/ou zearalenol em fígado e urina de ratos, plasma sanguíneo e extratos de tecido muscular de aves, gordura, coração, rins, etc.

JOSEFSSON & MOLLER (1977) empregaram $AlCl_3$ 5% para aumentar a intensidade de fluorescência da ZEA em cromatografia em camada delgada com detecção por ultra-violeta comprimento de onda curto (254 nm).

Com a aplicação da cromatografia gasosa para determinação de ZEA em tecidos e fluidos animais, a espectrometria de massa tem sido utilizada como técnica alternativa para confirmação de identidade (ROYBAL et alii, 1988). Para a confirmação em cromatografia em camada delgada, foi proposta a derivação com anidrido acético ou anidrido acético e piridina. O aumento de intensidade de fluorescência da ZEA e produtos de derivação pode ser obtido após a nebulização com $AlCl_3$ 20% (GOLINSKI & GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, 1984). Para confirmação de ZEA e metabólitos na cromatografia líquida de alta eficiência com detector de sequência de diodos UV, SCOTT & LAWRENCE (1988) utilizaram a comparação entre as razões dos picos no comprimento de onda de excitação de fluorescência (274 nm) e pela absorção a 236 nm dos padrões e amostras.

A tabela 6 apresenta as técnicas e limites de detecção dos métodos desenvolvidos para ZEA em diferentes tecidos ou fluidos animais.

Tabela 6. Técnicas e limites de detecção (L.D.) dos métodos para determinação de zearalenona em tecidos e fluidos de origem animal

Técnica	Matriz/Animal	L. D. ($\mu\text{g/Kg}$)	Referência
CLAE ¹ -df ²	leite/bovino	0,2	SCOTT & LAWRENCE (1988)
CLAE-df	plasma/suíno	0,5	OLSEN et alii (1980)
CLAE-df	plasma/suíno	0,6	TRENHOLM et alii (1981)
CLAE-df	plasma/suíno	5,0	OLSEN et alii (1980)
CLAE-UV ³	fígado/rato	28,0	JAMES et alii (1982)
CLAE-UV	urina/rato	2,0	JAMES et alii (1982)
CLAE-UV	gordura/galinha	6,8	TURNER et alii (1983)
CLAE-UV	músculo/galinha	10,0 ⁴	MEDINA & SHERMAN (1986)
CLAE-Eq ⁵	bovinos e aves	5,0	ROYBAL et alii (1988)
CG ⁶ -IC ⁷	plasma/suíno	100,0	TRENHOLM et alii (1980)

1 - Cromatografia líquida de alta eficiência

2 - Detector de fluorescência

3 - Detector de Ultravioleta

4 - Quantidade de padrão injetada em meio à matriz

5 - Detector eletroquímico

6 - Cromatografia Gasosa

7 - Detector de ionização de chama

2.3 Ocratoxina A

2.3.1 Natureza química

A ocratoxina A (OCRA) foi descrita por VAN DER MERWE et alii (1965) como sendo o composto 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-metilisocumarina, ligado à L-beta-fenilalanina por uma ligação amida no grupamento 7-carboxi (figura 4).

Inicialmente o fungo Aspergillus ochraceus Wilhelm foi indicado como produtor, mas posteriormente foram identificadas outras espécies e gêneros como A. sulphureus, A. melleus, A.

sclerotiorum, A. alliaceus, A. ostianus, A. petrakii (SCOTT, 1978), Penicillium viridicatum (HUNT et alii, 1979; WILKEN et alii, 1985), P. palitans, P. cyclopium (KROGH, 1977), P. variable, P. commune e P. purpurescens (SCOTT, 1978).

A presença do átomo de cloro confere toxicidade à molécula, interferindo na dissociação da hidroxila fenólica, podendo também exercer um papel secundário no potencial tóxico da OCRA (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981c).

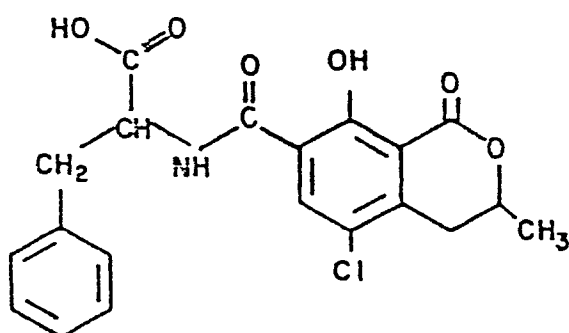


Figura 4. Estrutura química da ocratoxina A

Quanto ao comportamento químico, verifica-se que a toxina apresenta uma fluorescência azul, quando cromatografada em papel com solventes básicos e verde quando em sílica e solvente ácido. A hidrólise da molécula em meio ácido libera a fenilalanina e a lactona ácida (VAN DER MERWE et alii, 1965).

2.3.2 Efeitos tóxicos

A OCRA atua no processo de síntese protéica, no metabolismo de lipídeos, e também nos níveis de glicogênio celular, o que se deve, segundo alguns autores, a alterações nos mecanismos do balanço hormonal (KIESSLING, 1986).

A OCRA parece ser a única forma molecular ativa absorvida pelo trato gastrointestinal. Dentre as principais propriedades da toxina estão o efeito teratogênico, quando em doses elevadas, e a capacidade de ligação a proteínas. Quando hidrolisada resulta na ocratoxina alfa, que não apresenta toxicidade (PATTERSON, 1977 e KITTANE et alii, 1984).

KROGH (1977) apresentou dados quanto a permanência da OCRA em rins (4,5 dias), fígado (4,3 dias) e músculos (3,3 dias) de suínos. Com base nestes valores foi feita a estimativa de que os animais deveriam ficar afastados de rações contaminadas por pelo menos 4 semanas antes do abate, para garantir a ausência de resíduos em seus tecidos. Os efeitos biológicos em aves e suínos, restringem-se a alterações do órgão alvo, os rins, ao menos nos níveis de ocorrência natural. Em humanos, ainda não foi possível estabelecer uma relação entre a OCRA e a etiologia de desordens renais, apesar da similaridade da nefropatia de suínos com a nefropatia endêmica dos balcãs. Apenas níveis superiores a 200 µg/Kg de ocratoxina parecem ser capazes de provocar a nefropatia em suínos (KROGH et alii, 1973). A concentração e permanência da OCRA no sangue de diferentes espécies animais é bastante variada e tem sido atribuída a uma interação da toxina com a soroalbumina. A afinidade da OCRA pela soroalbumina é relativamente baixa, sendo muito maior com uma outra macromolécula presente no soro de humanos e suínos (HULT & FUCHS, 1986).

A toxidez aguda da OCRA já foi comprovada para aves, mamíferos e peixes, quando administrada parenteralmente, com DL₅₀ variando entre 5 e 30 mg/Kg. Adenomas hepáticos e renais foram induzidos em 30% dos camundongos que ingeriram 40 µg/g de OCRA na dieta. Dados não publicados indicam a mutagenicidade da OCRA, embora o teste de Ames tenha mostrado o contrário. A atividade teratogênica de OCRA têm sido demonstrada em ratos, cricetos e camundongos (BUSBY Jr. & WOGAN, 1981c). Paralelamente, a nefropatia tóxica em aves tem sido associada com a presença de OCRA (ELLING, 1975).

2.3.3 Ocorrência em produtos de origem animal

Diversas publicações relatam a passagem de OCRA do alimento para tecidos de suínos. A razão existente entre a concentração da toxina no alimento e tecidos ou entre os diferentes tecidos e fluidos é bastante variada (tabela 7)

Trabalhos relatam a ocorrência de OCRA em rins (traços a 23 ng/g; 1 a 27 ng/g), soro (1 a 520 ng/mL) e sangue (3 a 270 ng/mL; 2 a 6 ng/mL) de suínos (GOLINSKI, et alii, 1984 e 1985; HULT, et alii, 1980).

STAHR et alii (1985) encontraram OCRA em fígado (20 a 100 µg/Kg) e rins de suínos (100 a 200 µg/Kg), assim como em rações para animais. Já KROGH (1977) relata que em produtos de origem vegetal foram encontrados níveis de até 27,5 mg/Kg. Porém, em produtos animais (suínos), o máximo encontrado foi de 67 µg/Kg. Das 600 amostras de sangue humano coletadas em regiões da antiga Iugoslávia, onde a nefropatia é endêmica, 7% apresentaram contaminação por OCRA, sendo que o maior nível atingiu 40 ng/mL de soro (HULT et alii, 1982).

Tabela 7 - Transmissão de ocratoxina A para tecidos de suínos.

Relação	Fator	Referência
plasma (ng/mL) alimento (ng/g)	1,5	HULT et alii (1979) ¹
plasma (ng/mL) sangue (ng/mL)	2,3	RUTQVIST et alii (1978)
soro (ng/mL) rins (ng/g)	13,0	SZEBIOTKO et alii (1981) ²
sangue (ng/g) rins (ng/g)	5,0	RUTQVIST et alii (1978)

1 - Citado por HULT et alii (1980)

2 - Citado por GOLINSKI et alii (1985)

2.3.4 Ocorrência em tecidos vegetais

Estudos têm revelado que para a produção de OCRA por fungos do gênero Aspergillus são necessárias temperaturas superiores a 37°C. Por outro lado, a produção pelo gênero Penicillium requer temperaturas por volta de 5°C, o que poderia justificar a ocorrência mundial da toxina (HULT & FUCHS, 1986).

CHELKOWSKI et alii (1987) avaliaram a produção de OCRA em trigo (A. ochraceus), em diferentes teores de umidade (15 a 30%/15°C). Os resultados indicaram a ausência da toxina após 4 meses a 15% de umidade. A produção foi verificada a partir de 18% de umidade e o tempo para a formação diminuía de maneira inversamente proporcional ao aumento do teor de água.

Na Dinamarca, KROGH et alii (1973) relataram a ocorrência de OCRA em cereais que eram utilizados como ração animal e conseguiram associá-la à nefropatia micotóxica suína. Das amostras contaminadas (58%), cerca de metade continha mais do que 200 µg/Kg e o maior nível detectado foi 27,5 mg/Kg.

A OCRA é distribuída mundialmente, embora pareça estar mais concentrada nos países europeus (JELINEK et alii, 1989) e tem sido encontrada em cevada, café verde, amendoim, aveia, feijão, milho, trigo, arroz e rações (SCOTT, 1978; KROGH, 1977 e MUNRO et alii, 1973).

Um levantamento realizado em alguns produtos agrícolas brasileiros revelou a presença de OCRA em 4,7% das amostras analisadas, em níveis situados na faixa de 32 a 160 µg/Kg. O feijão é o produto que apresenta maior frequência de contaminação (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

2.3.5 Metodologia analítica

A extração da OCRA utilizando solventes que contém um componente ácido na mistura é uma constante na literatura (BAUER e GAREIS, 1987; WILKEN et alii, 1985). O ácido visa inibir a dissociação do grupo carboxílico, mantendo assim a ocratoxina sob uma única forma.

Para extração e limpeza simultânea de pequenas amostras de rins de galinhas ou soro humano, PHILLIPS et alii (1983) utilizaram uma homogenização prévia com ácido fosfórico, desengorduramento com hexano e por fim partição com clorofórmio. Fígado e rins de suínos foram extraídos com uma mistura de cloreto de sódio 2M-Ác. fosfórico 0,5M-clorofórmio seguidos de centrifugação (SCOTT et alii, 1991).

Uma extração composta por digestão enzimática, diálise, seguida de ajuste do pH foi utilizada por HUNT et alii (1979), que conseguiu a eliminação dos interferentes sem a necessidade de limpeza em coluna cromatográfica.

Já STAHR et alii (1985) desenvolveram uma metodologia onde a extração era realizada com metanol.

Alguns métodos para determinação de OCRA em tecidos animais utilizam uma etapa que consiste na partição do extrato de clorofórmio para uma solução de bicarbonato de sódio, seguida de acidificação e nova extração com clorofórmio (BAUER & GAREIS, 1987)

Na metodologia de WILKEN et alii (1985) foi indicada a limpeza em coluna de sílica e STAHR et alii (1985) recomendaram ainda uma limpeza adicional com cartuchos (tipo Sep Pak) de octadecilsilil. A extração em fase sólida de sílica, seguida de eluição com diclorometano-ác. fórmico (98+2) parece ter sido eficiente para eliminação de interferentes. A avaliação de cada lote de colunas para extração em fase sólida foi recomendada (SCOTT et alii, 1991).

ELLING et alii (1975) utilizaram a técnica de cromatografia em camada delgada para analisar OCRA em tecido muscular de aves, com limite de detecção entre 2 e 3 $\mu\text{g/Kg}$. Já a cromatografia em camada delgada com desenvolvimento bidimensional permitiu um limite de detecção de 0,5 ng/g (PAULSCH (1982), citado por HULT & FUCHS (1986)). Cromatografia em camada delgada em fase reversa ou, alternativamente, fase normal, foram empregadas na metodologia de STAHR, et alii (1985).

Um método ímpar para a determinação de OCRA em cevada envolve uma clivagem com carboxipeptidase, a qual leva à liberação da ocratoxina alfa e de fenilalanina. A detecção e quantificação foram baseadas na diminuição de intensidade de fluorescência a 380 nm (HULT e GATENBECK, 1976). Posteriormente este método foi aplicado a tecidos de origem animal, oferecendo um limite de detecção de 2ng/g (HULT et alii, 1977 e HULT et alii, 1980).

Determinações por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência tem se tornado mais acessíveis, aparecendo nos métodos mais recentes e permitindo a determinação de quantidades da ordem de 3 ng de OCRA (PHILLIPS et alii, 1983; BAUER & GAREIS, 1987). No método desenvolvido por SCOTT et alii (1991), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência/detector de fluorescência, foram obtidos limites de detecção de 0,5 ng/g (razão sinal/ruído = 2:1). Um limite de 0,3 ng/g foi anteriormente conseguido por uma metodologia semelhante (WILKEN et alii, 1985).

A confirmação da identidade da OCRA em cromatografia em camada delgada tem sido feita por derivação, que consiste na formação de ésteres metílicos da toxina (NESHEIM (1969), citado por KROGH et alii (1973) e PAULSCH (1982), citado por HULT & FUCHS (1986)). A esterificação da OCRA com anidrido acético, segundo GOLINSKI & GRABARKIEWICZ-SZCZESNA (1984), ocorre com o grupo fenólico da toxina. Outras técnicas para confirmação em placa utilizando vapores de piridina ou piridina-anidrido acético e o aumento de intensidade de fluorescência pela aplicação de AlCl_3 sobre a mancha da toxina também foram descritas.

HULT et alii (1982) e SCOTT et alii (1991) utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência acompanhada de derivação (esterificação) com trifluoreto de boro para confirmação de OCRA em soro sanguíneo humano e fígado ou rins de suínos.

A reação com diazometano, que permite a formação de um derivado duplamente metilado (O-metil, metil éster), foi usada na confirmação da OCRA por cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia em camada delgada (PHILLIPS et alii, 1983).

Um aumento da intensidade de fluorescência em cromatografia em camada delgada foi obtido pela exposição a vapores de amônia, quando utilizado um densitômetro para registrar o fenômeno (TRENK & CHU, 1971). A amônia foi também empregada para derivação pós-coluna em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultra-violeta, proporcionando um limite de detecção inferior a 1 ng/g (HUNT et alii, 1979).

2.4 Imunoensaios

As aflatoxinas, OCRA e ZEA, assim como seus metabólitos e produtos de adição com macromoléculas, têm sido analisadas em tecidos e fluidos corporais utilizando técnicas de imunoensaio (GARNER et alii, 1985; CHU, 1984; GROOPMAN & DONAHUE, 1988; MAC DOUGALD, 1990).

Os resultados da análise de aflatoxinas obtidos por ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido concordantes com as análises realizadas em cromatografia em camada delgada (ZHU et alii, 1987).

KOELTZOW (1990) avaliou 5 diferentes testes para aflatoxinas disponíveis no mercado (ELISA, coluna de afinidade e outras técnicas imunológicas) e não observou diferença significativa entre estes e as convencionais técnicas de minicoluna e cromatografia em camada delgada.

A tecnologia de anticorpos monoclonais permitiu o desenvolvimento de testes de ELISA para a ZEA, com faixa de linearidade de 0,3 a 100 ng/mL (TESHIMA, 1990).

CHU (1984) discutiu os problemas na obtenção de anticorpos contra as micotoxinas. Em decorrência destes compostos não serem imunogênicos, é necessária a preparação prévia de conjugados toxina-proteína, na maioria das vezes dificultada pelos grupos funcionais presentes nas moléculas.

2.5 Interação com microorganismos

KIESSLING et alii (1984) estudaram o metabolismo de aflatoxina, ocratoxina, zearalenona e três tricotecenos pelos protozoários do rúmen, fluido ruminal intacto e bactérias ruminais de carneiros e bovinos. A AFLAB1 não foi afetada pelo fluido ruminal, porém, houve metabolismo das outras micotoxinas. A OCRA foi clivada em ocratoxina alfa (não tóxica) e fenilalanina. Já a ZEA foi reduzida a alfa zearalenol e em menor extensão a beta zearalenol. Ao alfa zearalenol tem sido atribuída atividade estrogênica 3 a 4 vezes superior à toxina original. A maior polaridade deste metabólito foi responsabilizada pelo aumento de velocidade de sua excreção, embora esta característica possa facilitar sua transferência para a corrente sanguínea.

