

## Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2.

### Procedure for simultaneous determination of trichothecenes: deoxynivalenol and T-2 toxin.

Edilira BARAJ<sup>1</sup>  
Eliana BADIALE-FURLONG<sup>1\*</sup>

RIALA6/945

Baraj, E. ; Badiale-Furlong, E. - Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 95 - 104,2003.

**RESUMO.** Os tricotecenos são um grupo de micotoxinas sesquiterpenóides produzidas por várias espécies de fungos, como *Fusarium*, *Stachybotris*, *Trichothecium*, *Trichoderma* e *Myrothecium*. Estes tricotecenos são relativamente estáveis aos principais processos e dificilmente são removidos dos grãos contaminados sob condições moderadas. O desoxinivalenol (DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado. Outro é a toxina T-2, um tricoteceno do grupo A, freqüentemente encontrado em cereais, que tem sido bastante estudado por ser dez vezes mais tóxico que o DON. No presente trabalho, foi adaptado e avaliado um método para determinação simultânea da toxina T-2 e de DON por cromatografia de camada delgada (ccd). A matriz empregada para o desenvolvimento do procedimento foi o malte cervejeiro. Foram estudados sistemas de extração e purificação dos extrato, eluentes e agentes reveladores. Posteriormente o método foi aplicado em amostras de arroz e farinha de trigo. O limite de detecção do método foi de 40 ng/ mancha para toxina T-2 e 50 ng/ mancha para DON; a recuperação média foi de 77,9% e 80,5%, respectivamente para cada toxina. Foram detectadas contaminadas uma amostra de arroz branco com 266µg. Kg<sup>-1</sup> e duas de farinha de trigo com 128 e 323 µg. Kg<sup>-1</sup> de DON.

**PALAVRAS-CHAVE.** desoxinivalenol, toxina T-2, determinação de tricotecenos, ccd

\*Endereço para correspondência:

<sup>1</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande- Laboratório de Micotoxinas  
Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475  
96201-900 - Rio Grande, RS  
email: dqmebf@super.furg.br

## INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por vários gêneros de fungos, tais como *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon* e *Trichothecium*, de onde vem o nome da família de toxinas<sup>18</sup>. Espécies do gênero *Fusarium* são as que mais freqüentemente estão relacionadas com a ocorrência de tricotecenos em cereais e seus derivados, e podem contaminar a planta ou o grão no período pré e pós-colheita. Os tricotecenos podem ocasionar perda de apetite, vômito, diarreia e alterar as funções dos sistemas neurológico e imunológico<sup>18</sup>.

Quimicamente os tricotecenos são derivados de um sistema aromático, chamado tricotecano (Figura 1). Os que ocorrem na natureza contem uma ligação olefínica no C- 9,10 e também um anel epóxi em C-12,13, o que lhes confere a denominação de “12, 13 epoxitricotecanos”. Geralmente, os átomos de carbono em posições 3, 4, 7, 8, 14 e 15 são ocupados por hidrogênio, hidroxila, grupamentos acila, epóxido adicional ou ligações éster macrocíclicas. Em função dos substituintes são classificados em 4 grupos com diferentes propriedades físico-químicas e toxicidade. O desoxinivalenol (DON) é o tricoteceno mais freqüentemente detectado em alimentos, pertencente ao grupo B. Outro é a toxina T-2, um tricoteceno do grupo A, freqüentemente encontrado em cereais, que tem sido amplamente estudado por ser dez vezes mais tóxica que o DON<sup>2, 16</sup>.

Desde que os tricotecenos foram reconhecidos como contaminantes importantes no meio ambiente e dos alimentos, foram propostos diferentes métodos para a análise destes compostos. Como ocorre com outras micotoxinas os métodos cromatográficos são importantes para identificação e quantificação dos diferentes tricotecenos da família. Devido a falta de cromóforo na estrutura os métodos espectroscópicos, especificamente os colorimétricos e fluorimétricos não podem ser usados diretamente para determinação quali ou quantitativa deles, tornando-se necessário o uso de reagentes de derivação<sup>12, 17</sup>.

Na literatura se encontram várias técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência, de camada delgada e gasosa combinando procedimentos de derivação química para desenvolvimento de propriedades cromóforas ou para aumentar a volatilidade para a detecção e quantificação de tricotecenos<sup>10, 12, 16, 17</sup>.

