

# Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo

## Deoxynivalenol (DON) in wheat: occurrence in samples commercialized in the São Paulo city

RIALA6/1058

Leda C.A.LAMARDO<sup>1\*</sup>, Sandra A.NAVAS<sup>1</sup>, Myrna SABINO<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av.Dr.Arnaldo 355, CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil. e-mail:llamardo@ial.sp.gov.br  
 Recebido: 26/04/2006 – Aceito para publicação: 20/07/2006

### RESUMO

Vinte e oito amostras de farinha de trigo e 14 amostras de trigo em grão foram adquiridos na cidade de São Paulo e analisados para determinação de desoxinivalenol (DON). As amostras foram extraídas com acetone-tril-água (84+16) seguidas de limpeza dos extratos com colunas MycoSep. A separação e a quantificação foram pela técnica da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a toxina visualizada com solução de  $AlCl_3$ . A eficiência das colunas MycoSep 225 e 227 foi avaliada com amostras de farinha de trigo e trigo em grão, contaminadas com DON em dois níveis, 80,0 e 100,0  $\mu g/kg$ . As recuperações médias das colunas 225 e 227 foram, respectivamente, 72% e 107% para farinha de trigo e 90% e 125% para trigo em grão. Os desvios padrão relativos foram 11% e 18% para farinha de trigo e 8% e 20% para trigo em grão, respectivamente. DON foi detectado em 19 (45%) das 42 amostras analisadas em níveis que variaram de 82-1500  $\mu g/kg$ . Algumas amostras (8) foram confirmadas por CLAE-UV.

**Palavras- Chave.** desoxinivalenol, DON, trigo, micotoxinas.

### ABSTRACT

Twenty-eight samples of wheat flour and 14 samples of wheat were purchased in the city of São Paulo and these products were analyzed for deoxynivalenol (DON). Samples were extracted with acetonitrile-water (84+16) followed by a cleanup with MycoSep column. The extract purification was carried out on TLC and the toxin was determined with  $AlCl_3$  solution. The efficiency of MycoSep columns 225 and 227 was evaluated with samples of wheat and wheat flour spiked with DON at two levels, 80.0 and 100.0  $\mu g/kg$ . The recovery averages on columns 225 and 227 were, respectively, 72% and 107% for wheat flour and 90% and 125% for wheat grain, respectively. The relative standard deviations were 11% and 18% for wheat flour and 8% and 20% for wheat grain, respectively. DON was detected in 19 (45%) of 42 analysed samples at levels ranged from 82 to 1500  $\mu g/kg$ . Eight samples were confirmed by means of HPLC-UV.

**Key Words.** deoxynivalenol, DON, wheat, mycotoxins.

### INTRODUÇÃO

Micotoxinas são compostos químicos resultantes do metabolismo secundário de fungos filamentosos. Quando contaminam alimentos e rações animais produzem efeitos agudos (micotoxicoses) ou crônicos, e algumas das toxinas são carcinogênicas.

Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por diferentes gêneros de fungos tais como *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichotecium*, entre outros, sendo que estes fungos são também patógenos de plantas produtoras de grãos<sup>1</sup>.

Aproximadamente 180 diferentes compostos da família de tricotecenos já foram isolados, mas apenas alguns deles ocorrem naturalmente, como o desoxinivalenol (DON), o nivalenol, a toxina  $T_2$ , o diacetoxiscirpenol e a toxina  $HT_2^{2,3}$ . A grande variabilidade nas suas propriedades físico-químicas deste grupo de compostos causa dificuldades na sua detecção<sup>4,5</sup>.

Desoxinivalenol (DON) é um tricoteceno do grupo B, e um epoxisquisiterpenóide que ocorre predominantemente em grãos como trigo, milho, aveia e cevada e com menos frequência em arroz, sorgo e triticale. A ocorrência de DON é associada principalmente com *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) e *F. culmorum*. DON tem sido implicado na incidência de micotoxicoses humana e animais de criação<sup>6,7,8,9,10,11,12</sup>. Ele foi

primeiramente isolado no Japão e Estados Unidos, de cevada e milho infectados no campo, com *F.graminearum*. O nome alternativo vomitoxina refere-se à sua propriedade de causar vômitos, recusa de alimentos, associado a perda de peso, e que são os efeitos adicionais produzidos por DON em animais<sup>6,13</sup>. É o tricoteceno que ocorre com maior frequência e mais estudado por este motivo<sup>14</sup>.