2.6 Distribuição nos tecidos e fluidos animais

A distribuição heterogênea das micotoxinas em grãos e outros produtos agrícolas tem sido observada por vários pesquisadores (CAMPBELL et alii, 1986), mas em tecidos e fluidos de origem animal parece existir uma certa homogeneidade, ao menos nos órgãos considerados como alvo das toxinas.

STOLOFF & TRUCKSESS (1979) avaliaram a distribuição das AFLAB1 e AFLAM1 em fígados de bezerros e suínos que ingeriram alimento contaminado. Após o abate dos animais, os órgãos foram

divididos em seções que partiam das extremidades dos lóbulos à base do fígado. Os resultados obtidos indicaram que a ocorrência das toxinas em fígado era uniforme.

STUBBLEFIELD et alii (1981) confirmaram haver homogeneidade de distribuição das aflatoxinas em seções transversais de fígado bovino, porém nas extremidades foram determinadas concentrações relativamente mais baixas.

A homogeneidade da distribuição da OCRA no sangue, aliada à possibilidade de consumo de alimentos de lotes de diferentes origens, indicam os suínos como eficientes amostradores da toxina em cereais (HULT & FUCHS, 1986).

A deposição de ZEA nos diferentes tecidos de ratos (rins, baço, útero, ovários, coração, cérebro, músculo, intestinos, sangue e tecido adiposo) foi semelhante, exceto por um certo acúmulo no tecido adiposo (UENO et alii, 1977).

2.7 Ocorrência simultânea

A ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas em grãos tem sido constatada. Este fato vem agravar ainda mais os problemas da contaminação dos alimentos, tendo em vista a possibilidade de interações no organismo animal ou humano.

ZEA e OCRA foram detectadas juntas em 1,14 % das 172 amostras colhidas em propriedades rurais de 34 municípios do Rio Grande do Sul (SANTURIO et alii, 1990).

HAGLER, et alii (1984) verificaram a ocorrência simultânea de deoxinivalenol, ZEA e aflatoxinas em trigo produzido o meio oeste dos Estados Unidos.

Na Itália, um estudo revelou a presença de aflatoxinas (45% das amostras e níveis de 0,02 a 1,2 µg/Kg), OCRA (35% das amostras e níveis de 0,1 a 1,02 µg/Kg) e ZEA (28% das amostras e níveis de 51 a 670 µg/Kg), em milho das colheitas de 1982 a 1984. Várias amostras apresentaram duas ou mais micotoxinas (MICCO et alii, 1986).

Em pesquisa realizada em sorgo das colheitas de 1975 e 1976 nos EUA, a ZEA foi detectada em 28% das amostras analisadas provenientes de 10 estados, em níveis de 200-6900 ng/g, aflatoxinas foram detectadas em níveis de 6-54 ng/g. Uma das 194 amostras apresentava ao mesmo tempo 7 ng/g de AFLAB1 e 1190 ppb de ZEA (SHOTWELL, et alii, 1980).

2.8 Sinergismo

SHEREEVE et alii (1979) observaram maiores níveis de AFLAM1 nos rins de vacas leiteiras que consumiram rações contendo simultaneamente AFLAB1 e OCRA, ressaltando a necessidade de maior atenção para as interações entre as toxinas, particularmente em baixas concentrações.

O diagnóstico de muitas micotoxicoses pode ser de difícil conclusão, em vista de diversos fatores que atuam simultaneamente em um mesmo organismo. Neste sentido, o efeito sinérgico entre ZEA, deoxinivalenol e moniliformina, acompanhados de um quarto metabólito mutagênico, parece estar ligado à alta incidência de câncer esofágico em certas regiões geográficas, embora não exista relação aparente entre as toxinas (SCHIEFER, 1986).

A administração combinada de AFLAB1 (50 µg/Kg) e OCRA (50 µg/Kg) para frangos (37 dias) e poedeiras (88 dias) não resultou em lesões aparentes nos órgãos. O tratamento combinado dos frangos levou a maiores níveis de resíduos de OCRA (40 µg/Kg) e AFLAB1 (0,15 µg/Kg) nos tecidos, em relação ao tratamento individual com cada toxina. Menores diferenças foram observadas em poedeiras tratadas da mesma forma. Estes resultados mostram haver um efeito sinérgico entre as toxinas, resultando na maior retenção de resíduos nos tecidos, principalmente em frangos (MICCO et alii, 1988).

2.9 Limites de tolerância

Os limites de tolerância para as micotoxinas têm sido estabelecidos quase que exclusivamente para aflatoxinas em produtos agrícolas, onde os riscos de consumo apresentam-se, na maioria das vezes, maiores do que em produtos de origem animal.

Os níveis considerados seguros para aflatoxinas não tem se mantido fixos, em consequência do aprimoramento dos métodos analíticos, de novos estudos toxicológicos ou por motivos de ordem legal (HAMILTON, 1984).

Modificações nas regulamentações americanas foram feitas quando a safra de milho de 1988 apresentou níveis de aflatoxinas mais altos do que o comum. Nesta ocasião, o nível máximo aceitável de contaminação por aflatoxinas em alimentos destinados aos animais foi elevado de 20 ppb para 100, 200 ou 300 ppb dependendo do caso, permitindo a comercialização interna do produto. (PARK & NJAPAU, 1989).

Poucos produtos de origem animal, excetuando o leite e derivados, possuem legislação específica para limitar os resíduos de micotoxinas. Mesmo assim, os limites estabelecidos para laticínios variam muito dependendo da metodologia adotada em cada país. Por exemplo, na Suíça foram estabelecidos para AFLAM1 os limites de 0,005 µg/L em leite e 0,01 µg/Kg para queijos (SCOTT, 1989). O nível tolerável de AFLAM1 em leite estabelecido nos Estados Unidos foi de 0,5 µg/Kg (PARK & NJAPAU, 1989).

VAN EGMOND (1989) coletou dados a respeito da legislação corrente em vários países para micotoxinas em tecidos animais; apenas a Dinamarca estabeleceu limites para OCRA (em suínos). Níveis superiores a 25 µg/Kg levariam à condenação de toda a carcaça; entre 10 e 25 µg/Kg seriam condenadas e todas as vísceras e quando inferiores a 10 µg/Kg apenas os rins. Na mesma revisão constam ainda limites bastante diferentes estabelecidos para OCRA e ZEA para diferentes produtos. Na URSS a tolerância é de 1000 µg/Kg de ZEA em grãos, óleos e gorduras. Na Romênia foram

fixados 30 µg/Kg de ZEA e 5 µg/Kg de OCRA para todos os alimentos. A antiga Checo-eslováquia determinou o máximo de 20 µg/Kg de OCRA para todos os alimentos. No Brasil os limites propostos são de 30 µg/Kg para aflatoxinas totais ou 15 µg/Kg de AFLAB1 para produtos alimentícios em geral. Já a tolerância de AFLAM1 proposta para leite e derivados é de 0,5 µg/Kg. Os limites para outras micotoxinas referem-se apenas à produtos específicos: são propostos 50 µg/Kg de OCRA em arroz, cevada, feijão e milho e 200 µg/Kg de ZEA também para milho.

A Resolução 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos é a legislação brasileira vigente e estipula um limite de 30 ppb para a somatória da concentração das aflatoxinas B₁ e G₁ nos alimentos (A.B.I.A., 1989). Os limites para outras micotoxinas ainda não foram regulamentados.

2.10 Determinação simultânea de micotoxinas

Vários métodos para determinação simultânea de micotoxinas têm sido propostos para a análise de grãos (GIMENO, 1979; HOWELL & TAYLOR, 1981; TAKEDA et alii, 1979; JOSEFSSON e MOLLER (1977). Para a determinação em produtos de origem animal, no entanto, a literatura é escassa.

NGILORITI & KROLL (1990) desenvolveram um método para determinação simultânea de OCRA, AFLAB1 e AFLAM1 em tecidos. O método utiliza extração com acetona + cloreto de sódio + ácido cítrico, precipitação com cloreto de alumínio + sulfato de zinco, desengorduramento com éter de petróleo e partição para clorofórmio. Finalmente, o extrato é passado em coluna de sílica com 3% de umidade. A detecção e quantificação em cromatografia em camada delgada é realizada por comparação visual com padrões ou por densitometria (365 nm). O limite de detecção determinado é de 1 ng/g e 10 ng/g para aflatoxinas e OCRA, respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Equipamento

- Alumina Neutra, 70-230 mesh, marca Merck.
- Câmara ultra-violeta 366/254 nm, marca UVP.
- Carvão ativo 14-60 mesh, marca Sigma.
- Celite comercial, marca Hyflo Super Cel.
- Centrífuga, marca Fanem - modelo Excelsa II.
- Colunas de vidro de 30 cm de altura e diâmetro interno 1,0 cm.
- Espectrofotômetro ultra-violeta/visível, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 6.
- Florisil 100-200 mesh, marca Merck.
- Frascos de vidro cor âmbar, diâmetro interno 3,0 cm, 8,0 cm de altura, boca larga e tampa plástica.
- Liquidificador com copo de aço inoxidável, marca Waring.
- Micropipetador digital, com volume regulável 100-1000 uL, marca Nichiryo, modelo Justor 1100 DG.
- Multiprocessador de uso doméstico, marca Walita.
- Placas de sílica gel 60 G, 0,25 mm de espessura, em folhas de alumínio 20x20 cm, marca Merck.
- Reagentes grau para análise e equipamento de uso comum em laboratório.
- Rotoevaporador, marca Tecnal.
- Sílica gel 60, 70-230 mesh, marca Merck.
- Ultra-som, marca Brasonic.

3.2 Amostras

Os tecidos animais utilizados para estudo foram rins de suíno e bovino e fígado de aves, bovinos e suínos. Todas as amostras foram adquiridas em diferentes estabelecimentos do mercado varejista. A preparação da amostra compreendeu a trituração e homogenização, em multiprocessador, separação em alíquotas de 100g e armazenamento a -20°C até o momento da análise.

3.3 Padrões de micotoxinas

3.3.1 Preparo das soluções estoque.

As micotoxinas utilizadas foram AFLAB1, AFLAM1, OCRA e ZEA, procedentes da Makor Chemicals Ltd, Jerusalem, Israel. As soluções padrões foram preparadas em benzeno, exceto para AFLAM1, que foi dissolvida em benzeno-acetonitrila (9+1). A concentração foi determinada espectrofotometricamente conforme recomendações da A.O.A.C (1990), utilizando a absorbância no comprimento de onda de absorção máxima e a respectiva absortividade molar de cada toxina.

3.3.2 Soluções de trabalho

A partir das soluções estoque, foram retiradas alíquotas e feitas as diluições adequadas, utilizando benzeno para diluir AFLAB1 (0,32 µg/mL), OCRA (3,30 µg/mL) e ZEA (12,25 µg/mL) e benzeno-acetonitrila (9+1) para diluir AFLAM1 (0,36 µg/mL).

3.3.3 Avaliação de pureza dos padrões

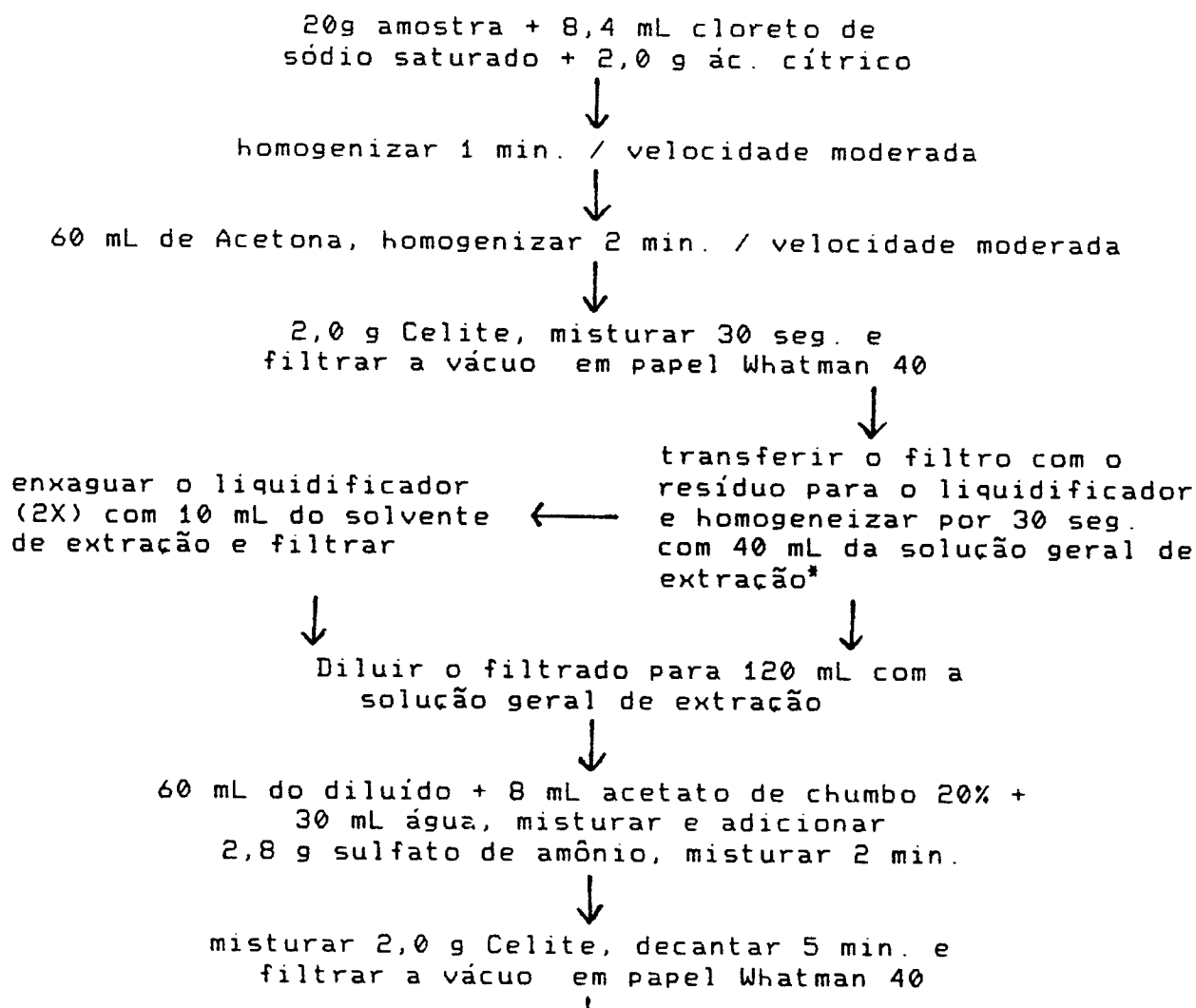
Uma análise visual dos padrões foi feita após o desenvolvimento em placa de sílica gel 60G, utilizando as fases móveis éter etílico-metanol-água (95+4+1) clorofórmio-acetona-isopropanol (87+10+3), para AFLAB1 e AFLAM1, e tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (60+40+0,5 e 60+30+10), para ZEA, AFLAB1 e OCRA respectivamente. A ausência de manchas além do padrão, após o desenvolvimento e observação com lâmpada ultra-violeta 366 e 254 nm, foi considerada prova de sua pureza e de ausência de degradação.