As técnicas que empregam cromatografia de camada delgada são as mais simples, e se operadas cuidadosamente apresentam boa performance e permitem a determinação destas toxinas de maneira acessível para laboratórios com diferentes tipos de infraestrutura<sup>11, 24</sup>, o que também vem sendo incentivado pela FAO e FDA. No caso dos tricotecenos a determinação simultânea de compostos de diferentes grupos é um desafio para analistas, pois as diferenças estruturais requerem combinações de solventes extratores e reagentes derivadores

muito cuidadosas para evitar prejudicar a recuperação das toxinas dos diferentes grupos<sup>6, 16, 18</sup>.

A proposta deste trabalho foi disponibilizar um procedimento simples para a determinação simultânea de tricotecenos, desoxinivalenol e toxina T-2, respectivamente dos grupos A e B, empregando cromatografia de camada delgada. Para tal foram combinados procedimentos de extração e limpeza anteriormente empregados na determinação isolada e simultânea de tricotecenos tipo A e B, descritos por Scott<sup>17</sup> para determinação de tricotecenos em cromatografia gasosa; por Sabino<sup>14</sup> para determinação de desoxinivalenol; por Marochi et al.<sup>11</sup> para determinação de toxina T-2 e macrocíclicos, e Furlong et al.<sup>6</sup>, para determinação de tricotecenos do grupo A e B por cromatografia gasosa.

Para efetuar a adaptação do procedimento foram escolhidos amostras de malte provenientes de diferentes lotes cedidos por empresas importadoras, situadas na cidade de Rio Grande, RS. Posteriormente o procedimento desenvolvido foi aplicado em amostras de farinha de trigo e arroz integral, parboilizado e branco<sup>4, 12</sup>.

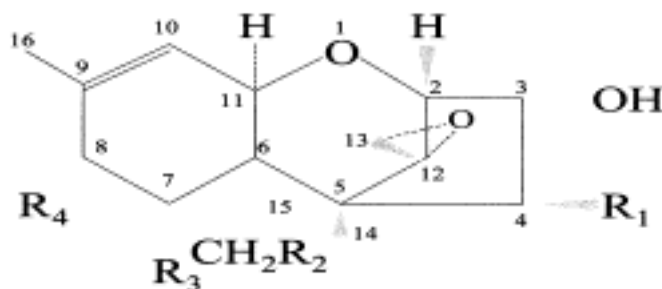


Figura 1: Estrutura geral dos tricotecenos

## MATERIALE MÉTODOS

### 1. Reagentes:

- Carvão ativo granulado: tamanho de partícula 1-2 mm marca Labsynth Brasil
- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> activ. 0,063-0,200 mm marca Merck.
- Celite comercial, pré-lavada com HCl, segundo a AOAC (1995)
- Sílicagel G60: tamanho de partícula 5-40 µm.
- Outros reagentes grau P.A.

### 2. Padrões

Os padrões de desoxinivalenol (DON) e toxina T-2 foram adquiridos da Sigma Chemical Company E.U.A.

As soluções estoques dos padrões foram preparadas dissolvendo-os em benzeno:acetonitrila (98:2), sendo a concentração de toxina T-2 20 µg . mL<sup>-1</sup> e de DON 50 µg . mL<sup>-1</sup>. A partir destas soluções foram preparadas soluções diluídas de trabalho. Todas foram armazenadas em frasco âmbar a temperatura - 5°C. Para avaliar as concentrações dos padrões foi empregado o método descrito por Bennett e Shotwell<sup>2</sup>, empregando a absorvidade molar das toxinas em benzeno.

### 3. Amostras empregadas na padronização da metodologia

As amostras de malte foram cedidas por indústria importadora localizada na cidade de Rio Grande, RS. Foram tomadas alíquotas de 4 lotes provenientes de diferentes países e levadas ao laboratório. Estas foram misturadas e moídas em moinho tipo de facas marca Tecnal. O material moído foi peneirado em vibrador por 1 hora, e a porção correspondente a granulometria de 60 mesh foi separada para ser empregada nos procedimentos para adaptação de metodologia.

### 4. Escolha do sistema solvente para eluição e separação dos tricotecenos e do agente revelador

Em placas cromatográficas comerciais e preparadas no laboratório, com e sem tratamento prévio com solução de cloreto de alumínio 15% em metanol, foram aplicadas alíquotas de 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 ng de solução padrão de DON e 40, 60, 100, 200 e 400 ng de toxina T-2.

Estas foram desenvolvidas em 5 sistemas solventes, sendo: tolueno- acetato de etila (1:3); clorofórmio - metanol (93:7); tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (5:4:1); clorofórmio - acetona - isopropanol (8:1:1) e tolueno - acetato de etila (2:3).