Os efeitos agudos de DON são: náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre. Podem se desenvolver no prazo de 30 minutos da exposição e são de difícil distinção das condições gastrointestinais atribuídas a microrganismos como toxinas de *Bacillus cereus*<sup>15</sup>

Um controle sistemático e contínuo dos tricotecenos no Brasil não ocorre. Os dados existentes são poucos. A literatura brasileira relata alguns trabalhos sobre tricotecenos<sup>16,17,18,19,20,21,22</sup>. A proposta deste trabalho foi avaliar a incidência de DON em trigo e farinha de trigo, comercializadas na cidade de São Paulo. A metodologia utilizada foi otimizada e é simples, precisa, sensível que não necessita de equipamentos sofisticados ou de treinamentos especiais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Amostras de trigo em grão (14) e farinha de trigo (28), perfazendo um total de 42, foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo.

As amostras em grão foram trituradas em moinho – liquidificador, Vita Mix Corp (Cleveland), e passadas em peneiras de 20 mesh, 2 vezes, acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas a 5° C até o momento da análise.

### Padrão

A solução padrão de desoxinivalenol (DON) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) de 1 mg foi preparada, dissolvendo em 25 mL de acetato de etila, grau CLAE, e obtendo-se a concentração de 39 ¼g/mL. Esta concentração foi determinada espectrofotometricamente<sup>23,24</sup>. A solução foi acondicionada em frasco ambar vedado e armazenada a -18°C.

### Métodos

#### Extração e limpeza do extrato

O procedimento da extração e limpeza do extrato, foi feito de acordo com o indicado pelo fornecedor das colunas MycoSep (Romer Labs.-USA).

Vinte e cinco gramas de amostra foram homogeneizadas com 100 mL de uma solução de CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (84:16) por 5 minutos em liquidificador. A mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo após decantação.

Uma alíquota de 8 mL foi colhida e transferida para um tubo de cultura de vidro tal que, 2/3 do tubo estivesse preenchido com esta solução (Figura 1). A coluna MycoSep (225 para trigo e 227 para farinha de trigo) foi inserida com um êmbolo no

tubo e empurrada através do tubo, forçando o extrato a passar pelo conteúdo da coluna (recheio). Uma alíquota de 4 mL foi coletada no reservatório acima da coluna e transferida para um frasco de vidro ambar onde o solvente foi evaporado sob corrente de N<sub>2</sub>.

### Separação e quantificação de DON

Os resíduos obtidos na extração foram dissolvidos em 150 µL de uma solução de tolueno-acetonitrila (97:3) e submetidos ao ultra-som por 30 segundos. Alíquotas deste extrato e do padrão foram aplicadas na cromatoplaça de vidro (CCF-C25 sílica gel sem indicador de fluorescência, artigo 105721, Merck, Alemanha) até um máximo de 75 µL para a amostra e padrão as aplicações correspondendo a 25, 30, 40, 50, 100, 200 e 250 ng de DON/mancha na placa. O cromatograma foi desenvolvido em tolueno-acetona (1:1) e a placa depois de seca foi pulverizada com solução de AlCl<sub>3</sub> (15% em metanol) e aquecida em estufa a 110°C durante 7 minutos e exposta sob luz UV (366 nm). A fluorescência azul da amostra observada foi comparada com as do padrões<sup>24</sup>. Para confirmar a metodologia, alguns resultados foram comparados pela CLAE-UV<sup>10</sup>

### Controle Analítico

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos neste trabalho, alguns parâmetros foram avaliados: recuperação, repetitividade e limite de quantificação, com amostras de trigo e farinha de trigo fortificadas com 80,0 e 100,0 ¼g/kg.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da recuperação de DON nas amostras de trigo e farinha de trigo artificialmente contaminadas, podem ser observados na Tabela 1. Os resultados não foram completamente satisfatórios utilizando coluna MycoSep 225 para farinha de trigo.