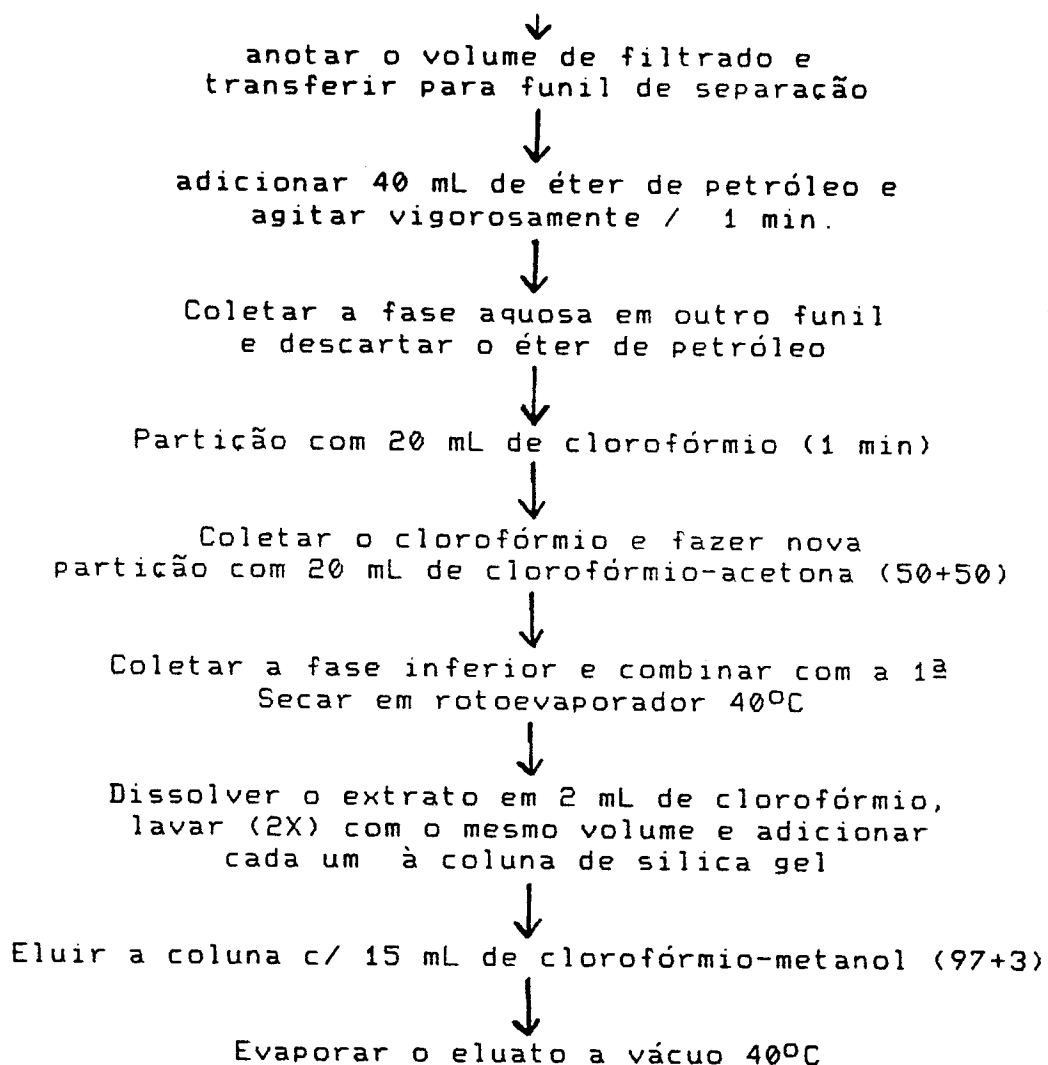
3.4 Contaminação artificial dos tecidos animais

As amostras de tecido foram colocadas no copo do liquidificador juntamente com a quantidade desejada da solução padrão, descrita em 3.3.2, com auxílio de um pipetador de impulso. O solvente de extração era adicionado em seguida e, após uma leve agitação, deixada em repouso por 5 minutos antes do prosseguimento da análise.

3.5 Métodos avaliados para análise de tecidos animais:

- TRUCKSESS & STOLOFF (1979), adaptado por GREGORY & MANLEY (1981)





* - A solução geral de extração corresponde a uma mistura prévia dos solventes (acetona, ác. cítrico e cloreto de sódio saturado), na mesma proporção utilizada na primeira extração da amostra.

- O extrato final corresponde a 8 g de fígado
- Técnica utilizada:
CLAE: com fase estacionária de octadecilsilil (partículas de 5 μ m), fase móvel (com fluxo isocrático) água-acetonitrila-metanol (66+25,2+8,8) e detector de fluorescência.
- Toxinas determinadas pelo método:
aflatoxinas B₁, B₂, B_{2a}, G₁, G₂, M₁ (GREGORY & MANLEY, 1981),
Q₁ e aflatoxicol (GREGORY & MANLEY, 1982).

- STUBBLEFIELD & SHOTWELL (1981) - A.O.A.C. (1990).

100g amostra homogenizada + 10 mL ác. cítrico 20%,
agitar vigorosamente com bastão de vidro, deixar
em repouso / 5 min. e agitar novamente



Adicionar 200 mL diclorometano + 20 g de terra de diatomácea
homogenizar com bastão, agitar o erlenmeyer por 30 min.



filtrar com papel de filtro fluxo rápido em erlenmeyer
contendo 10 g de sulfato de sódio anidro,
agitar 2 min. gentilmente e refiltrar



Coletar filtrado, marcar o volume e evaporar em
rotavapor até quase a secura



Dissolver o resíduo em 25 mL de diclorometano,
enxaguar o frasco com diclorometano e
transferir para a coluna de sílica gel.



Lavar coluna com:
25 mL de tolueno-ác. acético (9+1) --> descartar
25 mL de hexano --> descartar
25 mL de hexano-éter-acetonitrila (6+3+1) --> descartar



Eluir as toxinas com:
40 mL de diclorometano-acetona (8+2)



Evaporar o eluato em rotoevaporador, até próximo à secura,
transferir o resíduo para frasco pequeno e secar
em banho-maria sob fluxo de N₂

x

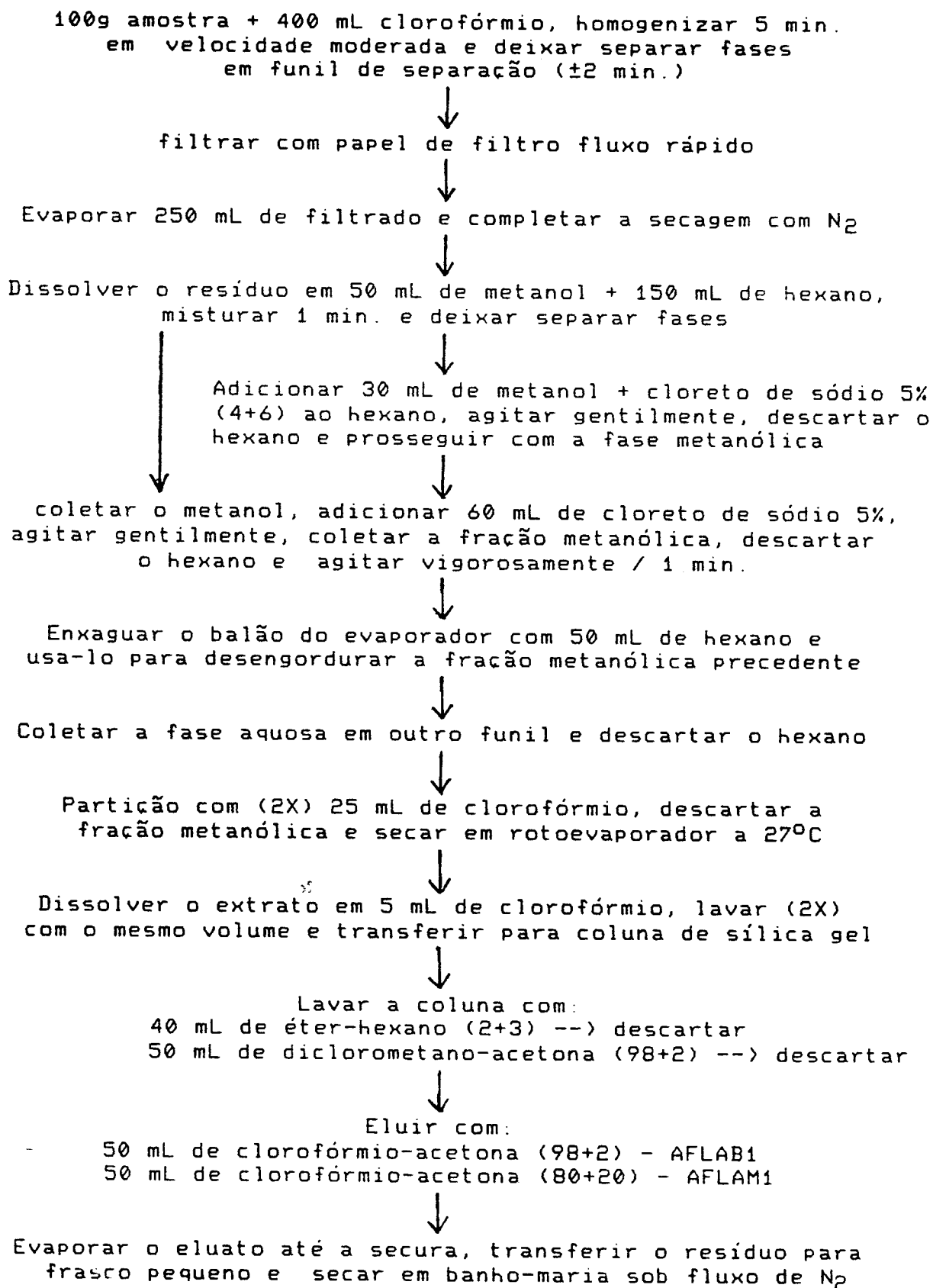
- Técnica utilizada:

CCD: cromatoplaques com fase estacionária de sílica gel 60 com
0,25 mm de espessura, fase móvel clorofórmio-acetona-
isopropanol (87+10+3) e éter etílico-metanol-água (95+4+1),
desenvolvimento bidimensional e quantificação visual ou
densitométrica.

- Toxinas determinadas pelo método:

aflatoxinas B₁, M₁ (A.O.A.C., 1990), B₂, G₁ e G₂ (STUBBLEFIELD
& SHOTWELL, 1981)

- TRUCKSESS & STOLOFF (1981) e TRUCKSESS et alii (1982)



- O extrato final corresponde a 62,5 g de fígado
- Técnica utilizada:
 CLAE: fase estacionária de octadecilsilil e fase móvel de água-metanol-acetonitrila-tetrahidrofurano 70+15+20+3) para a determinação de aflatoxicol.
 CCD: fase estacionária de sílica gel 60, fase móvel hexano-tetrahidrofurano-etanol (70+20+10) ou clorofórmio-acetona (8+2) para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e éter etílico-metanol-água (95+4+1) para aflatoxina M₁.

A avaliação dos métodos acima descritos compreendeu as etapas de extração, precipitação de interferentes e limpeza em coluna. A identificação e quantificação foram realizadas em camada delgada, por comparação visual com padrões.

3.6 Seleção de solventes para extração

Os solventes de extração de vários métodos publicados na literatura foram avaliados, assim como outros de características semelhantes e de baixo custo:

- 1- Etanol comercial 96^oGL
- 2- Etanol 70%
- 3- Etanol absoluto 99% P.A.
- 4- Acetona comercial
- 5- Acetona P.A. (TRUCKSESS & STOLOFF, 1979)
- 6- Metanol P.A.
- 7- Clorofórmio P.A. (STUBBLEFIELD & SHOTWELL, 1981; TRUCKSESS & STOLOFF, 1981)
- 8- Diclorometano^x P.A. (A.O.A.C., 1990)

3.7 Avaliação de precipitantes

Tendo em vista a complexidade dos componentes de tecidos como o fígado e rins, fez-se necessária a avaliação de precipitantes para a retirada de substâncias indesejáveis da matriz, nos casos onde a seletividade do solvente de extração não era suficiente. Os testes foram realizados com amostras de fígado bovino e os volumes utilizados foram sempre iguais em cada etapa, a fim de permitir a comparação dos mesmos.

- Limpeza em etapa única utilizando 1 precipitante

- 1- Sulfato de cobre 10%
- 2- Sulfato de zinco 20%
- 3- Sulfato de amônio 30%
- 4- Ácido tânico 0,5% (solução alcoólica e aquosa)
- 5- Gel férrico (ROMER, 1975)
- 6- Acetato de chumbo (acídico) 20% (TRUCKSESS & STOLOFF, 1979)

- Limpeza em etapa única utilizando 2 precipitantes

- 1- Ác. tânico 0,5% / acetato de chumbo acídico 20%
- 2- Acetato de chumbo acídico 20% / sulfato de amônio 30%
- 3- Acetato de zinco 20% / ferrocianeto de potássio 6%
- 4- Acetato de chumbo acídico 20% / ferrocianeto de potássio 6%
- 5- Acetato de chumbo acídico 20% / acetato de zinco 20%

- Limpeza em 2 etapas empregando 2 precipitantes

- 1 - Ác. tânico 0,5% / acetato de chumbo acídico 20%
- 2 - Acetato de chumbo acídico 20% / sulfato de amônio 30%
- 3 - Acetato de zinco 20% / ferrocianeto de potássio 6%
- 4 - Acetato de chumbo acídico 20% / ferrocianeto de potássio 6%
- 5 - acetato de chumbo acídico 20% / Sulfato de cobre 10%
- 6 - Gel férrico / sulfato de amônio 30%
- 7 - Gel férrico / sulfato de cobre 10%
- 8 - Acetato de chumbo acídico 20% / sulfato de zinco 20%
- 9 - Acetato de chumbo acídico 20% / sulfato de zinco 20%-
cloreto de alumínio 0,5%
- 10- Acetato de zinco 12% - cloreto de alumínio 0,5% / gel
férrico
- 11- Acetato de zinco 12% - cloreto de alumínio 0,5% / sulfato
de amônio 30%
- 12- Acetato de chumbo acídico 20% / gel férrico

3.8 Seleção de adsorventes para limpeza em coluna cromatográfica

A necessidade de uma limpeza dos extratos posterior à precipitação de interferentes, levou à avaliação de uma série de adsorventes, listados na tabela 8. Apenas AFLAB1 e AFLAM1 foram utilizadas para uma primeira triagem e, quando conseguidos resultados satisfatórios, foram incluídas OCRA e ZEA.

3.9 Avaliação de fases móveis para eluição das colunas de limpeza

3.9.1 Eluição direta de todas as toxinas em uma única fração

Diferentes combinações de fases móveis e adsorventes foram avaliadas para a limpeza dos extratos (tabela 9).

3.9.2 Eluição das toxinas em frações separadas

Uma série de solventes foram avaliados para eluir separadamente cada micotoxina, com e sem remoção prévia de interferentes da matriz, conforme mostra a tabela 10.

3.9.3 Avaliação de marcas de éter etílico utilizado para eluição de interferentes

Éter etílico P.A. de 3 marcas disponíveis no mercado (Ecibra, Grupo Química e Nuclear) foram avaliados como componentes de fase móvel para limpeza em coluna. Os solventes testados eram deixados 48h em contato com sulfato de sódio anidro, para remoção da água.

Tabela 8. Adsorventes avaliados para limpeza em coluna cromatográfica

Adsorvente	Proporção	% de umidade	quantidade na coluna (g)
Celite	-----	-----	2,0
Celite + Carvão ativado	3+1	-----	2,0
Alumina Neutra	-----	0	2,0
Alumina Neutra	-----	3	2,0
Celite + MgO	4+1	-----	2,0
Celite + MgO	2+1	-----	2,0
Alumina N ¹ + Celite	2+1	-----	2,0
Alumina N + Silica	1+2	0	2,0
Florisil	-----	3	2,0
Florisil	-----	5	2,0
Silica	-----	0	2,0
Silica	-----	1	2,0
Silica T ²	-----	0	2,0
Silica T	-----	3	2,0
Silica	-----	1	4,0

1- Alumina Neutra.

2- Silica gel 60 tratada conforme descrição da A.O.A.C. 1990.

Tabela 9. Fases móveis e adsorventes avaliados para a eluição simultânea e direta das toxinas

Adsorvente	Umidade (%)	Fase móvel ¹	Proporção
Florisil	0	A+M	60+40
Alumina N ²	0	C+A+M	76+20+4
Sílica+Alumina N 2+1	0	C+A	80+20 a 60+40
Sílica+Alumina N 2+1	0	C+A+M	60+20+20 a 62+36+2
Sílica+Alumina N 2+1	3	C+A	60+40
Sílica+Alumina N 2+1	3	C+A+M	60+32+8 a 60+39+1
Sílica+Alumina N 2+1	5	C+A	60+40 a 56+44
Celite+Alumina N 2+1	ND ³	C+A+M	60+36+4 a 60+32+8
Sílica	0	C+A	70+30 a 80+20
Sílica	1	C+A	70+30 a 80+20
Sílica	3	(C+A)+Af	(80+20)5%

1- Abreviações adotadas

A - Acetona
Af - Ác. fórmico
C - Clorofórmio
M - Metanol

2- Alumina Neutra

3- Não determinada

Tabela 10. Seleção de fases móveis para eluição das toxinas em frações separadas.