Após a eluição as placas foram submetidas a diferentes sistemas de revelação: cloreto de alumínio 15% em metanol 85%; ácido sulfúrico 20% em etanol 50% e ácido cromotrópico 10% com 5 partes de ácido sulfúrico 5 :3 em água.

Depois de borrifadas com os reveladores, as placas foram aquecidas em temperaturas 105°C por 10 minutos; 120°C por 10 minutos e 115°C por 7 minutos, respectivamente para cada

reagente revelador. As manchas de tricotecenos foram observadas sob luz ultravioleta em comprimento longo (354 nm)<sup>3,8,9,11,15,16,21,23</sup>. O critério utilizado para a escolha da condição cromatográfica a ser adotada foi o que resultou em menor limite de detecção de DON e toxina T-2 e separação das toxinas em relação a interferentes.

### 5. Escolha do procedimento de extração dos tricotecenos das amostras.

As amostras do malte para serem empregadas nesta etapa foram contaminadas artificialmente com 400 ng/g com DON e toxina T-2.

O primeiro procedimento testado para extração dos tricotecenos das amostras foi o descrito por Scott<sup>17</sup>, desenvolvido para determinação de nivalenol, desoxinivalenol, toxina T-2, toxina HT-2 e diacetoxiscirpenol em amostras de farinha de trigo e milho.

O outro procedimento testado foi descrito por Soares<sup>19</sup> para determinação de aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina e zearalenona em milho, feijão, mandioca, amendoim e arroz e posteriormente adaptado por Furlong et al<sup>6</sup> para determinação de tricotecenos em grãos de trigo.

Para avaliar o efeito dos diferentes agentes clarificantes e solventes de partição na extração de tricotecenos, foi empregado o método de análise fatorial, através de uma matriz de planejamento fatorial 3<sup>2</sup> (tabela 1).

**Tabela 1.** Planejamento fatorial 3<sup>2</sup> para o uso de solventes e clarificantes diferentes na extração de amostras de malte.

<i>Experimento</i>	<i>Clarificante</i>	<i>Solvente de partição</i>
1	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CHCl <sub>3</sub>
2	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +carvão ativo	CHCl <sub>3</sub>
3	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +CuCO <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>
4	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CHCl <sub>3</sub> +CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
5	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +carvão ativo	CHCl <sub>3</sub> + CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
6	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CuCO <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> + CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
7	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
8	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +carvão ativo	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
9	Celite+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CuCO <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

Os diferentes extratos foram purificados em minicolunas de carvão ativo/alumina/celite (0,7:0,5:0,3), eluídos com 4 porções de 5 mL do mesmo solvente de partição. O eluente foi seco em banho-maria à 30°C, quando usado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e à 40°C quando usado CHCl<sub>3</sub> ou CHCl<sub>3</sub>: acetato de etila, em todos os casos sob corrente de nitrogênio. Os extratos secos foram armazenados a -5°C e ressuspensos com 200µL de benzeno no momento de realização da cromatografia.

Foi utilizada uma escala de 1 a 9 para determinação da intensidade das manchas de interferentes nas placas, sendo a amostra mais limpa a de pontuação menor. As placas foram observadas antes e depois de revelação com ácido sulfúrico 20% em etanol 50% sob luz ultravioleta longo, sendo avaliadas e pontuadas por três avaliadores treinados.

#### 6. Recuperação de DON e toxina T-2

Considerando os dados de literatura<sup>1,9,14,16</sup> que indicam vários níveis de contaminação com estas toxinas, foi preparada uma série de amostras de malte contaminadas artificialmente, com alíquotas de padrões de DON e toxina T-2 em seis níveis diferentes (200, 350, 500, 650, 800 e 1000 ng/g). Para avaliação dos teores recuperados, foram realizadas comparações de fluorescência das manchas de amostras com padrões aplicados em placas de sílicagel com e sem prévia preparação com cloreto de alumínio, visualizadas sob luz ultravioleta longa, após a revelação.

A confirmação foi realizada empregando o método de acetilação com anidrido acético – piridina, descrito por Stahr et al<sup>20</sup>.

#### 7. Aplicabilidade do método proposto a outros tipos de amostras.

Após o estabelecimento do procedimento de preparo, extração, clarificação e separação dos tricotecenos DON e toxina T-2 este foi aplicado a amostras de farinha de trigo, arroz branco, parboilizado e integral. Nestas foram testados os limites de quantificação, recuperação e realizados levantamentos de ocorrência em amostras adquiridas no comércio local.