Observa-se que a porcentagem média de recuperação na amostra contaminada com 80 µg/kg por CCD, foi de 72,5%

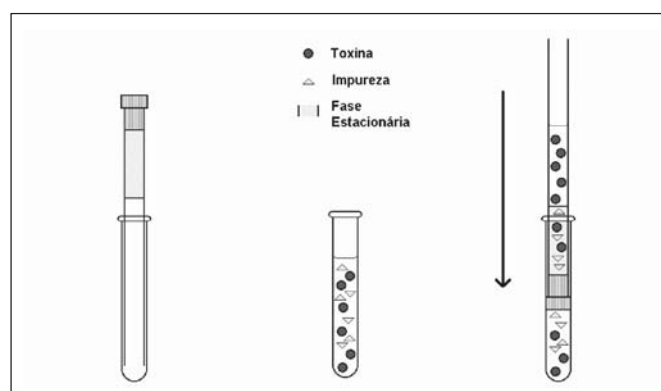


Figura 1. Coluna MycoSep

**Tabela 1.** Resultados de recuperação para DON nas amostras de trigo e farinha de trigo artificialmente contaminadas.

Amostra	Add µg/kg	% média recuperação	Coluna/Separação	DP µg/kg	DPR%
Farinha	80,00	72	MycoSep225/CCD	32	54
Farinha	100,00	87	MycoSep225/CCD	12	14
Farinha	80,00	97	MycoSep227/CCD	8	11
Farinha	100,00	107	MycoSep227/CCD	19	18
Trigo	100,00	90	MycoSep225/CCD	7	8
Trigo	100,00	125	MycoSep227/CCD	25	20

Média de cinco determinações.

Add: adicionado.

DP: desvio padrão.

DPR: desvio padrão relativo.

DON = desoxinivalenol.

**Tabela 2.** Ocorrência de DON nas amostras de trigo analisadas\*

Produto	Incidência <sup>o</sup> positivas/total	Varição ¼g/kg	Média positiva ¼g/kg
Farinha	14/28	82,0-600,0	296,3
Trigo	05/14	166,0-1500,0	753,2

\* Método utilizado: coluna MycoSep 225/227 - CCD

valor que atende a critérios internacionais, adotados pela CE e Horwitz et al.<sup>25,26</sup>, mas o desvio padrão relativo (DPR) foi alto, isto é 54%. Este valor demonstrou que houve uma dispersão de resultados acima do aceitável entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições definidas. Na amostra fortificada com 100,0 µg/kg e determinada em CCD, os resultados obtidos na porcentagem média de recuperação na farinha de trigo com a coluna MycoSep 225 foram satisfatórios, 87% e DPR de 13%. Para as amostras de farinha de trigo com as mesmas concentrações de fortificação (80 e 100 ¼g/kg), também utilizou-se a coluna MycoSep 227. Optou-se por sua utilização uma vez que a farinha de trigo é uma matriz mais complexa, por ser processada e a coluna escolhida tem o dobro do recheio da MycoSep 225. Foi observado durante a parte experimental que os extratos ficaram mais límpidos com a coluna MycoSep 227 que com a coluna 225.

O Limite de Quantificação (LQ) para DON em farinha de trigo foi 80 µg/kg e para o trigo igual a 100 µg/kg e optou-se trabalhar com LQ

Estas colunas são uma mistura de carvão ativo, celite e resina trocadora de íons<sup>27</sup> e tem sido utilizadas em vários estudos para determinação de tricotecenos em trigo<sup>28,29,30</sup>. De acordo com os resultados da Tabela 1, os métodos foram considerados, adequados, onde o desvio padrão relativo (DPR) foi de 7,85% a 20,0% exceto na farinha de trigo com MycoSep 225. Neste caso a precisão do método foi comprometida pois segundo Horwitz<sup>26</sup> o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) em análises que se quantifica na ordem de ng/g (ppb) o CV deve ser de 20,0-25,0% e o nosso resultado atingiu 54,8%.

### Ocorrência de DON em amostras de trigo

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos das amostras analisadas e alguns deles foram confirmados por CLAE, Tabela 3. Observa-se que os resultados variaram de 82,0 a 1500,0 µg/kg.