Adsorv ³	Umidade ² (%)	Fases Móveis ¹					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Celite	ND ⁴	C	C+A 80+20				
Carvão+Celite 1+3	ND	C	C+A 80+20				
Carv+Cel+Sil ⁵ 1+3+2	ND	C	C+A 98+2	C+A 90+10	C+A 75+25		
Celite+MgO 2+1	ND	C	C+A 80+20	C+A+Af 79+20+1 a 77+20+3	C+A 50+50		
Celite+MgO 2+1	ND	C	C+A 90+10	C+A 80+20	C+A+M 79+20+1 a 77+20+3		
Florisil	0	A+M 60+40					
Alumina	0	C	C+A 80+20	C+A+Af 79+20+1	C+A 50+50		
Alumina	0	C	C+A 90+10	C+A 80+20	C+A+M 79+20+1	C+A+M 77+20+3	
Sil+Alum ⁶ 2+1	0	C	C+A 90+10	C+A 80+20	C+A+M 79+20+1	C+A+M 77+20+3	
Sil+Alum 2+1	3	T	T+E 40+60	C+M 95+5	C+Af 95+5		

Sil+Alum 2+1	3	T	C+A 80+20	C+Af 95+5			
Sil+Alum 2+1	3	C	C+A 90+10	C+A 75+25			
Sil+Alum 2+1	3	C+A 98+2	C+A 95+5	C+A 90+10	T+E 50+50	C+A 75+25	C+A+Af 90+5+5
Sílica	1	C+A 94+6 a 92+8	T+E 80+20 a 60+40	C+A 80+20 a 75+25			
Sílica	1	C+Aa 99+1	C+A 95+5	C+A 80+20			
Sílica	1	C+A 99+1	C+A 95+5	T+E 2+1	C+A 80+20	(C+A)+Af (95+5)sat ⁷	
Sílica	1	C+A 99+1 a 98+2	C+A 95+5 a 90+10	T+E 2+1 a 3+2	C+A 80+20 a 75+25	(C+A)+Af (95+5)sat	
Sílica	1	C+A 97+3 a 90+10	T+E 50+50	C+A 75+25	(C+A)+Af (95+5)sat		
Sílica	1	C+A 98+2	C+A 75+25	T+E 2+1	(C+A)+Af (95+5)sat		
Sílica	1	C+E+H 1+1+1 a 1+2+1	C+A 75+25	(C+A)+Af (75+25)4%			
Sílica	1	C+A 97+3	T+E 60+40	H	C+A 80+20	(C+A)+Af (90+10)sat	
Sílica	1	C+A 99+1 a 98+2	C+A 95+5 a 94+6	H+E 60+40 a 50+50	C+A 80+20 a 75+25		

Sílica	1	T+E 3+2 a 2+1	C+A 80+20 a 75+25	(C+A)+Af (95+5)4% a (75+25)4%	
Sílica	1	D+H 3+1	C+A 75+25	(C+A)+Af (75+25)4%	
Sílica	1	T+E 3+2 a 1+1	C+A 80+20 a 75+25	(C+A)+Af (95+5)sat	
Sílica	1	T	T+E 4+6	C+A 80+20	C+Af 96+4
Sílica	1	T	T+E 4+6 a 7+3	C+M 97+3	C+Af 96+4
Sílica	1	T+Aa	H 4+6	H+E+A 6+3+1	C+A 80+20
Sílica	1	Aa	C+Af 96+4		

1 - Abreviações adotadas:

A - acetona
Af - ác. fórmico
Aa - ác. acético
C - clorofórmio
D - diclorometano;
E - éter etílico
H - hexano
M - metanol
T - tolueno

2 - Percentagem de umidade

3 - Adsorventes utilizados na coluna

4 - Não determinada

5 - Carvão + Celite + Sílica

6 - Sílica + Alumina

7 - Saturado

3.10 Remoção de lipídeos

Foi avaliada a necessidade da remoção dos lipídeos e toda matéria graxa em etapa prévia à partição com clorofórmio. O desengorduramento constou de duas partições com 50 mL de n-hexano, em funil de separação agitado por 3 minutos.

3.11 Avaliação de sistemas de limpeza alternativos

3.11.1 Sistema específico para zearalenona

Um sistema de limpeza do extrato clorofórmico, já clarificado, foi testado. Compreendeu partições com NaOH 0,5N, seguido de descarte da fase orgânica. O pH da fase aquosa foi corrigido para ± 3 e feitas duas partições para clorofórmio, descartando-se agora a fração aquosa. O clorofórmio foi evaporado em banho-maria sob fluxo de N_2 , até a secura, e o extrato resultante destinado à cromatografia em camada delgada.

3.11.2 Sistema específico para ocratoxina A

Testes de limpeza em coluna exclusiva para a purificação da OCRA foram realizados. Primeiramente foi feita a avaliação da limpeza em coluna de alumina neutra com 7 e 15% de umidade, eluídas com metanol e clorofórmio-ác. fórmico (95+5). A segunda tentativa consistiu de uma coluna de sílica gel 60, previamente lavada com metanol e clorofórmio, ativada por 1 hora 105°C. O extrato foi dissolvido em clorofórmio, transferido para a coluna e os interferentes retirados por lavagens com clorofórmio-piridina (99+1) e hexano-éter etílico anidro (1+1). Posteriormente a OCRA foi eluída com clorofórmio-acetona-ác. fórmico (95+3+2).

O procedimento adotado no item 3.11.1 também foi utilizado para OCRA, além de uma modificação do mesmo, substituindo o NaOH 0,5N e o HCl 0,5N por $NaHCO_3$ 0,1N e ác. fórmico 99%, respectivamente.

3.12 Seleção de fases móveis para desenvolvimento em cromatografia em camada delgada

- 1 - tolueno-acetato de etila-clorofórmio (10+5+5) (GIMENO, 1979)
- 2 - tolueno-acetato de etila-clorofórmio (10+4+6)
- 3 - éter etílico
- 4 - clorofórmio-acetona-isopropanol (87+10+3) (A.O.A.C., 1990)
- 5 - éter etílico-metanol-água (95+4+1) (TRUCKSESS et alii, 1982)
- 6 - tolueno-acetato de etila-ác. fórmico 86% (60+40+0,5)
- 7 - tolueno-acetato de etila-ác. fórmico 86% (60+30+10)
- 8 - tolueno-acetato de etila-ác. fórmico 86% (60+40+5,5)
- 9 - tolueno-acetato de Etila-ác. fórmico 86% (50+50+0,5)
- 10 - éter etílico-hexano-acetato de etila (25+50+25)
- 11 - éter etílico-hexano-acetato de etila (25+60+15)
- 12 - benzeno-ác. acético (90+10) (A.O.A.C., 1990)
- 13 - benzeno-Ác. acético (95+5)
- 14 - clorofórmio-metanol-hexano (128+2+7)
- 15 - tolueno-clorofórmio-acetona (15+75+10) (GIMENO, 1979)
- 16 - tolueno-acetato de etila (50+50)

3.13 Teste de rusticidade

Verificou-se a sensibilidade do método a pequenas modificações das condições e reagentes, utilizando-se o modelo sugerido por Youden (WERNIMONT, 1985). O primeiro passo foi estabelecer os fatores que poderiam influenciar os resultados, fixando para cada um deles uma condição básica e outra alternativa (tabela 11).

Tabela 11. Condições básicas e alternativas avaliadas no teste de rusticidade

Variáveis	Condição	
	Básica	Alternativa
A - Volumes de CHCl ₃ na partição (mL)	30/20/15	30/30/30
B - Umidade da sílica da coluna	1%	3%
C - Quantidade de sílica na coluna	2,0g	3,0g
D - Qualidade (marca) da acetona	Merck	Ecibra
E - Umidade do éter etílico	0%	1%
F - Tipo de empacotamento da coluna	com CHCl ₃	Seco
G - Volume de acetato de chumbo 20%	80 mL	50 mL

As variáveis foram combinadas de oito maneiras diferentes, de acordo com o esquema que se segue, onde as letras maiúsculas representam as condições alternativas, as demais condições permanecendo básicas.

1- Todas as condições básicas

2- A + B + C + F

3- A + C + D + G

4- A + D + F + G

5- A + C + E + G

6- B + D + E + G

7- B + C + E + F

8- B + D + E + F

3.14 Metodologia proposta

- Extração e limpeza

100g de amostra + 10 mL de cloreto de
sódio saturado - ác. cítrico 20%
+ 290 mL de metanol

↓ Homogenizar em liquidificador
4 min./ velocidade baixa

↓ Centrifugar o homogenizado
a 3000 r.p.m./15 min.

↓ Coletar o sobrenadante e
desprezar a fase sólida

↓ Separar uma alíquota* de 275 mL +
80 mL de acetato de chumbo 20% +
45 mL de água + 50 mL de Celite

↓ Agitar e deixar em repouso / 10 min.

↓ Filtrar

↓ Coletar 300 mL de filtrado e
adicionar 100 mL de água destilada

↓ Fazer 3 partições para clorofórmio
(30/20/15 mL) e combinar os extratos

↓ secar a vácuo /40°C e completar
a secagem sob fluxo de N₂

* Nas extrações de rins, recomenda-se coletar todo o sobrenadante, adicionar 80 mL de acetato de chumbo 20% e uma quantidade de água suficiente para completar 400 mL de volume final.

- Limpeza em coluna de sílica

1- Empacotamento

Na parte inferior da coluna introduzir um chumaço de lã de vidro e a seguir enchê-la até a metade com clorofórmio. Rapidamente adicionar à coluna 2,0 g de sílica gel 60 dispersa em ± 10 mL de clorofórmio e repetir a operação com o clorofórmio coletado da própria coluna, até que toda a sílica tenha sido transferida. Deixar os sólidos se depositarem e a seguir adicionar 2,0 g de sulfato de sódio anidro granulado, evitando que a coluna seque.

2- Eluição

Dissolver o resíduo em 15 mL de clorofórmio e transferir para a coluna



Lavar o frasco com duas porções de 10 mL de clorofórmio e transferir para a coluna, assim que a fração anterior tenha atingido o topo do sulfato de sódio.



Lavar a coluna com 30 mL de clorofórmio-acetona (99+1) e desprezar



Eluir ZEA e AFLAB1 com 50 mL de clorofórmio-acetona (94+6) e coletar em balão de fundo redondo (Fração B)



Lavar a coluna com 50 mL de hexano-éter etílico anidro (1+1) e desprezar



Eluir AFLAM1 com 50 mL de clorofórmio-acetona (8+2) e coletar em balão de fundo redondo (Fração D)



Reduzir o volume das frações B e D, transferir para frasco âmbar e secar em banho-maria 80°C sob fluxo de N₂

- Cromatografia em camada delgada

O resíduo das frações B e D devem ser redissolvidos em benzeno e benzeno-acetonitrila (9+1), respectivamente, e agitados em ultrassom por 25 segundos.

1- AFLAB₁ e ZEA

Em uma placa de sílica gel, aplicar de 1 a 10 µL dos padrões das micotoxinas, a intervalos de 0,7 cm. Os pontos de aplicação devem distar 1,5 cm da margem inferior e 1,0 cm das laterais. No centro da placa, intercalando os padrões, aplicar 15 µL da fração B redissolvida, conforme descrito anteriormente. Desenvolver a placa em hexano-éter etílico anidro-acetato de etila (60+25+15), para separar a ZEA, deixe secar e observe na câmara ultra-violeta a 254 nm. Desenvolva a mesma placa em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60+40+0,5) e quantifique a AFLAB₁ a 366 nm. Se necessário, desenvolver a mesma placa em éter etílico, para separar os interferentes.

2- AFLAM₁

Proceder conforme item 1, aplicando agora a fração D, desenvolver a placa em éter etílico-metanol-água (95+4+1) e avaliar a 366 nm. A placa pode ser novamente desenvolvida em clorofórmio-acetona-isopropanol (87+10+3), se persistirem os interferentes.

3.15 Limites de detecção

Para a determinação do limite de detecção de cada toxina realizou-se a extração de uma amostra não contaminada e o extrato seco foi redissolvido em 200 µL de benzeno ou benzeno-acetonitrila (9+1). Uma sequência de manchas de cada padrão foi

aplicada em uma placa de sílica gel, a partir do limite de detecção do padrão puro a intervalos de volume de 1 μL . Sobre cada mancha do padrão, aplicou-se 15 μL de amostra. As placas foram desenvolvidas nas fases móveis adequadas a cada micotoxina, deixadas secar e observadas em câmara ultra-violeta com ondas longas ou curtas.

Para ZEA também foi avaliado o limite de detecção após revelação com AlCl_3 20% em etanol 75%.

3.16 Teste de recuperação

3.16.1 Procedimento

A recuperação do método proposto foi avaliada pela análise de amostras de fígado bovino, em duplicata, fortificadas artificialmente a 7 diferentes níveis de cada toxina (tabela 12). A fortificação foi feita a partir das soluções de trabalho, adicionadas no copo do liquidificador juntamente com a amostra e seguida de homogeneização por 30 segundos. Após um repouso de 5 minutos prosseguia-se a extração. Todos os tecidos foram submetidos à análise prévia para a constatação da ausência de quantidades detectáveis das toxinas analisadas.

3.16.2 Tratamento estatístico

A partir das quantidades de toxina adicionadas e detectadas pelo método proposto, foram obtidas as respectivas equações da reta para AFLAB1, AFLAM1 e ZEA. A oscilação das determinações individuais foi avaliada de acordo com o esquema proposto por WERNIMONT (1985). As recuperações esperadas, para determinações em cada nível avaliado, foram calculadas com base nas equações anteriormente obtidas. A subtração dos resultados esperados dos obtidos na prática permitiriam o conhecimento das dispersões das medidas.

Tabela 12. Níveis de contaminação utilizados para os testes de recuperação do método proposto

ZEA	Níveis (ng/g)	
	AFLAB1	AFLAM1
42,9	1,24	1,20
28,6	1,12	1,08
18,4	0,83	0,72
14,3	0,56	0,60
12,2	0,41	0,54
10,7	0,31	0,36
7,2	0,21	0,27

A recuperação média, desvio padrão e o coeficiente de variação foram calculados para cada toxina. A análise de variância "one-way" foi utilizada para determinar a existência ou não de diferenças nas recuperações, decorrentes dos diferentes níveis de contaminação avaliados. Nos casos onde existiu diferença significativa, utilizou-se o valor do desvio padrão corrigido para o cálculo dos novos coeficientes de variação.

3.17 Comparação com o método da A.O.A.C. (1990)

Foi feita uma comparação na recuperação do método proposto com o método oficial da A.O.A.C. (1990), utilizando amostras em duplicata, de fígado (bovino, suíno e de aves) e rins (bovino e suíno). Simultaneamente verificou-se a aplicabilidade do método proposto para a análise de ZEA nos tecidos anteriormente descritos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos métodos disponíveis

A avaliação dos métodos selecionados foi realizada com material e reagentes disponíveis no mercado, sem purificações adicionais e nas condições da rotina diária de um laboratório simples. Este fato poderia explicar as diferenças observadas entre os resultados obtidos e aqueles fornecidos pelos autores, que possivelmente trabalharam em condições diferentes. A metodologia proposta por STUBBLEFIELD & SHOTWELL (1981 e 1982) e A.O.A.C. (1990) foi a que proporcionou os melhores resultados quanto à limpeza do extrato em camada delgada. Um aspecto negativo observado neste método foi a volatilidade do diclorometano, que dificultou as extrações em dias de temperatura elevada. O método apresentou variações na recuperação, que era baixa quando utilizado éter etílico de determinadas marcas, como componente da fase móvel para limpeza em coluna. Este resultado sugere que a pureza, deste solvente é de grande importância. Os demais métodos mostraram-se bastante trabalhosos e resultaram em extratos com grande quantidade de interferentes, que dificultavam a visualização das manchas e consequentemente a quantificação das micotoxinas. Nesse sentido, a limpeza foi o fator crucial na metodologia de GREGORY & MANLEY (1981, 1982), onde a presença de interferentes, apesar da precipitação de proteínas com sulfato de amônio e acetato de chumbo anteriormente à passagem pela coluna de sílica, impossibilitou a comparação das manchas fluorescentes. O clorofórmio utilizado na extração de TRUCKSESS & STOLOFF (1981) e TRUCKSESS et alii (1982) foi um fator limitante, pois levava à formação de uma emulsão que retardava a análise e diminuía o volume do extrato final coletado.

4.2 Escolha do solvente para extração

Dos solventes avaliados (tabela 13), o metanol foi o que apresentou o melhor conjunto de características. Apesar de exigir a centrifugação para a separação dos sólidos ele permite a eliminação posterior de interferentes em uma etapa de precipitação. Por ser um solvente hidrofílico, tem um maior poder de penetração nos tecidos e permite uma extração mais eficiente do que com solventes não aquosos (VAN EGMOND & PAULSCH, 1986). A solução de cloreto de sódio saturado-ácido cítrico 20%, anteriormente utilizada por NGILORITI & KROLL (1990), foi introduzida com a finalidade de romper interações entre as toxinas e componentes dos tecidos, mas também para prevenir a emulsificação. Algumas observações práticas contribuíram para a exclusão dos demais solventes avaliados. O clorofórmio, conforme comentado no item 4.1, levava à formação de emulsão. Já o diclorometano, devido à grande volatilidade, dificultava o trabalho em dias de temperaturas elevadas e proporcionava extratos que necessitavam de limpeza em coluna, até então indesejada. Quando esta coluna era empregada, notou-se que a ZEA eluía juntamente com grandes quantidades de interferentes, inviabilizando a análise simultânea com as outras toxinas. A utilização do etanol foi descartada em vista da grande quantidade de interferentes que persistiam após a precipitação das proteínas, além da formação de emulsões que reduziam o volume do extrato final obtido.

4.3 Purificação do extrato

4.3.1 Precipitação das proteínas

A extração dos tecidos com metanol permitiu a introdução de uma etapa de precipitação das proteínas da matriz, eliminando grande parte dos interferentes que prejudicavam a quantificação das toxinas em camada delgada. O acetato de chumbo

20% foi o que proporcionou os melhores resultados (tabelas 14, 15 e 16) para a limpeza dos extratos de tecidos animais. Discordando dos resultados obtidos por TRUCKSESS & STOLOFF (1979), a precipitação das proteínas com acetato de chumbo 20%, individualmente, foi mais eficiente do que quando em combinação com o sulfato de amônio em uma mesma etapa. A capacidade de liberação de conjugados hidrossolúveis de aflatoxinas com componentes da matriz (no caso ovos) (MICCO et alii, 1987), também contribuiu para a escolha do acetato de chumbo dentre os outros precipitantes.