Três marcas de farinha de trigo, disponíveis no comércio da cidade de Rio Grande, RS, foram coletadas nos anos de 2000

a 2002 em diferentes estações do ano. A coleta delas seguiu um protocolo que consistiu em tomar 1% dos pacotes de 1 Kg disponível nas gôndolas, de diferentes estabelecimentos comerciais, para comporem a amostra bruta. Destes 1% foram tomadas e homogeneizadas para constituindo as amostras de laboratório de onde foram tomadas as alíquotas analíticas. Foram avaliadas 112 amostras de farinha<sup>5</sup>.

O mesmo procedimento de amostragem foi realizado para três marcas de arroz branco, parboilizado e integral, levando em consideração a safra ao qual pertencia o produto comercializado. Foram analisadas 36 amostras de arroz branco, 18 parboilizado e 9 integral. Antes da determinação os grãos foram moídos em moinho de facas até a granulometria de 60 mesh<sup>12</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Escolha do eluente e do agente revelador

Avaliando os cinco sistemas solventes experimentados para separar o DON e a toxina T-2 observou-se os melhores resultados ocorriam quando foram empregados: tolueno - acetato de etila (2:3) e tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (5:4:1), como já haviam mencionado Marochi et al<sup>11</sup>.

Os outros sistemas testados não se mostraram eficientes. Os resultados dos limites de detecção determinados nos diferentes eluentes e agentes reveladores e os respectivos Rf aparecem especificados na tabela 2.

Pode-se observar que houveram duas condições que apresentaram as melhores respostas: usando a placa embebida em solução de cloreto de alumínio 15% empregando como eluente uma mistura de tolueno - acetato de etila (2:3), revelada posteriormente com ácido cromotrópico para determinação de toxina T-2 e o outro usando placa de sílicagel desenvolvida num sistema solvente tolueno - acetato de etila - ácido fórmico revelada com solução de ácido sulfúrico 20% em etanol 50%. Cabe salientar que esta segunda opção apresenta um custo mais baixo e que o ponto crítico é a relação tempo / temperatura durante a revelação.

**Tabela 2.** Sistemas solventes e agentes reveladores para determinação simultânea de DON e toxina T-2 por CCD e seus limites de detecção.

<i>Tricoteceno</i>	<i>Revelador</i>	<i>Sistema solvente</i> <sup>2</sup>	<i>Luz UV (365nm)</i>		<i>Luz Visível</i>		<i>R<sub>f</sub></i>	
			<i>Ld</i> (ng/mancha)	<i>Cor</i>	<i>Ld</i> (ng/mancha)	<i>Cor</i>		
DON	AlCl <sub>3</sub>	1	150	Azul	ND		0,19	
		2	100	Azul	ND		0,15	
		3	100	Azul	ND		0,13	
		4	50	Azul	ND		0,12	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	50	Marrom-	50	Marrom	0,29	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	100	amarelado	150	Marrom	0,90	
				Marrom claro				
T-2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (em placa de AlCl <sub>3</sub> )	1	100	Verde	ND		1	
		2	ND		ND			
		4	100	Verde	ND		0,45	
			3	40	Verde-azulado	100	Cinza	0,54
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	100	Verde-azulado	ND		0,60	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	40	Verde	100	Púrpura	0,45	
	Ác.Cromotrópico (em placa de AlCl <sub>3</sub> )	3	60		ND		0,55	
		Ác.Cromotrópico			Púrpura			

Ld: limite de detecção \* 1. Tolueno-acetato de etila (1:3); 2. CHCl<sub>3</sub>:metanol (93:7); 3. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1); 4. Tolueno:acetato de etila (2:3); 5. CHCl<sub>3</sub>:acetona:isopropanol (8:1:1). ND- não detectado

## 2. Escolha do clarificante e solvente de partição.

Conforme mencionado, primeiramente foram comparados os procedimentos de Scott<sup>17</sup> e de Soares<sup>19</sup> para a extração, pois são procedimentos simples, com poucas etapas e que empregam pequenas quantidades de solventes. No caso do primeiro, que já havia sido empregado para determinação simultânea dos tricotecenos do grupo A e B, algumas dificuldades foram observadas tais como: formação de emulsão, evaporação demorada na etapa final, formação de gel na etapa de minicolunas, dificuldade de ressuspensão dos extratos, o que descartou o seu emprego.

Durante a aplicação do procedimento de Soares<sup>19</sup> para extração de tricotecenos das amostras de malte, foi observado que os extratos apresentavam compostos que interferiam na determinação de DON e toxina T-2 por cromatografia de camada delgada. Alguns interferentes ocorriam na altura do R<sub>f</sub> da última toxina o que foi solucionado desengordurando previamente as amostras com hexano.