Tabela 13. Seleção de solventes para extração

Solvente ¹	Procedimento para extração	Separação dos sólidos da matriz	Precipitação das proteínas ²	Limpeza do extrato ³
Acetona	HL ⁴ /4 min.	FV ⁵	S ⁶	+ + +
Acetona comercial	HL /4 min.	FV	S	+ +
Clorofórmio	A ⁷ /30 min.	F ⁸	N ⁹	- -
Diclorometano	A /30 min.	F	N	-
Etanol 99%	HL /4 min.	C ¹⁰	S	+ + +
Etanol 70%	HL /4 min.	C	S	+ +
Etanol comercial	HL /4 min.	C	S	+ +
Metanol	HL /4 min.	C	S	+ + + +

- 1 - Todas as amostras foram homogenizadas com 10 mL de cloreto de sódio saturado-ác. cítrico 20% anteriormente à extração, computados no volume final quando necessário.
- 2 - Utilizado o acetato de chumbo 20% ácido (TRUCKSESS & STOLOFF, 1979)
- 3 - A escala utiliza o sinal (-) para indicar extratos sujos e o sinal (+) para expressar os de boa qualidade.
- 4 - Homogenização em liquidificador a baixa rotação
- 5 - Filtração a vácuo
- 6 - Utilizada a precipitação de proteínas
- 7 - Agitação em erlenmeyer hermeticamente fechado
- 8 - Filtração simples em papel
- 9 - O solvente não requer a etapa de precipitação de proteínas
- 10 - Centrifugação a 3000 rpm/15 min.

Tabela 14. Avaliação da precipitação em etapa única utilizando um precipitante¹

Precipitante	Limpeza do filtrado	Limpeza do extrato na CCD
CuSO ₄ 10%	+ + +	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20%	+ +	-
Ác. tânico 0,5% ²	+	NR ³
PbOAc ácido 20%	+ + + +	±
Gel Férrico	+ + +	±
ZnSO ₄ 20%	+	NR

1 - A avaliação foi realizada com 150 mL de extrato etanólico de fígado (50g de amostra + 270mL de etanol 96% + 30 mL de cloreto de sódio-Ác. Cítrico 20%) + 150 mL de precipitante

2 - solução em etanol 96%

3 - etapa não realizada

Tabela 15. Avaliação da precipitação em etapa única utilizando 2 precipitantes¹

Precipitantes		Volume C1/C2	limpeza do filtrado	limpeza do extrato na CCD
1	2			
Ác. tânico ¹	PbOAc ácido 20%	75/20 ³	+ + +	+ + +
Etanol 96%	PbOAc ácido 20%	75/20 ³	+	+ +
Ác. tânico ²	PbOAc ácido 20%	75/20 ³	+ +	+
Ác. tânico ²	PbOAc ácido 20%	130/20 ³	+ +	±
PbOAc ácido 20%	H ₂ O	50/100	+ + +	+ + +
PbOAc ácido 20%	H ₂ O	75/75	+	+ + +
Ác. tânico ²	PbOAc ácido 20%	75/75	+	+ + +
PbOAc ácido 20%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	75/75	-	+
PbOAc ácido 20%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	50/100	-	+
Ác. tânico ²	PbOAc ácido 20%	100/50	+ +	+
Ác. tânico ²	PbOAc ácido 20%	75/75	+ +	±
ZnOAc 20%	K ₂ Fe(CN) ₆ 6%	75/75	-	NR ⁵
PbOAc ácido 20%	K ₂ Fe(CN) ₆ 6%	75/75	+	-
PbOAc ácido 20%	ZnOAc 20%	75/75	+	NR

1 - A avaliação foi realizada com 150 mL de extrato etanólico de fígado (50g de amostra + 270mL de etanol 96% + 30 mL de cloreto de sódio-ác. cítrico 20%) + 75 mL do precipitante 1 + 75 mL do precipitante 2 ---) coletados 150 mL para partição com clorofórmio

2 - solução a 0.5% em etanol 96%

3 - volume total completado para 75 mL com 55 mL de água destilada

4 - solução aquosa a 0.5%

5 - etapa não realizada

Tabela 16. Avaliação de precipitação em duas etapas utilizando dois precipitantes¹

Precipitantes		Volume	limpeza	limpeza do extrato
1	2	C1/C2	do filtrado	na CCD
Ác. tânico ²	PbOAc ácido 20%	150/20 ³	+	+ + + +
ZnOAc 20%	K ₂ Fe(CN) ₆ 6%	100/100	+	NR ²
PbOAc ácido 20%	K ₂ Fe(CN) ₆ 6%	100/100	+ + +	+ + +
PbOAc ácido 20%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	100/100	+	+ +
PbOAc ácido 20%	CuSO ₄ 30%	100/100	+ + +	+ + +
Gel Férrico	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	100/100	+	-
Gel Férrico	CuSO ₄ 30%	100/100	+ +	+ +
PbOAc ácido 20%	ZnSO ₄ 30%	100/100	+	+
PbOAc ácido 20%	ZnSO ₄ 30%-AlCl ₃ 0.5%	100/100	+	+
PbOAc ácido 20%	ZnSO ₄ 30%-AlCl ₃ 0.5%	100/100	+	+ +
ZnOAc 12%-AlCl ₃ 0.5%	Gel Férrico	100/100	+ +	+
ZnOAc 12%-AlCl ₃ 0.5%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	100/100	+	-
PbOAc ácido 20%	Gel Férrico	100/100	+	-
PbOAc ácido 20%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	100/100	+	+ +

1 - A avaliação foi realizada com 150 mL de extrato etanólico de fígado (50g de amostra + 270mL de etanol 96% + 30 mL de cloreto de sódio-ác. cítrico 20%) + 100 mL do precipitante 1 ---> filtrado ---> 150 mL de filtrado + 100 mL do precipitante 2 ---> coletados 200 mL para partição com clorofórmio

2 - solução aquosa

3 - volume total completado para 150 mL com 130 mL de água destilada

4.3.2 Desengorduramento

Durante os testes de solventes para extração, utilizou-se a partição com hexano para o desengorduramento do extrato. Porém, mais tarde, esta etapa foi considerada desnecessária, devido a introdução da fase de limpeza em coluna de sílica. A retirada dos interferentes de menor polaridade passou a ser feita na própria coluna, diminuindo o tempo e o consumo de solvente por análise.

4.4 Avaliação de limpeza em coluna

4.4.1 Seleção de adsorventes e fases móveis

Após uma exaustiva série de testes de limpeza com precipitantes, foi decidida a utilização de uma coluna cromatográfica, já que os resultados até então obtidos eram insatisfatórios para a aplicação direta dos extratos na placa.

Na seleção do adsorvente e fases móveis, a sílica gel 60 foi escolhida por proporcionar extratos bastante limpos e permitir a separação de AFLAB1, AFLAM1 e ZEA em uma mesma coluna. As principais características que impediram a utilização dos demais adsorventes avaliados estão listados na tabela 17. As combinações de adsorventes, variações de umidade e quantidade presente na coluna foram ineficientes para a limpeza dos extratos nas condições utilizadas.

Tabela 17. Características dos adsorventes avaliados

Adsorvente	característica
Florisil	forte adsorção das aflatoxinas
Silica+Alumina (2+1)	baixa recuperação de AFLAM1
Celite+Alumina (2+1)	baixa recuperação de AFLAM1
Celite	baixa seletividade
Carvão+Celite (1+3)	adsorção irreversível
Carvão+Celite+Sílica (1+3+2)	forte adsorção das aflatoxinas
Celite+MgO (2+1)	baixa seletividade e fluxo lento

Na escolha da fase móvel foi observado que a eluição de todas as toxinas em uma única etapa prejudicaria a sensibilidade do método. A complexidade da matriz, assim como a diversidade das estruturas químicas das toxinas tornavam necessário o emprego de solventes diferentes. Nos testes de fases móveis foram feitas diversas combinações de solventes, assim como ajustes de polaridade e volume. Para a eluição de ZEA e AFLAB1 foi escolhido clorofórmio-acetona (94+6)(50 mL). Uma eluição prévia dos interferentes de menor polaridade deve ser feita com clorofórmio-acetona (98+2)(30 mL), a fim de melhorar a visualização de ZEA. As substâncias que interferem na análise de AFLAM1 podem ser retiradas da coluna com a mistura éter etílico-hexano (1+1)(50 mL), seguida da eluição da toxina com clorofórmio-acetona (8+2)(50 mL). A análise simultânea de OCRA não foi possível, já que interferentes com fluorescência e características cromatográficas semelhantes eluíam junto à toxina em solventes com caráter ácido. A eluição precoce e parcial de OCRA também foi notada com misturas contendo 2% ou mais de acetona em clorofórmio. Somente com solventes ácidos era possível retirar toda a toxina da coluna.

4.4.2 Avaliação das marcas de éter etílico

Nos testes das fases móveis, foi observada variação no comportamento das toxinas quando mudada a marca do éter etílico, mesmo sendo idênticas as características especificadas pelos fabricantes. Das marcas avaliadas, o éter da Grupoquímica foi o que proporcionou melhores resultados, a julgar pela quantidade de interferentes eluídos da coluna. O éter das outras marcas apresentaram-se mais polares, talvez pela presença de impurezas, o que em alguns casos resultou a eluição precoce da AFLAM1. Dentre os fatores que poderiam aumentar a polaridade do éter estão os resíduos de etanol (SCOTT, P.M. comunicação pessoal), resultantes de uma destilação deficiente.

4.5 Sistemas de limpeza alternativos

4.5.1 Zearalenona

As recuperações obtidas a partir de tecidos fortificados de 8,3 a 16,6 ng/g, variaram entre 50 e 80%. Porém, os interferentes que persistiam ao final do processo ainda eram muitos, maiores do que quando a limpeza era realizada em coluna de sílica. Estes resultados contribuíram para que a etapa de limpeza em coluna fosse mantida no método proposto.

4.5.2 Ocratoxina A

A determinação simultânea incluindo OCRA, apesar dos inúmeros testes, não foi conseguida. A presença de interferentes e a baixa recuperação, aliada às limitações impostas pelas demais micotoxinas, foram os principais problemas. Esgotadas as possibilidades foi tentado o aproveitamento parcial do procedimento analítico, utilizando-se apenas uma etapa de limpeza específica, para permitir a quantificação de OCRA. Porém, os resultados obtidos com os sistemas alternativos foram insatisfatórios. Inicialmente a limpeza em coluna de alumina neutra não permitiu recuperações maiores do que 50% ao nível de 3,4 ng/g, além da ocorrência de muitos interferentes na placa, situados muito próximos à OCRA. Nos testes de limpeza que utilizam partições para NaOH 0,5N, observou-se a total degradação da OCRA. A técnica para limpeza empregando partições com bicarbonato de sódio resultou em extratos limpos, porém podia ser observada a presença de produtos de degradação. A baixa recuperação da OCRA (abaixo de 50% ao nível de 6,6 ng/g) e a formação de emulsão, quando utilizada a limpeza com bicarbonato, estão em concordância com as observações feitas por SCOTT et alii (1991). A recuperação após limpeza em coluna de sílica, onde os interferentes eram retirados com clorofórmio-piridina (99+1), também foi considerada baixa (abaixo de 50% ao nível de 150 a 200 ng/g). Todavia, a excelente limpeza dos extratos e ausência de

manchas de degradação sugerem a aplicação deste sistema de limpeza para uma triagem de tecidos suspeitos de contaminação, considerando sempre a baixa recuperação oferecida.

4.6 Seleção das fases móveis para cromatografia em camada delgada

A camada delgada foi sem dúvida a opção de menor custo, todavia outras vantagens apoiam a sua utilização. Entre elas está a possibilidade de analisar várias amostras simultaneamente, que com o desenvolvimento múltiplo permite também a análise de AFLAB1 e ZEA em uma mesma placa. Uma confirmação na própria placa também é uma opção oferecida pela técnica. As fases móveis foram avaliadas principalmente pela capacidade de separação dos interferentes da matriz, sendo na maioria das vezes muito difícil de observar a toxina em meio ao material estranho. A tabela 18 apresenta uma triagem feita para a escolha de solventes para separação de ZEA.

Tabela 18. Triagem de fases móveis para a separação e quantificação de ZEA

Fase móvel	Limpeza do extrato ¹
Tolueno- EtOAc ² (1+1)	+ + +
Hexano-éter etílico-EtOAc (50+25+25)	+ +
Benzeno-ác. acético (95+5)	-
Benzeno-ác. acético (90+10)	-
Clorofórmio-metanol-hexano (7+0,1+0,4)	- -
Tolueno-clorofórmio-acetona (1,5+7,5+10)	+
Tolueno-EtOAc-clorofórmio (10+5+5)	+ +
Tolueno-EtOAc-clorofórmio (10+4+6)	+ +

¹ classificação do solvente quanto a sua capacidade de separar a toxina de interferentes provenientes da matriz; os sinais + e - indicam uma maior ou menor eficiência, respectivamente.

² Acetato de etila

Na tabela 19 são descritos os fatores de retenção obtidos com as fases móveis avaliadas para cada toxina

Tabela 19. Avaliação de fases móveis para separação e quantificação de micotoxinas em extratos de fígado bovino

Fase móvel ²	Fator de retenção (R _f) ¹			
	AFLAB1	AFLAM1	OCRA	ZEA
1	0,01	---	---	0,51
2	---	---	---	0,43
3	---	---	---	0,44
4	0,23	---	0,51	---
5	0,25	0,13	0,47	0,61
6	---	---	0,35	---
7	0,10	---	0,28	---
8	0,90	0,36	---	---
9	---	0,63	---	---
9/8	0,95	0,74	---	---
8/9	0,96	0,70	---	---
7/10	0,39	---	---	---
1/7	0,13	---	---	0,88
1/7/10	0,38	---	---	---

1- Desenvolvidos realizados em cubas não saturadas e a temperatura ambiente

2- Composição:

- (1) Hexano-éter etílico-acetato de etila (60+25+15)
- (2) Hexano-éter etílico-acetato de etila (5+10+5)
- (3) Tolueno-clorofórmio-acetona (15+75+10)
- (4) Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (60+40+5,5)
- (5) Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (60+30+10)
- (6) Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (50+50+0,5)
- (7) Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (60+40+0,5)
- (8) Clorofórmio-acetona-isopropanol (87+10+3)
- (9) Éter etílico-metanol-água (95+4+1)
- (10) Éter etílico

4.7 Teste de Rusticidade

No teste de rusticidade foi possível identificar quais os pontos mais sensíveis às variações de condições e reagentes. Com base nos resultados obtidos foram adequados volumes e condições para a melhor performance do método desenvolvido. A tabela 20 apresentada as recuperações absolutas obtidas, utilizando diferentes combinações das condições alternativas avaliadas.

Pela subtração da média dos resultados que possuíam uma condição alternativa em comum, da média dos demais resultados, foi possível isolar o efeito individual exercido por cada condição avaliada (tabela 21). Este procedimento possibilitou o conhecimento da intensidade de cada fator em relação aos demais. Quando tais fatores foram colocados na ordem decrescente de influência (Tabela 22), verificou-se diferentes pontos críticos para cada toxina.

Os fatores de maior importância para AFLAB1 e ZEA são aqueles que permitem o aumento da quantidade de interferentes da matriz, como é o caso do aumento do volume do clorofórmio na partição e a diminuição do volume de precipitante acetato de chumbo 20%. Também influenciam na recuperação destas toxinas o aumento da quantidade de sílica na coluna e a diminuição da atividade do adsorvente, que refletem diretamente na quantidade de interações entre toxina e adsorvente, principalmente para AFB1.

Tabela 20. Recuperações absolutas utilizando diferentes combinações de fatores (teste de rusticidade).

Condição ¹	Recuperação (%)		
	AFLAB1	AFLAM1	ZEA
Básica	90	73	87
(ABCF)	78	68	78
(ACDG)	73	29	87
(ADFG)	82,5	58	78
(AECG)	68	68	73
(BDEG)	87	58	87
(BCEF)	87	68	87
(BDEF)	82,5	39	78

1- Variáveis avaliadas

Variáveis	Condição	
	Básica	Alternativa
A - Volumes de CHCl ₃ na partição (mL)	30/20/15	30/30/30
B - Umidade da sílica da coluna	1%	3%
C - Quantidade de sílica na coluna	2,0g	3,0g
D - Qualidade (marca) da acetona	Merck	Ecibra
E - Umidade do éter etílico	0%	1%
F - Tipo de empacotamento da coluna	com CHCl ₃	Seco
G - Volume de acetato de chumbo 20%	80 mL	50 mL

Tabela 21. Individualização da influência das condições avaliadas no teste de rusticidade)

Condição alternativa	Diferença calculada		
	B1	M1	ZEa
Volumes de CHCl ₃ na partição	-11,25	-3,75	-5,75
Umidade da sílica da coluna	5,25	8,75	1,25
Quantidade de sílica na coluna	-9,00	1,25	-1,25
Qualidade (marca) da acetona	0,50	-23,25	1,25
Umidade do éter etílico	0,25	1,25	-1,25
Tipo de empacotamento da coluna	3,00	1,25	-3,25
Volume de acetato de chumbo 20%	-6,75	-8,75	-1,25

Tabela 22. Ordem de influência das variáveis avaliadas no teste de rusticidade

Toxina	Ordem de influência das variáveis ¹
ZEa	A > F = B = C = D = E = G
AFB1	A > C > G > B > F > D > E
AFM1	D > B = G > A > C = E = F

1- Variáveis:

- A - Volumes de CHCl₃ na partição
- B - Umidade da sílica da coluna
- C - Quantidade de sílica na coluna
- D - Qualidade (marca) da acetona
- E - Umidade do éter etílico
- F - Tipo de empacotamento da coluna
- G - Volume de acetato de chumbo 20%

A recuperação da AFLAM1 é grandemente afetada pela qualidade da acetona que, devido a presença de impurezas, pode se tornar demasiadamente polar. O aumento da polaridade pode permitir a eluição precoce da toxina, em etapas onde apenas os interferentes deveriam ser eluídos. A atividade do adsorvente e a taxa de precipitação dos interferentes com acetato de chumbo 20% são de grande importância para todas as toxinas, principalmente para AFLAM1. No primeiro caso a menor atividade pode permitir a eluição precoce da AFLAM1, já a diminuição do volume do acetato de chumbo 20% resulta em extratos sujos, onde a visualização de manchas prejudica a sua quantificação. Todos os fatores avaliados, excluindo a qualidade da acetona, foram padronizados na condição mais adequada, para obter uma melhor performance do método. Mesmo uma metodologia rústica requer condições mínimas de trabalho, ainda mais quando se trata de determinações de baixos níveis e que utilize cromatografia em coluna. Em vista da grande variação na qualidade da acetona, é recomendável um teste de cada lote utilizado e, se necessário, a padronização e adaptação dos volumes para uma marca determinada.

A polaridade do clorofórmio, utilizado nas etapas da cromatografia em coluna, reflete diretamente na recuperação das toxinas. Quando utilizado clorofórmio estabilizado com 1% de etanol, verificou-se a eluição precoce da AFLAM1, inviabilizando até a utilização desta variável no teste de rusticidade. Em vista disso é recomendado o uso de clorofórmio estabilizado com amileno, disponível no mercado e de custo acessível. Os resultados anteriormente discutidos vêm de encontro com a observação feita por STUBBLEFIELD & SHOTWELL (1981), que também utilizaram o clorofórmio na fase móvel da cromatografia em coluna.

4.8 Recuperação em diferentes níveis

4.8.1 Resultados

As recuperações obtidas através da extração pela metodologia proposta estão listadas nas tabelas 23, 24 e 25. A maior polaridade da AFLAM1 torna-a mais susceptível a perdas por adsorção, provavelmente com o vidro ou mesmo com a sílica, fator que pode ser responsável pelas menores recuperações desta toxina em relação às demais. A possibilidade de eluição da toxina em etapas anteriores foi considerada remota. Neste sentido, para descartar esta possibilidade, eram adicionadas grandes quantidades de toxina à coluna, tanto como padrão puro quanto na presença de matriz. Nenhum resíduo foi detectado na cromatografia das frações que antecederiam a eluição da AFLAM1.

Tabela 23. Recuperação da aflatoxina B1 em fígado bovino

Nível (ng/g)	Recuperação	
	duplicata 1 %	duplicata 2 %
1,24	84	84
1,12	95	96
0,83	92	87
0,56	90	90
0,41	76	94
0,31	97,5	97,5
0,21	96	96
0,0	ND ¹	ND
Média = 91,1% s = 6,36%		

1 - Não detectado

Tabela 24. Recuperação da aflatoxina M₁ em fígado bovino

Nível (ng/g)	Recuperação	
	duplicata 1 %	duplicata 2 %
1,20	60	60
1,08	71	68
0,72	73	68
0,60	60	60
0,54	69	69
0,36	66	66
0,27	65	65
0,0	ND ¹	ND
Média = 65,7% s = 4,34%		

1 - Não detectado

Tabela 25. Recuperação da zearalenona em fígado bovino

Nível (ng/g)	Recuperação	
	duplicata 1 %	duplicata 2 %
42,9	84	84
28,6	87	78
18,4	93	93
14,3	85	85
12,2	78	78
10,7	71	71
7,2	77	77
0,0	ND ¹	ND
Média = 81,5% s = 6,96%		

1 - Não detectado

4.8.2 Tratamento estatístico

Com as recuperações das toxinas, nos sete diferentes níveis de contaminação, foram calculadas as seguintes equações da reta: $y = 0,8756.x + 0,0146$ / $r = 0,9920$ para AFLAB1, $y = 0,6213.x + 0,0352$ / $r = 0,9842$ para AFLAM1 e $y = 0,8672.x - 0,6477$ / $r = 0,9953$ para ZEA. A dispersão e os desvios individuais dos resultados foram relativamente pequenos, conforme o que se observa nas figuras 5, 6 e 7.

As recuperações médias e os desvios padrão (s) foram de 91,1%, $s = 6,36\%$ para AFLAB1; 65,7%, $s = 4,34$ para AFLAM1 e 81,5%, $s = 6,96\%$ para ZEA. Na análise de variância determinou-se a existência de diferença significativa entre os sete níveis avaliados para AFLAM1 e ZEA ($p > 0,01$), mas não para AFLAB1 ($p < 0,05$). O desvio padrão foi então corrigido (s^*) e os respectivos coeficientes de variação corrigidos (CV^*) foram $s^* = 4,50\%$; $CV^* = 6,85\%$ para AFLAM1 e $s^* = 7,21\%$; $CV^* = 8,85\%$ para ZEA. O desvio padrão da AFLAB1 (6,36) não necessitou correção, já que não houve diferença significativa, resultando em um coeficiente de variação de 6,99%.

4.9 Limites de detecção em camada delgada

Os limites de detecção das toxinas em meio aos componentes extraídos da matriz forneceram condições para estimar as quantidades mínimas que poderiam ser detectadas pelo método (tabela 26). Uma maior sensibilidade poderia ser obtida pelo aumento da quantidade de amostra aplicada na placa, porém o desenvolvimento bidimensional seria necessário, fugindo ao propósito de uma metodologia rápida e de baixo custo. O uso de um revelador para ZEA ($AlCl_3$ 20% em etanol 70%) forneceu um limite de detecção maior ou igual ao obtido pela observação com lâmpada de 254 nm, devido à intensificação do "streaking" que acompanha a toxina no cromatograma.

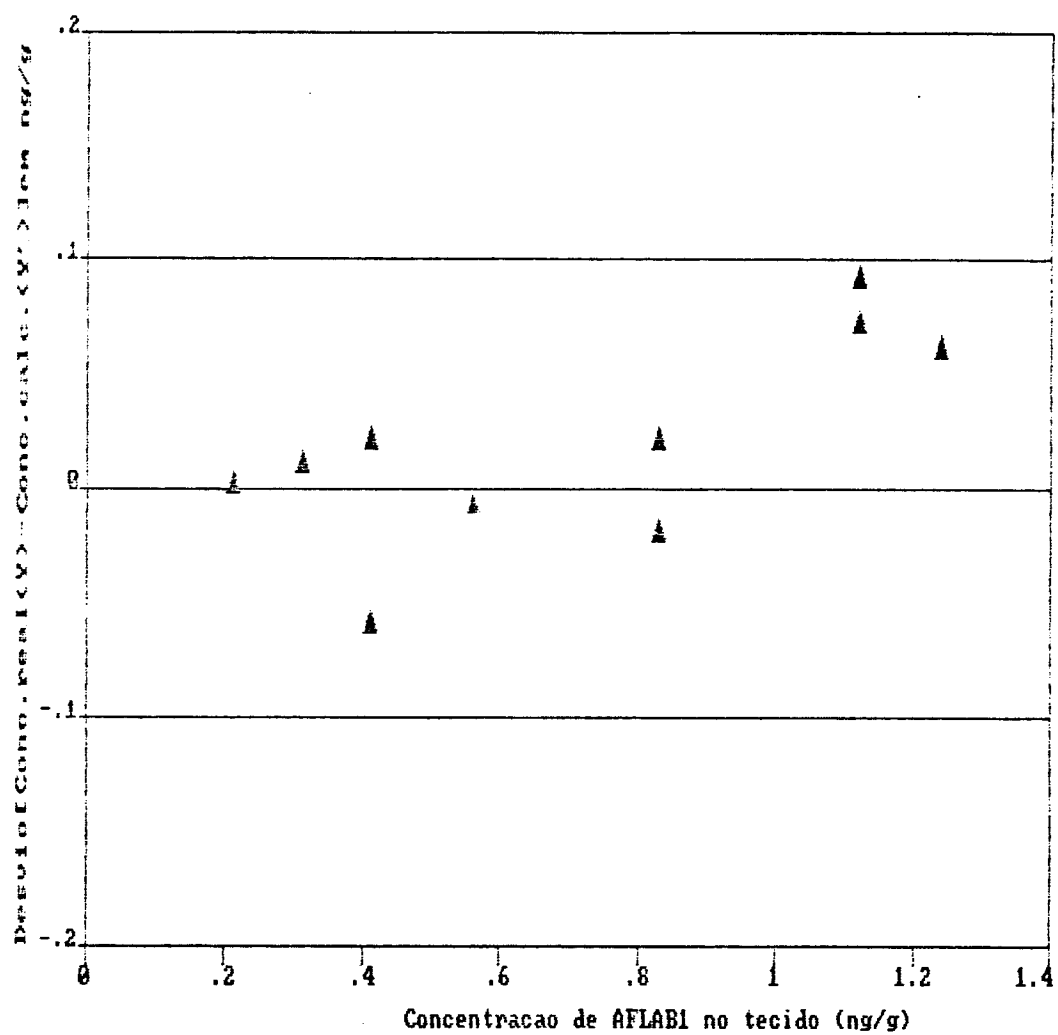


Figura 5. Dispersão e desvios individuais da recuperação da aflatoxina B₁ de fígado bovino utilizando o método proposto

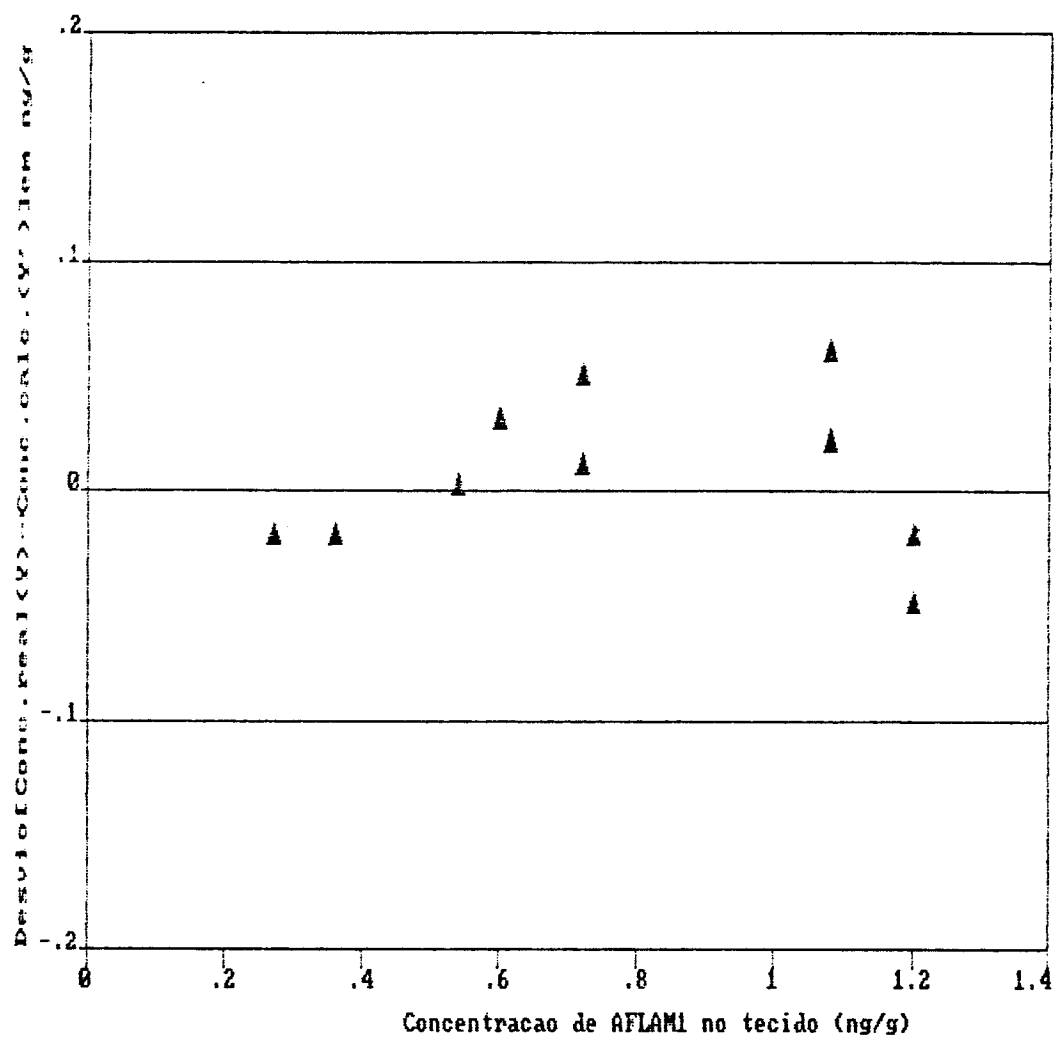


Figura 6. Dispersão e desvios individuais da recuperação da aflatoxina M_1 de fígado bovino utilizando o método proposto

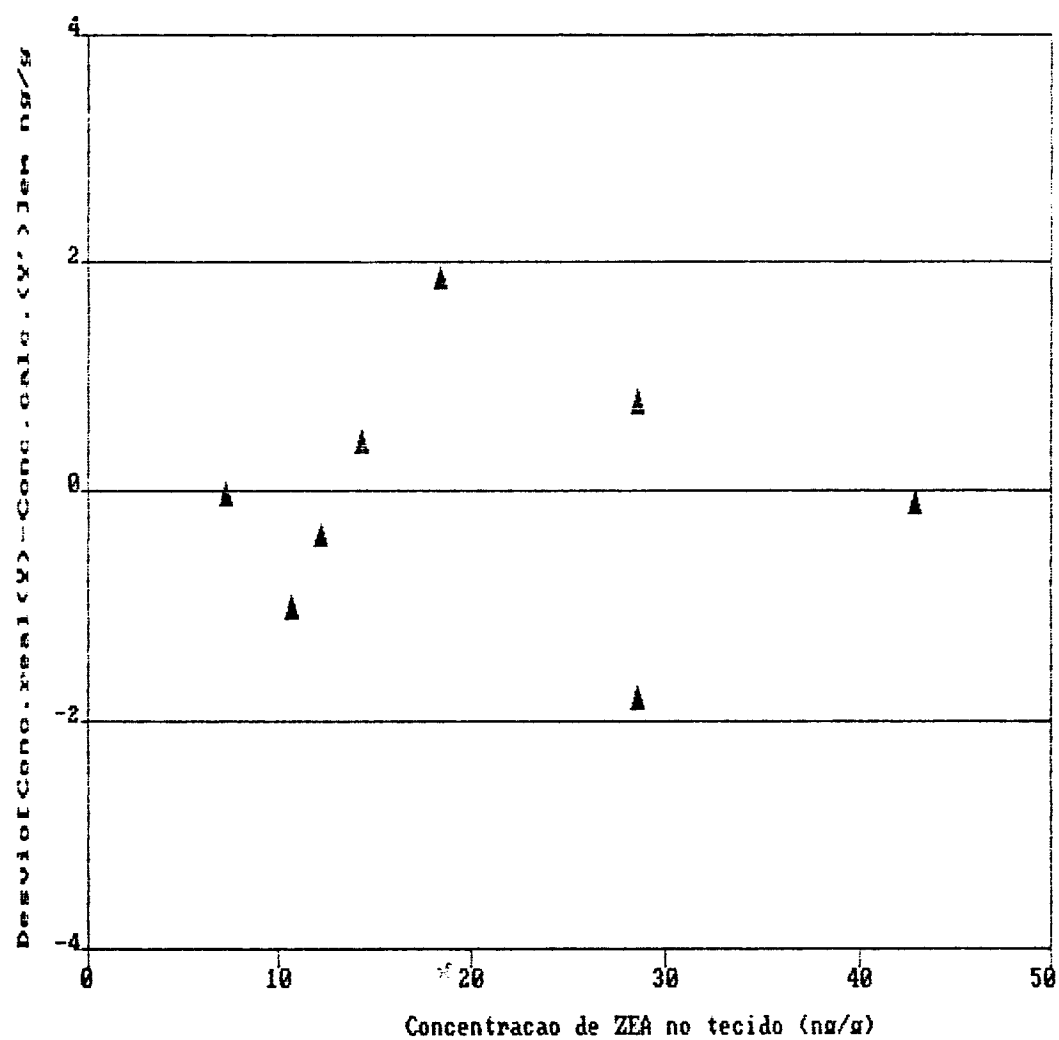


Figura 7. Dispersão e desvios individuais da recuperação da zearalenona de fígado bovino utilizando o método proposto

Os limites de detecção de AFLAB1, AFLAM1 e ZEA são compatíveis com os níveis das toxinas que seriam de maior risco potencial para exposições a longo prazo e que geralmente ocorrem em tecidos animais. Uma maior sensibilidade poderia ser obtida pelo aumento da quantidade de amostra aplicada na placa, porém o desenvolvimento bidimensional seria necessário, comprometendo o objetivo inicial de um método rápido e de baixo custo.