Seguindo a matriz de planejamento (tabela 1) os extratos foram ressuspensos em 200 µL de benzeno, 20 µL foram aplicados em placa de silicagel e desenvolvidas em tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1). Os resultados da avaliação da limpeza das placas pelos diferentes avaliadores antes e depois da revelação aparecem respectivamente nas tabelas 3 e 4 para placas preparadas no laboratório e comerciais.

A observação dos resultados descritos na tabela indica que as melhores condições nestas duas etapas são o uso de clorofórmio ou cloreto de metileno como solvente de partição e de sistema celite-sulfato de amônio como agente clarificante. O mesmo sistema também foi empregado por Furlong et al<sup>6</sup>. Ao contrário de Marochi et al<sup>11</sup> também neste caso o carbonato de cobre não acarretou melhora na limpeza das placas e por isso não foi utilizado. O cloreto de metileno foi escolhido por sua maior volatilidade que facilita nesta etapa do trabalho.

**Tabela 3.** Pontuação da intensidade dos interferentes nas amostras de malte antes da revelação ( média em dois tipos de placas)

Experimento	Placa 1 *	Placa 2 *	Média **
1	4,00	3,67	3,84
2	5,00	5,00	5,00
3	6,33	4,33	5,33
4	5,33	4,33	4,83
5	6,33	5,00	5,67
6	7,33	6,67	7,00
7	1,33	1,33	1,33
8	2,67	3,00	2,84
9	1,33	1,33	1,33

Placa 1: preparada com sílicagel G-60  
\* média de três avaliadores

Placa 2: placa pronta Wathman 0,25 mm  
\*\* média da pontuação das duas placas

**Tabela 4.** Pontuação da intensidade dos interferentes depois da revelação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (média em dois tipos de placas)

Experimento	Placa 1 *	Placa 2 *	Média**
1	1,33	2,33	1,73
2	4,33	4,67	4,50
3	4,33	4,33	4,33
4	6,33	6,67	6,50
5	7,00	7,00	7,00
6	6,67	7,67	7,17
7	2,33	2,33	2,33
8	4,67	5,33	5,00
9	2,33	3,67	3,00

Placa 1: preparada com sílicagel G-60  
\* média de três avaliadores

Placa 2: placa pronta Wathman 0,25 mm  
\*\* média da pontuação das duas placas

3. Procedimento Proposto para determinação simultânea de DON e toxina T-2 no malte.

O procedimento que melhor se prestou para determinação simultânea de DON e toxina T-2 nas amostras do malte cervejeiro foi o procedimento de Soares com as modificações mencionadas. Todas as etapas estão apresentadas em seguir:

1) Extrair 50 g de amostra do malte desengordurado com 300 mL de mistura metanol-KCl 4% (9:1) em blender com velocidade média por 3 minutos.

2) Filtrar em papel de filtro sanfonado. Transferir uma alíquota de 150 mL de filtrado para um bequer contendo 150 mL de solução de sulfato de amônia 30% e 50 cm<sup>3</sup> de celite pré-lavada com ácido. Homogeneizar com bastão de vidro e deixar em repouso por mais de 5 minutos.

3) Filtrar novamente em papel de filtro sanfonado. Transferir 150 mL deste segundo filtrado para um funil de separação contendo 150 mL de água destilada. Adicionar 10 mL de cloreto de metileno (ou clorofórmio).

4) Efetuar a partição agitando lentamente por 3 minutos. Deixar em repouso por mais 10 minutos para separar as camadas. Recolher a fase orgânica num bequer. Retirar uma alíquota de 5 mL (amostra para quantificação) e passá-la por uma minicoluna de carvão ativo-alumina-celite (0,7:0,5:0,3). Receber o eluato num frasco. Guardar o resto da solução do bequer (amostra para triagem) num segundo frasco.

5) Repetir a partição com mais 10 mL de cloreto de metileno (ou clorofórmio). Recolher a fase orgânica no outro bequer. Retirar de novo 5 mL e passar por minicoluna.

6) Eluir a minicoluna com 4x5 mL de solvente de partição, juntando todas as porções no primeiro frasco.

7) Evaporar o cloreto de metileno em banho-maria à 30°C (ou cloroformio à 40°C) sob corrente de nitrogênio. Guardar o extrato seco no frasco fechado a temperatura -5°C.

8) Ressuspender o extrato com 200µL de benzeno e agitar em banho ultra-sônico. Este extrato está pronto para aplicação em placas cromatográficas.

9) Aplicar na placa de silicagel (simples ou embebida em solução de AlCl<sub>3</sub> 15% em metanol 85%) 10 µL do extrato final da amostra e quantidades de padrões de DON e toxina T-2, correspondente a possível contaminação de amostra.