Tabela 26. Limites de detecção do método proposto

----- Toxina	M.D. ¹ (ng)	L.D. ² (ng/g)
-----	-----	-----
ZEA	12,0	2,3
AFLAB1	0,4	0,08
AFLAM1	0,7	0,14
-----	-----	-----

1- Quantidade mínima de toxina detectada visualmente na placa, em meio aos interferentes da matriz (15 uL aplicados equivalendo à 5,3 g de fígado bovino).

2- Limite de detecção estimado.

4.10 Comparação entre o método proposto e o método oficial da A.O.A.C. (1990).

A aplicabilidade do método proposto para a determinação simultânea de AFLAB1, AFLAM1 e ZEA em diferentes tecidos, assim como a comparação com o método STUBBLEFIELD & SHOTWELL (1981) - A.O.A.C. (1990) podem ser verificados na tabela 27.

A utilização do diclorometano (ponto de ebulição 40°C) para a extração e eluição da coluna, no método da A.O.A.C. (1990), representou um problema para análises em dias de temperatura elevada. Nesses dias foi possível constatar uma grande perda de solvente, por evaporação, durante as etapas de filtração. Também foi observado o aparecimento de bolhas na coluna de sílica, que prejudicavam a uniformidade do

empacotamento. Este último fator tem maior significado quando não há possibilidade de trabalho sob temperatura controlada, fato que ocorre em muitos laboratórios em nosso país.

Os autores do método relataram recuperações entre 90 e 95% para AFLAB1 e 80 a 85% para AFLAM1, obtidas a níveis entre 0,1 e 1,0 ng/g de tecido (fígado bovino, de ave, suíno e humano; rins, baço, sangue e músculo de bovino). A metodologia desenvolvida deveria reunir características que permitissem sua aplicação em laboratórios simples, com reagentes disponíveis no mercado e custo reduzido. Nesse sentido, para a comparação dos métodos, foram utilizados os solventes de boa qualidade disponíveis no mercado, sem qualquer purificação adicional. Dessa maneira, as diferenças observadas entre os resultados obtidos e os publicados em literatura, podem ser atribuídas à sensibilidade do método e a diferenças na qualidade dos solventes e outros materiais utilizados. As variações na composição dos tecidos, devido a diferenças na alimentação oferecida aos animais, também podem ter sido a razão da discrepância dos resultados. A presença de interferentes, no fígado suíno, impediu a quantificação das toxinas pelo método da A.O.A.C. (1990). A existência de uma etapa de precipitação com acetato de chumbo, na metodologia proposta, permitiu a eliminação de grande parte destes interferentes, possibilitando a quantificação das toxinas.

A dissolução dos extratos em benzeno (para AFLAB1 e ZEA) permite a aplicação de manchas com diâmetro menor em relação às manchas obtidas utilizando o solvente indicado pelo método da A.O.A.C. (1990) (Benzeno-Acetonitrila 9+1). As manchas com menor difusão ficam mais nítidas, facilitando a quantificação das micotoxinas.

Como é possível notar nos resultados apresentados, o método proposto foi superior ao da A.O.A.C. (1990) na determinação de AFLAB1 em todos os tecidos e apresentou melhores resultados para AFLAM1 em rins e fígado de suínos.

Tabela 27. Comparação entre o método proposto e o método oficial da A.O.A.C. (1990)¹

Recuperação (%)					
Tecidos ²	Método Proposto			A.O.A.C. (1990)	
	AFLAM1 %	AFLAB1 %	ZEA %	AFLAM1 %	AFLAB1 %
FB	73	90	87	75	80
FB	68	90	78	75	80
FS	73	87	73	NDI ³	NDI
FS	63	83	73	NDI	NDI
FA	65	98	89	75	75
FA	65	98	89	75	75
RB	73	97	92	57	81
RB	73	97	92	57	81
RS	67	84	82	62	71
RS	67	84	82	62	71

1- Tecidos contaminados artificialmente com 0,69 ng/g de AFLAM1, 0,64 ng/g de AFLAB1 e 24,48 ng/g de ZEA.

2- Abreviações:

FA - Fígado de Ave FB - Fígado Bovino RS - Rins de Suíno
FS - Fígado Suíno RB - Rins de Bovino

3- Não detectado devido presença de interferentes

5. CONCLUSÕES

O objetivo inicial proposto foi atingido através do desenvolvimento de um método de execução simples, para determinação simultânea de AFLAB1, AFLAM1 e ZEA em tecidos animais. O método é adequado às condições vigentes na maioria dos laboratórios nacionais e à qualidade dos reagentes disponíveis no mercado. Além disso, é possível considerar que um custo relativamente baixo por análise foi obtido, tendo em vista o número de toxinas pesquisadas, e ao mesmo tempo a disponibilidade e baixo custo relativo dos reagentes utilizados.

O emprego de camada delgada contribui, sem dúvida, para o menor custo, todavia outras vantagens apoiaram a sua escolha. Entre elas está a possibilidade de analisar várias amostras simultaneamente e, devido à introdução de um segundo desenvolvimento, permite também a análise de AFLAB1 e ZEA na mesma placa. A facilidade para confirmação da identidade das toxinas também serviu como suporte para esta decisão.

A exatidão do método pode ser traduzida pela recuperação média de 91%, 66% e 81% para AFLAB1, AFLAM1 e ZEA respectivamente. Todas as recuperações obtidas superam 60%, valor assumido como satisfatório para métodos que operam na faixa de ng/g (HORWITZ, 1982). As recuperações foram testadas nas faixas de 0,21 a 1,24 ; 0,27 a 1,20 e 7,2 a 42,9 ng/g para AFLAB1, AFLAM1 e ZEA respectivamente e são consideradas satisfatórias para um método multitoxina.

Os coeficientes médios de variação (AFLAB1 - 7%, AFLAM1 - 7% e ZEA - 9%) mostram também que a precisão é condizente com determinações nos níveis de contaminação avaliados (ng/g).

Os limites de detecção (AFLAB1 - 0,08 ng/g; AFLAM1 - 0,13 ng/g; ZEA - 2,3 ng/g) indicam que o método é adequado para a análise destas micotoxinas em níveis que seriam de maior preocupação e mais prováveis de ocorrer em tecidos animais. Estes limites poderiam ainda ser diminuídos pelo incremento das quantidades de amostra aplicada. O único impedimento seria a

necessidade de utilizar a cromatografia bidimensional, em vista do paralelo aumento dos interferentes, o que comprometeria o objetivo inicial de baixo custo.

O teste de rusticidade mostrou os pontos críticos da metodologia e, excetuando o fator qualidade da acetona, não houve grandes diferenças entre as condições padronizadas e alternativas. A pureza da acetona seria um fator de grande importância para a determinação de AFLAM1. O volume de clorofórmio utilizado na partição foi a principal fonte de variação para AFLAB1 e ZEA, o que passou a ter pequeno significado quando foram fixados os volumes no procedimento definitivo.

A aplicabilidade do método para fígado (bovino, suíno e de aves) e rins (suíno e bovino) foi constatada. Na comparação com o método da A.O.A.C. (1990) foi observada a superioridade do método proposto para a determinação de AFLAB1 em todos os tecidos e AFLAM1 em fígado e rins de suíno.

Em virtude dos testes terem sido realizados com tecidos artificialmente contaminados, não foi possível verificar a eficiência de extração das toxinas ocorridas naturalmente tanto na forma livre quanto na conjugada. Pelas características conhecidas do solvente de extração (metanol-cloreto de sódio-ácido cítrico) e os dados disponíveis na literatura, é bastante provável que não existam dificuldades na retirada das toxinas presentes na forma livre ou fracamente associadas aos componentes da matriz. Quanto aos conjugados com ácido glucurônico, sulfatos e outros, não é possível fazer afirmações, porém uma hidrólise enzimática prévia poderia liberar estes conjugados. Enzimas como a betaglucuronidase tem sido utilizadas e, com algumas pequenas adaptações de volumes, poderia ser conseguida a determinação dos níveis totais das toxinas em tecidos animais.

A análise simultânea de OCRA, apesar dos inúmeros testes, não foi conseguida. A presença de interferentes e a baixa recuperação, aliada às limitações impostas pela presença das demais micotoxinas, foram os principais problemas. Esgotadas as

possibilidades de determinação simultânea, foi tentado o aproveitamento da parte inicial da metodologia, utilizando apenas uma etapa de limpeza específica para OCRA. Os melhores resultados foram obtidos com a coluna de sílica, onde os interferentes podem ser eluídos com clorofórmio-piridina (99+1). A limpeza dos extratos foi satisfatória, porém a recuperação por volta de 50% limita sua aplicação para triagens.

O método proposto pode ser aplicado com a finalidade de estabelecer os níveis das micotoxinas em tecidos animais e também como uma técnica auxiliar para o diagnóstico de micotoxicoses.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.B.I.A. **Compêndio da legislação de alimentos**, 3. rev. São Paulo, 1989. v.1A. (Resolução 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos)
- AFLATOXINAS: CNPSA alerta para contaminações do a milho. **Suínocultura Industrial**, Julho: 24-27, 1987.
- ASHOOR, S.H. & CHU, F.S. Interaction of aflatoxin B_{2a} with amino acids and proteins. **Biochemical Pharmacol**, 24: 1799-1805, 1975.
- AUTRUP, H.; WAKHISI, J.; VAHAKANGAS, K.; WASUNNA, A.; HARRIS, C. C. Detection of 8,9-dihydro-(7'-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin B₁ in human urine. **Environ. Health Perspectives** 62: 105-108, 1985.
- BAUER, J.; GAREIS, M. Ochratoxin A in food chain. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin B** 34: 615-617, 1987. Traduzido do alemão.
- BEEBE, R.M. & TAKAHASHI, D.N. determination of aflatoxin M₁ by high pressure liquid chromatography using fluorescence detection. **J. Agric. Food Chem.** 28(2): 481-482, 1980,
- BENNETT, G.Á. & SHOTWELL, O.L. Zearalenone in cereal grains. **J. Amer. Oil Chem. Soc.** 56: 812-819, 1979.
- BROWN, N.L.; NESHEIM, S.; STACK, M.E.; WARE, G.M. Method for the determination of aflatoxin in animal tissue. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 56(6): 1437-1439, 1973.
- BUSBY Jr., W.F. & WOGAN, G. N. Aflatoxins. In: SHANK, R. C. ed. **Micotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**. Boca Raton, CRC Press, 1981a. v.2, p. 1-27.

- BUSBY Jr., W.F. & WOGAN, G. N. Ochratoxins. In: SHANK, R. C. ed. **Micotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**. CRC Press. Boca Raton, 1981b. v.2, p. 129-136.
- BUSBY Jr., W.F. & WOGAN, G. N. Zearalenone and its derivatives. In: SHANK, R. C. ed. **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**. CRC Press. Boca Raton, 1981c. v.2, p. 145-153.
- CAMPBELL, A.D.; WHITAKER, T.B.; POHLAND, A.E.; DICKENS, J.W.; PARK, D.L. Sampling, sample preparation, and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. **Pure Appl. Chem.** 58(2): 305-314, 1986.
- CHELKOWSKI, J.; GOLINSKI, P.; WIEWIORSKA, M. Mycotoxin in cereal grain. Part 12. Contamination with ochratoxin A and penicillic acid as indicator of improper storage of cereal grain. **Nahrung** 31(1): 81-84, 1987.
- CHU, F.S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. **J. Food Protection** 47(7): 562-569, 1984.
- CIRILLI, G.; ALDANA-CIRILLI, C.S.; ZAGHINI, L. Dosaggio T.L.C. e/o H.P.L.C. delle micotossine. Nota I: le aflatossine. **Tecnica Molitoria** febbraio: 98-106, 1986.
- COLLEY, P.J.; NEAL, G.E. The analysis of aflatoxins by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry** 93: 409-418, 1979.
- CULLEN, J.M.; RUEBNER, B.H.; HSIEH, L.S.; HYDE, D.M.; HSIEH, D.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fischer rats compared to aflatoxin B₁. **Cancer Research** 47: 1913-1917, 1988.
- DAILEY, R.E. Metabolism of [¹⁴C] zearalenone in laying hens. **J. Agric. Food Chem.** 28(2): 286-291, 1980.

- DOMINGUEZ, L.; BLANCO, J.L.; GOMEZ-LUCIA, E.; RODRIGUEZ, E.F.; SUAREZ, G. Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products contaminated at low levels. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 70(3): 470-472, 1987.
- ELLING, F.; HALD, B.; JACOBSEN, C.; KROGH, P. Spontaneous toxic nephropaty in poultry associated with ochratoxin A. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A** 83: 739-741, 1975.
- FIORENTIN, F. Aflatoxicose em suínos. **Suinocultura Industrial** outubro: 12-17, 1986.
- FURTADO, R.M.; PEARSON, A.M.; GRAY, J.I.; HOGBERG, M.G.; MILLER, E.R. Aflatoxin residues in the tissues of pigs fed a contaminated diet. **J. Agric. Food Chem.** 27(6): 1351-1354, 1979.
- FURTADO, R.M.; PEARSON, A.M.; GRAY, J.I.; HOGBERG, M.G.; MILLER, E.R. Effect of cooking and or processing upon levels of aflatoxins in meat from pigs fed a contaminated diet. **J. Food Sci.** 46(5): 1306-1308, 1981.
- FURTADO, R.M.; PEARSON, A.M.; HOGBERG, M.G.; MILLER, E.R.; AUST, S.D. Withdrawal time required for clearance of aflatoxins from pig tissues. **J. Agric. Food Chem.** 30: 101, 1982.
- GARNER, C.; RYDER, R.; MONTESANO, R. Monitoring of aflatoxins in human body fluids and application to field studies. **Cancer Research** 45: 922-928, 1985.
- GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin, and penitrem A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 62(3): 579-585, 1979.

- GOLINSKI, P. & GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(6): 1108-1110, 1984.
- GOLINSKI, P.; HULT, K.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; KNEBLEWSKI, P.; SZEBIOTKO, K. Mycotoxic porcine nephropaty and spontaneous occurrence of ochratoxina A residues in kidneys and blood of polish swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(6): 1210-1212, 1984.
- GOLINSKI, P.; HULT, K.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; SZEBIOTKO, K. Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidney and serum samples in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(4): 1014-1015, 1985.
- GREGORY III, J.F. & MANLEY, D.B. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal tissues and products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64(1): 144-151, 1981.
- GREGORY III, J.F. & MANLEY, D.B. High performance liquid chromatographic quantitation of aflatoxins metabolites in animal tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65(4): 869-875, 1982.
- GROOPMAN, J.D. & DONAHUE, K.F. Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(5): 861-867, 1988.
- HAGLER Jr., W.M.; TYCZKOWSKA, K.; HAMILTON, P.B. Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the midwestern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(1): 151-154, 1984.

- HAMILTON, P.B. Determining safe levels of mycotoxins. **J. Food Protec.** 47(7): 570-575, 1984.
- HIDY, P.H.; BALDWIN, R.S.; GREASHAM, R.L.; KEITH, C.L.; MCMULLEN, J. R. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. **Adv. Appl. Microbiol.** 22: 59-82, 1977.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Anal. Chem.** 54(1): 67A-76A, 1982.
- HOWELL, M.V. & TAYLOR, P.W. Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by TLC or HPLC. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(6): 1356-1363, 1981.
- HSIEH, D.P.H.; WONG, Z.A.; WONG, J.J.; MICHAS, C.; RUEBNER, B.H. Comparative metabolism of aflatoxin. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE C. W.; MEHLMAN, M. A. ed. **Mycotoxins in human and animal health.** Pathotox Publish., Park Forest South, 1977. p. 37-50.
- HULT, K. & FUCHS, R. Analysis and dynamics of ochratoxins in biological systems. In: STEYN, P. S.; VLEGGAAR, R. **Mycotoxins and phycotoxins.** Sixth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Elsevier Science Publish. Pretoria, 1986. p. 365-376.
- HULT, K. & GATENBECK, S. A spectrophotometric procedure, using carboxipeptidase A for the quantitative measurement of ochratoxin A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 59(1): 128-129, 1976.
- HULT, K.; HOKBY, E.; GATENBECK, S. Analysis of ochratoxin B alone and in the presence of ochratoxin A using carboxipeptidase A. **Appl. Environ. Microbiol.** 33(6): 1275-1277, 1977.