10) Desenvolver a placa simples no sistema solvente tolueno:acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1) e a placa embebida em AlCl<sub>3</sub> em sistema solvente tolueno:acetato de etila (2:3).

11) Secar a placa à temperatura ambiente dentro da capela.

12) Revelar a primeira placa com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% em etanol 50% e aquecer à 120°C por 10 minutos. Observar sob luz UV, comprimento de onda longo, as manchas marrom de DON aproximadamente em R<sub>f</sub> ≈ 0,29 e as manchas fluorescentes esverdeadas da toxina T-2 aproximadamente em R<sub>f</sub> ≈ 0,54. Sob luz visível as manchas da toxina T-2 aparecem de cor cinza.

13) Aquecer a placa embebida em AlCl<sub>3</sub> por 10 minutos à 105°C. Observar sob luz UV as manchas fluorescentes azuis de DON em R<sub>f</sub> ≈ 0,12 aproximadamente. Revelar a região da toxina T-2 com ácido cromotrópico e aquecer à 120°C por 7 minutos. Observar as manchas fluorescentes verdes desta toxina sob luz UV, comprimento de onda longo em R<sub>f</sub> ≈ 0,45.

**Tabela 5.** Resultados de testes de recuperação de DON e T-2 em seis níveis de contaminação de amostras de malte desengordurado.

	Contaminação (ng/g)	% recuperação	
		DON	toxina T-2
1	200	40,8	81,6
1	200	40,8	81,6
2	350	69,9	93,9
2	350	70,0	93,3
3	500	81,6	65,3
3	500	65,3	65,3
4	650	87,9	67,6
4	650	87,9	67,8
5	800	81,6	75,5
5	800	81,6	75,5
6	1000	97,9	83,4
6	1000	89,8	89,8
6	1000	97,9	80,0
6	1000	73,5	88,2

#### 4. Recuperação de tricotecenos das amostras do malte

As amostras do malte moído, desengordurado e não contaminado, foram fortificadas com padrões de DON e toxina T-2 em seis níveis diferentes (200, 350, 500, 650, 800 e 1000 ng/g). Foi empregado o procedimento estabelecido para a extração dos tricotecenos e os padrões foram aplicados nas placas nas concentrações mencionadas em material e métodos (item 6).

Os resultados de recuperação dos tricotecenos DON e toxina T-2 em todos os níveis estudados, aparecem na tabela 5, onde estão os resultados das aplicações feitas nas placas pré-prontas de silicagel ou nas placas de silicagel embebidas em solução de AlCl<sub>3</sub> 15% em metanol, respectivamente.

Pode-se observar pela tabela 5 e considerar que houve uma boa recuperação das duas toxinas, sendo que para os níveis de contaminação mais baixos, a toxina T-2 foi melhor recuperada, enquanto que para os níveis mais altos, foi o DON que mostrou valores mais altos de recuperação.

Os valores médios de recuperação foram 80,55% para o DON e 77,94 para a toxina T-2. Cabe salientar que para a estimativa do valor médio da recuperação de DON não foi considerado o nível de contaminação 200 ng/g, que foi 41%.

O maior nível de contaminação foi utilizado para estimar a repetibilidade do procedimento, tendo um coeficiente de variação de 7,3% e 7,2% respectivamente para DON e toxina T-2. Esta estimativa realizada nos diferentes níveis de contaminação estudados resulta em coeficientes de variação para DON de 23,6% e de 12,3% para toxina T-2

Alguns fatores podem influenciar nestes resultados. Primeiro, provavelmente as toxinas competem entre si pelos solventes de extração e separação. Um maior número de partições poderia realizar uma recuperação maior.

Outro fator pode ser a minicoluna utilizada para limpeza do extrato. Foram utilizadas minicolunas de carvão ativo: alumina: celite (0,7:0,5:0,3), que são recomendadas por muitos autores para estas determinações<sup>10,13,15,24</sup>. Mas, segundo um estudo de Galvano et al<sup>7</sup>, com 19 tipos de carvão ativo, foi observado que a capacidade deles para adsorção do DON varia de 1,83% a 98,93%. Os tipos utilizados pelo autor e colaboradores não foram Darco G-60, que é o carvão utilizado para preparação das minicolunas de limpeza neste caso. Mesmo assim, é muito provável que o carvão ativo Darco G-60 adsorva uma quantidade do DON. Este efeito é notável nos níveis baixos de contaminação. Seria interessante utilizar outro tipo de coluna de limpeza, principalmente para determinações quantitativas nos níveis menores que 300 ng/g.

O terceiro fator que pode causar este grau de recuperação, principalmente para o DON, é o tipo do solvente utilizado para ressuspender o resíduo. Tanaka et al<sup>22</sup> mostraram que a melhor recuperação do DON e NIV das amostras artificialmente contaminadas do arroz, foi obtida usando o metanol como solvente de ressuspensão do extrato seco, enquanto que a menor recuperação para o NIV obteve-se utilizando a mistura CHCl<sub>3</sub>/metanol (9:1). No nosso experimento foi utilizado o benzeno, o mesmo

**Tabela 6.** Determinação de tricotecenos do grupo A e B em arroz e farinha de trigo

Característica	Farinhas de Trigo	Arroz
Recuperação média de DON % (200 a 1000 ng/g)	90	77
Recuperação média de Toxina T-2 (200 a 1000 ng/g)	87	79
Repetibilidade DON, toxina T-2 (CV%)	17	11 e 10
Nº amostras analisadas	112	72
Falsos positivos	6(DON) 7(T-2)	2 (DON) 3 (T-2)
Amostras confirmadas	2 (DON)	1 (DON)
Níveis de contaminação µg . Kg <sup>-1</sup>	323 e 128	266

## CONCLUSÃO

solvente de preparação dos padrões, por ele mostrar estabilidade maior no armazenamento das amostras. Por outro lado o benzeno ainda permite uma melhor aplicação nas placas cromatográficas, comparando com o metanol, o qual deixa uma mancha muito espalhada (Soares - comunicação pessoal).

### 5. Aplicabilidade do método a outros produtos alimentícios

O procedimento descrito foi checado quanto ao limite de quantificação, recuperação e repetibilidade em amostras de farinhas de trigo, de três marcas comerciais diferentes, coletadas em diferentes períodos nos anos de 2000 a 2002 e em amostras de arroz integral, parboilizado e branco coletados no ano 2000, no comércio da cidade de Rio Grande, RS.

Os resultados destas atividades aparecem na tabela 6.

Pode-se observar pela tabela que a performance do método não diferiu entre as matrizes em que foi aplicado. Cabe salientar que o número de amostras contaminadas por tricotecenos, desoxinivalenol e toxina T-2 foi relativamente pequeno e abaixo dos limites legislado por países da Comunidade Européia para estas toxinas<sup>26</sup>.

Foi proposto um procedimento para determinação simultânea de tricotecenos do grupo A e B, desoxinivalenol e toxina T-2, cujas melhores condições foram obtidas empregando como sistema extrator metanol - KCl (3:1), clarificante sulfato de amônio e limpeza em minicoluna de carvão ativo - celite e alumina. A fase estacionária foi a sílica-gel G 60, 0, 25 mm de espessura; eluentes foram o tolueno - acetato etila - ácido fórmico (5:4:1) e tolueno - acetato de etila (2:3). Os melhores agentes reveladores foram: ácido sulfúrico 20% em etanol 50% e cloreto de alumínio 15% em metanol 85% e ácido cromotrópico.

O limite de detecção para a toxina T-2 foi de 40 ng/mancha e para DON de 50 ng/mancha. A avaliação da recuperação média para os níveis de contaminação variando de 200 a 1000 ng/g foi de 80,5% e 77,9% respectivamente para malte.

O método aplicado a amostras de arroz e de farinha de trigo mostrou ter boa repetibilidade (CV 11 e 17%) e recuperação entre 90 e 77% respectivamente para DON e T-2, e um número baixo de falsos positivos (9,7%).

O DON foi o único tricoteceno detectado, aparecendo em 1,6% amostras, sendo duas de arroz e uma de farinha de trigo em níveis respectivamente de 128, 323 e 266 mg/Kg.



Baraj, E. ; Badiale-Furlong, E. - Procedure for simultaneous determination of tricothecenes: deoxynivalenol e T-2 toxin. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 95 - 104,2003.

**ABSTRACT.** The tricothecenes are a group of sesquiterpenoid mycotoxins produced by several general and species of fungi such as *Fusarium*, *Stachybotris*, *Trichothecium*, *Trichoderma* and *Myrothecium*. These tricothecenes are relatively stable during food processing and can be removed with difficulty from contaminated grains under moderate conditions. Among then deoxynivalenol (DON) is the most common contaminant of cereal grains, whilst the T-2 toxin, wich is frequently detected in foods, has been the most widely, because is 10 times more toxic then DON. In the present work it was adapted a methodology for simultaneous determination of DON and T-2 toxin by thin layer chromatography (TLC). The matrix chosen was barley malt. Extraction and purification systems, developing solvents and spray reagents used to visualize the tricothecenes have been compared. The method was employed to rice and wheat meals. The limits of detection of the method were 40 ng/spot for T-2 toxin and 50 ng/spot; with the average recoveries of 77,9 and 80,5% respectively. A rice sample was found contaminated with 266 µg. Kg<sup>-1</sup> and two samples of wheat meal with 128 e 323 µg. Kg<sup>-1</sup> DON.