- HULT, K.; HOKBY, E.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: Use in evaluation of toxin content of consumed feed. **Appl. Environ. Microbiol.** 39(4): 828-830, 1980.
- HULT, K.; PLESTINA, R.; HABAZIN-NOVAK, V.; RADIC, B.; CEOVIC, S. Ochratoxin A in human blood and balkan endemic nephropathy. **Arch. Toxicol.** 51: 313-321, 1982.
- HUNT, D.C.; PHILP, L.A.; CROSBY, N.T. Determination of ochratoxin A in pigs kidney using enzymic digestion, dialysis and high performance liquid chromatography with post column derivatization. **Analyst** 104: 1171-1175, 1979.
- JAMES, L.J.; MCGIRR, L.G.; SMITH, T.K. High pressure liquid chromatography of zearalenone and zearalenols in rat urine and liver. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 65: 8-13, 1982.
- JELINEK, C.F.; POHLAND, A.E.; WOOD, G.E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 72(2): 223-230, 1989.
- JOSEFSSON, B.J.E. & MOLLER, T.E. Screening method for detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin, and zwearalenone in cereals. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 60(6): 1369-1371, 1977.
- KEYL, A.C. & BOOTH, A.N. Aflatoxins effect in livestock. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 48: 599-604, 1971.
- KIESSLING, K.-H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure Appl. Chem.** 58(2): 327-338, 1986.

- KIESSLING, K.-H.; PETTERSSON, H.; SANDHOLM, K.; OLSEN, M.
Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 47(5): 1070-1073, 1984.
- KITTANE, M.; STEIN, A.F.; BERNDT, W.O.; PHILLIPS, T.D.
Teratogenic effects of ochratoxin A in rats with impaired renal function. **Toxicology** 32: 277-285, 1984.
- KOELTZOW, D.E. & TANNER, S.N. Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 73(4): 584-589, 1990.
- KROGH, P. Ochratoxins. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE C.W.; MEHLMAN, M.A. ed. **Mycotoxins in human and animal health**. Pathotox Publish., Park Forest South, 1977. p. 489-498.
- KROGH, P.; HALD, B.; PEDERSEN, E. J. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** section B, 81: 689-695, 1973.
- KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 7: 253-306, 1987.
- KULMBACH, R.L. Sampling, preparation and chemical analysis of meat and meat products as well as eggs and egg products suspected of containing aflatoxin residues. **Fleischwirtschaft** 58(4): 594-598, 1978.
- LARSSON, P.; LARSSON, B.S.; TJALVE, H. Binding of aflatoxin B₁ to melanin. **Food Chem. Toxicol.** 26(7): 579-586, 1988.

LOVELACE, C.E.A.; NJAPAU, H.; BAYLEY, A.C.; KASOBE, L. Aflatoxin metabolism in human urine. **Prot. Int. Symp. Mycotoxins** 267-270, 1983.

LOVELACE, C.E.A.; NJAPAU, H.; SALTER, L.F.; BAYLEY, A.C. Screening method for the detection of aflatoxin and metabolites in human urine: aflatoxins B₁, G₁, M₁, B_{2a}, G_{2a}, aflatoxicols I and II. **J. Chromatography Biomedical Applications** 227: 256-261, 1982.

MAC DOUGALD, D.A.; THULIN, A.J.; PESTKA, J.J. Determination of zearalenone and related metabolites in porcine urine by modified enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 73(1): 65-68, 1990.

MALIK, M.A.; SHAH, M.A.; ASHGAR, M.N. Method for the estimation of aflatoxins B₁ and G₁, in animal tissue. **Pakistan Journal of Scientific Res.** 31(1/2): 102-106, 1979. apud F.S.T.A. 13(10): A 638.

MEDINA, M.B. & SCHWARTZ, D. A multi-residue TLC screening procedure for anabolic oestrogens and detection of oestradiol, DES or zeranol in chicken muscle tissue extracts. **Food Addit. Contam.** 4(4): 415-427, 1987.

MEDINA, M.B. & SHERMAN, J.T. High performance liquid chromatographic separation of anabolic oestrogens and ultraviolet detection of 17 B-oestradiol, zeranol, diethylstilboestrol or zearalenone in avian muscle tissue extracts. **Food Add. Contam.** 3(3): 263-272, 1986.

MICCO, M.; BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; ONORI, R. HPLC determination of the total content of aflatoxins in naturally contaminated eggs in free and conjugated forms. **Food Add. Contam.** 4(4): 407-414, 1987.

- MICCO, C.; GROSSI, M.; ONORI, R.; CHIRICO, M.; BRERA, C.
Aflatossina B₁, ocratossina A e zearalenone in mais nazionale: monitoraggio della produzione relativa agli anni 1982, 1983 e 1984. **La Rivista della Societa Italiana di Scienza dell Alimentazione** 15 (3):113-116, 1986.
- MICCO, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L.; ONORI, R.; IOPPOLO, A.; MANTOVANI, A.L. Long term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 2. Residues of ochratoxin A and aflatoxins in broilers and laying hens after combined administration of ochratoxin A and aflatoxin B₁. **Food Add. Contam.** 5(3): 309-314, 1988a.
- MICCO, C.; MIRAGLIA, M.; ONORI, R.; BRERA, C.; MANTOVANI, A. L.; IOPPOLO, A.; STASOLLA, D. Long term administration of low doses of mycotoxins to poultry. I. Residues of aflatoxin B₁ and its metabolites in broilers and laying hens. **Food Add. Contam.** 5(3): 303-308, 1988b.
- MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; CHRISTENSEN, C.M. Zearalenone. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE C. W.; MEHLMAN, M. A. ed. **Mycotoxins in human and animal health**. Pathotox Publish., Park Forest South, 1977. p. 345-364.
- MUNRO, I.C.; SCOTT, P.M.; MOODIE, C.A.; WILLES, R.F. Ochratoxin A - occurrence and toxicity. **J. Amer. Veterinary Medical Association** 163(11): 1269-1273, 1973.
- NGILORITI, E.M. & KROLL, J. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal tissues. **Nahrung** 34(1): 97-98, 1990.
- OLSEN, M.E.; PETTERSON, H.I.; SANDHOLM, K.A.; KIESSLING, K.-H.C. Quantitative liquid chromatographic method using fluorescence detection for determining zearalenone and its metabolites in blood plasma and urine. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 68: 632-635, 1985.

- PARK, D.L. & NJAPAU, H. Contamination issues, technology. **J.A. O.C.S.** 66(10): 1402-1407, 1989.
- PATTERSON, D.S.P. Metabolic activation and detoxification of mycotoxins. **Ann. Nutr. Alim.** 31: 901-910, 1977.
- PHILLIPS, T.D.; STEIN, A.F.; IVIE, G.W.; KUBENA, L.F.; HAYES, A.W.; HEIDELBAUGH, N.D. High pressure liquid chromatographic determination of an O-methyl, methyl ester derivative of ochratoxin A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 66(3): 570-576, 1983.
- PRELUSKY, D.B.; SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; LAWRENCE, G.A. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. **J. Environ. Sci. Health.** B25(1): 87-103, 1990.
- PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 58(1): 163-164, 1975.
- QIAN, G.S. & YANG, G.C. Rapid extraction and detection of aflatoxins B₁ and M₁ in beef liver. **J. Agric. Food Chem.** 32(5): 1071-1073, 1984.
- RODRICKS, J.V. & STOLOFF, L. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food-producing animals. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE C. W.; MEHLMAN, M. A. ed. **Mycotoxins in human and animal health.** Pathotox Publish., Park Forest South, 1977. p. 67-79.
- ROMER, T.R. Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 58(3): 500-506, 1975.

- ROYBAL, J.G.; MUNNS, R.K.; MORRIS, W.J.; HURLBUT, J.A.; SHINODA, W. Determination of zearanol/zearalenone and their metabolites in edible animal tissue by liquid chromatography with eletrochemical detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71(2): 263-271, 1988.
- RUTQVIST, L.; BJORKLUND, N.-E.; HULT, K.; HOKBY, E.; CARLSSON, B. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. **Appl. Environ. Microbiol.** 36(6): 920-925, 1978.
- SABINO, M. Aflatoxinas B₁, M₁ e aflatoxicol: Extração e caracterização em tecidos e urina. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos. 1990.
- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O.; GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Add. Contam.** 6(3): 327-331, 1989.
- SAWHNEY, D.S.; VANDHERA, D.V.; BAKER, R.C. The metabolism of ¹⁴C aflatoxins in laying hens. **Poultry Sci.** 52: 1302-1309, 1973.
- SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; SILVA, J.B.; ALMEIDA, C.A.A. Análise de micotoxinas em rações para consumo animal: Resultados 1988 - 1989. **Encontro Nacional de Micotoxinas 6**. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1990. Programa e resumos dos trabalhos apresentados. p. 25
- SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; SILVA, J.B.; BRONDANI, E.R. Detecção de aflatoxinas em rações para consumo animal: Resultados de 1987. **Rev. Centro de Ciências Rurais, Santa Maria** 18(2): 169-175, 1988.

- SANTURIO, J.M. Micotoxinas em animais no estado do Rio Grande do Sul. **Encontro Nacional de Micotoxinas 6**. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1990. Programa e resumos dos trabalhos apresentados. p. 9-10.
- SCHIEFFER, H.B. Pathology of mycotoxicoses: Possibilities and limits of diagnosis. **Pure Appl. Chem.** 58(2): 351-356, 1986.
- SCOTT, P.M. Methods for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products - a review of performance characteristics. **Food Add. Contam.** 6(3): 283-305, 1989.
- SCOTT, P.M. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. **Journal of Food Protection** 41(5): 385-398, 1978.
- SCOTT, P.M. Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed. Arlington, A.O.A.C., 1990. v.2 cap. 49 p. 1184-1223.
- SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; CANELA, R.; LOMBAERT, G.A.; BACLER, S. Determination of ochratoxin A in meat by liquid chromatography. **Prehrambeno-technol. Biotechnol Rev.** 29(2): 61-64, 1991.
- SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Liquid chromatographic determination of zearalenone and alpha and beta zearalenols in milk. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71(6): 1176-1179, 1988.
- SHOTWELL, O.L.; BENNETT, G.A.; GOULDEN, M.L.; PLATTNER, R.D.; HESSELTINE, C.W. Survey for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin in U.S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 63(4): 922-926, 1980.

- SHREEVE, B.J.; PATTERSON, D.S.P.; ROBERTS, B.A. The carry-over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues urine and milk of dairy cows. **Food Cosm. Toxicol.** 17: 151-152, 1979.
- SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 72(1): 22-25, 1989.
- STAHR, H.M.; DOMOTO, M.; ZHU, B.L.; PFEIFFER, R. Chemical analysis for ochratoxin poisoning. **Mycotoxin Research** 1(1): 31-35, 1985.
- STOLOFF, L. Aflatoxins - an overview. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE C.W.; MEHLMAN, M.A. ed. **Mycotoxins in human and animal health**. Pathotox Publish., Park Forest South, 1977. p. 7-28.
- STOLOFF, L. & TRUCKSESS, M.W. Distribution of aflatoxins B₁ and M₁ in contaminated calf and pig livers. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 62 (6): 1361-1362, 1979.
- STUBBLEFIELD, R.D. Stability and molar absortivity of aflatoxin M₁ in acetonitrile-benzene (1+9). **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 63 (3): 634-636, 1980.
- STUBBLEFIELD, R.D. Optimum conditions for formation of aflatoxin M₁-trifluoroacetic acid derivative. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 70 (6): 1047-1049, 1987.

- STUBBLEFIELD, R.D.; KWOLEK, W.F.; STOLOFF, L. Determination and thin layer chromatographic confirmation of identity of aflatoxins B₁ and M₁ in artificially contaminated beef livers: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 65 (6): 1435-1444, 1982.
- STUBBLEFIELD, R.D. & SHOTWELL, O.L. Determination of aflatoxins in animal tissues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64 (4): 964-968, 1981.
- STUBBLEFIELD, R.D.; SHOTWELL, O.L.; RICHARD, J.L.; PIER, A.C. Transmission and distribution of aflatoxins in contaminated beef liver and other tissues. **J.A.O.C.S.** December: 1015A-1017A, 1981.
- TAKEDA, Y.; ISOHATA, E.; AMANO, R.; UCHIYAMA, M. Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 62(3):573-578, 1979.
- TESHIMA, R.; KAWASE, M.; TANAKA, T.; HIRAI, K.; SATO, M.; SAWADA, J.; Ikebushi, H.; Ichinoe, M.; Terao, T. Production and characterization of a specific monoclonal antibody against mycotoxin zearalenone. **J. Agric. Food Chem.** 38: 1618-1622, 1990.
- TRENHOLM, H.L. & WANDER, R.M. High performance liquid chromatographic method using fluorescence detection for qualitative analysis of zearalenone and zearalenol in blood plasma. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64:302-10, 1981.
- TRENHOLM, H.L.; WANDER, R.M.; FARNWORTH, E.R. Gas chromatographic detection of the mycotoxin zearalenone in blood serum. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 63: 604-11, 1980.

- TRENK, H.L. & CHU, F.S. Improved detection of ochratoxin A on thin layer plates. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 54 (6): 1307-1309, 1971.
- TRUCKSESS, M.W. & STOLOFF, L. Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxins B₁ and M₁ in beef liver. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 62(5): 1080-1082, 1979.
- TRUCKSESS, M.W. & STOLOFF, L. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxicol in milk, blood and liver. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(5): 1083-1087, 1981.
- TRUCKSESS, M.W.; STOLOFF, L.; BRUMLEY, W.C.; WILSON, D.N.; HALE, O.M.; SANGSTER, L.T.; MILLER, D.M. Aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in the tissues of pigs receiving aflatoxinis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 65(4): 884-7, 1982.
- TRUCKSESS, M.W.; STOLOFF, L.; PONS Jr., W.A.; CUCULLU, A.F.; LEE, L.S.; FRANZ Jr., A.O. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin B₁ in eggs. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 60(4): 795-798, 1977.
- TRUCKSESS, M.W.; STOLOFF, L.; YOUNG, K. Aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. **Poultry Science** 62: 2176-2182, 1983.
- TUINSTRAL, L.G.M.T. & BRONSGEEST, J.M. Determination of aflatoxin M₁ in the milk at parts per trillion level. **J. Chromatography** 111(2): 448-451, 1975.
- TURNER, G.V.; PHILLIPS, T.D.; HEIDELBAUGH, N.D.; RUSSEL, L.H. High pressure liquid chromatographic determination of zearalenone in chicken tissues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 66(1): 102-104, 1983.

- TYCZKOWSKA, K.; HUTCHINS, J.E.; HAGLER Jr., W. M. Liquid chromatographic determination of aflatoxicol in porcine liver. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 70(3): 475-478, 1987.
- UENO, Y.; AYAKI, S.; SATO, N.; ITO, T. Fate and mode of action of zearalenone. **Ann. Nutr. Aliment.** 31: 935-948, 1977.
- VAN EGMOND, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. **Food Addit. Contam.** 6(2): 139- 188, 1989.
- VAN EGMOND, H.P. & PAULSCH, W.E. Determination of mycotoxins. **Pure Appl. Chem.** 58(2): 315-326, 1986.
- VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E.; SCHULLER, P.L. Confirmatory test for aflatoxin M₁ on a thin layer plate. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 61(4): 809-812, 1978.
- VAN EGMOND, H.P. & STUBBLEFIELD, R.D. Improved method for confirmation of identity of aflatoxins B₁ and M₁ in dairy products and animal tissue extracts. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(1): 152-155, 1981.
- VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. **J. Chem. Soc.** 7083-7088, 1965.
- VELASCO, J. Replacement of benzene as a solvent for aflatoxin standards. **J.A.O.C.S.** December: 938A-940A, 1981.
- WEI, R.D. & LEE, S.S. Binding of aflatoxins B₁ and G₁ to human serum proteins. **Experientia** 27(4):458-460, 1971.

- WERNIMONT, G.T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods.** Arlington. Association of Official Analytical Chemists, 1985. 183 p.
- WILKEN, C.; BALTES, W.; MEHLITZ, I.; TIEBACH, R.; WEBER, R. A method for determining ochratoxin A in pork kidneys. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung** 180: 496-497, 1985. Traduzido do alemão.
- WOGAN, G.N. Mode of action of aflatoxins. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE C.W.; MEHLMAN, M.A. ed. **Mycotoxins in human and animal health.** Pathotox Publish., Park Forest South, 1977. p. 29-36.
- WOLZAK, A.; PEARSON, A.M.; COLEMAN, T.H.; PESTKA, J.J.; GRAY, J.I.; CHEN, C. Aflatoxin carryover and clearance from tissues of laying hens. **Food Chem. Toxicol.** 24(1): 37-41, 1986.
- ZHU, J.; ZHANG, L.; HU, X.; XIAO, Y.; CHEN, J.; XU, J.; FREMY, J.; CHU, F.S. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. **Cancer Research** 47: 1848-1852, 1987.