**KEY WORDS.** deoxynivalenol, T-2 toxin, tricothecene determination, TLC

#### REFERÊNCIAS

1. Bata, A.; Ványi, A.; Lásztity, R. Rapid analytical method for the quantitative determination of tricothecene toxins in food and feeds. **Acta Veter. Hungar.**, 32 (1-2): 51-56, 1984.
2. Bennett, G. A.; Shotwell, O.L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73 (2): 270-5, 1990.
3. Betina, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **J. Chromatogr.**, 334: 211-276, 1985.
4. De Nijs, M.; et al. Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals grown in the Netherlands. **J. Food Prot.**, 59(7): 772-7, 1996.
5. Furlong, E.B.; et al. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Add. Contam.**, 12(5): 683-8, 1995.
6. Galvano, F.; et al. M. Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin a and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **J. Food Prot**, 61(4): 469-75, 1998
7. 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): 579-85, 1979.
8. Kamimura H., et al. Y. Simultaneous detection of several *fusarium* mycotoxins in cereals, grains and foodstuffs. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(5): 630-3, 1981.
9. Langseth, W.; Rundberget, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic tricothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **J. Chromatogr. A**, 1.815: 103-21, 1998.
10. Marochi, M.A.; Soares, L.M.V.; Furlani, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricothecenos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(2): 17-20, 1996.
11. Nunes, I. L. **Micotoxinas, micoflora e seu potencial toxigênico em arroz destinado ao consumo humano.** Rio Grande, RS, 2001, 95p [Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, FURG]
12. Romer, T.R. Use of small charcoal/alumina columns in determination of tricothecenes mycotoxins in foods and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 69(4): 699-703, 1986.
13. Sabino, M.; et al. Determinação de deoxynivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 49 (2): 155-9, 1989.
14. Schaafsma, A.W.; et al.. Analysis of *fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. **Mycopathology**, 142: 107-13, 1998.
15. Scott, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of tricothecenes in grains and grains products. **J. Assoc. Off Anal. Chem**, 65(4): 876-882, 1982.
16. Scott, P. M. Determination of nivalenol, deoxynivalenol (vomitoxin), T-2 toxin, HT-2 toxin and diacetoxyscirpenol in cereals by gas chromatography with electron capture detection. In: **Laboratory Procedures Of Health Protection Branch Laboratories** – Bureau of Chemical Safety- Ottawa, August, 1986.
17. Scott, P.M. Tricothecenes in grains. **Cereal Food World**, 35(7): 661-6, 1990.
18. Soares, L. M. V. **Micotoxinas: um método para análise**

- simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas, São Paulo.** Campinas, SP, 1987.[Tese de Doutorado Universidade Estadual De Campinas, Faculdade De Engenharia De Alimentos].
20. Stahr, H.M.; *et al.*. Analysis of trichothecenes mycotoxins. **Appl. Spectrosc.**, 37(4): 396-400, 1983.
  21. Takeda, Y.; *et al.* Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 62(3): 573-77, 1979.
  22. Takitani, S.; Asabe, Y. Thin layer chromatographic analysis of trichothecenes mycotoxins. In: Y.Ueno **Trichothecenes: Chemical, Biological And Toxicological Aspects.** Kodasha.Ltda, Tokyo, Elsevier- Amsterdam, Oxford, New York,1983. IV p. 113-20.
  23. Tanaka, T.; *et al.* Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecenes mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. **Food Addit. Contam.**, 2(2): 125-7, 1985.
  24. Tapia, M.O. A Quantitative thin layer chromatography method for the analysis of aflatoxins, ochratoxin a, zearalenone, T-2 toxin and sterigmatocystin in foodstuffs. **Rev. Argent. Microbiol.**, 17(4): 183-6, 1985.
  25. Trucksess, M., W.; Nesheim, S.; Eppley, R.M. Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 67(1): 40-3, 1984.
  26. Fonseca, H. **Legislação Mundial para Micotoxinas.** [Http://www.micotoxinas.br](http://www.micotoxinas.br), outubro de 2002.

Recebido em 16/12/2002 ; Aprovado em 15/05/2003