Estes resultados confirmam os resultados obtidos por Furlong<sup>31</sup>, quando avaliou trigo nacional e argentino e determinou DON, T2, DAS, T2 tetraol. A autora detectou 400 µg/kg de DON em amostra de trigo nacional proveniente de silos e armazéns do Rio Grande, RS. Como foi dito anteriormente, o estudo da incidência de tricotecenos em alimentos nacionais são muito restritos, Sabino<sup>16</sup>, analisando 70 amostras de trigo e seus derivados (farinha, farelo) adquiridas nos centros comerciais da cidade de São Paulo ou enviadas para o Instituto Adolfo Lutz suspeitas de intoxicação animal detectou

**Tabela 3.** Determinação de DON por CCD confirmada por CLAE.<sup>10</sup>

Amostra (Farinha trigo)	Concentração (µg/klg)	
	CCD	CLAE
A	ND	ND
B	ND	ND
C	ND	ND
D	600,0	699,0
E	500,0	572,0
F	125,0	235,0
G	ND	ND
H	ND	ND

ND= Não detectado, DON= desoxinivalenol.

CCD= cromatografia em camada delgada.

CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência.

DON em apenas em 2 amostras: farinha de trigo e ração animal, com 183,0  $\frac{1}{4}$ g/kg. Furlong<sup>18</sup>, estudando 2 cultivares de trigo, IAC 24 e BH 1146, procedentes de diferentes regiões do estado de São Paulo, detectou DON em 3 amostras nos seguintes teores: 580,0  $\frac{1}{4}$ g/kg, 590,0  $\frac{1}{4}$ g/kg e 560,0  $\frac{1}{4}$ g/kg no cultivar IAC 24, enquanto que no BH 1146 detectou uma amostra com 470,0  $\frac{1}{4}$ g/kg. Furlong<sup>31,32</sup>, utilizou CG enquanto que Sabino<sup>16</sup> CCD. O DON tem sido o tricoteceno mais encontrado nos Estados Unidos seguido pelo NIV, as toxinas T2 e HT2 e o DAS. O milho, cevadas e trigo utilizados tanto para o consumo humano como animal estão, em alguns regiões do mundo, frequentemente contaminados com tricotecenos<sup>10,12,19</sup>. Níveis atingindo até 40 mg/kg foram observados no trigo produzido na Alemanha, Polônia, Japão, Nova Zelândia, Canadá e na Argentina<sup>12</sup>, teores que até o momento não foram relatados no Brasil.

## CONCLUSÕES

As colunas MycoSep 225 e 227 demonstraram eficiência na etapa de extração e limpeza de amostras de trigo e farinha de trigo na pesquisa de DON.

CCD, que não requer equipamentos mais sofisticados, mostrou que atende os limites máximos recomendados pelos países preocupados com esta micotoxina, de 1 ppm a 2 ppm;

Das 42 amostras de trigo e farinha de trigo analisadas no presente trabalho, 19 estavam contaminadas (45%) com teores que variaram de 82 a 1500  $\frac{1}{4}$ g/kg.

## REFERÊNCIAS

1. Miller JD. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J Stored Prod Res* 1995; 31: 1-16.
2. Kotal F. Determination of trichothecenes in cereals. *J Chromatogr A* 1999;830:219-25
3. Frisvad JC, Thrane U. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: Samson, RA., Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. editors. - Introduction to food-borne fungus, 4<sup>a</sup> ed., Baam, Netherlands: CBS, 1995, p.251-60.
4. Ueno Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. *Reviews in Environmental Toxicology* 2, Amsterdam, 1986, p.303-41.
5. Snyder AP. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. *J Food Prot* 1986;49:544-69.
6. Scott PM., Lau Pui-Yan, Kanhere S.S. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *J Assoc Off Anal Chem* 1981;64:1364-71.
7. Kamimura, H, Nishijima M, Yassuda K, Saito K, Ibe A, Nagayama HU, Naoi Y. Simultaneous detection of several Fusarium Mycotoxins in cereals grains and foodstuffs. *J Assoc Off Anal Chem* 1981; 64:1067-81.
8. Malone BR, Humphrey CW, Romer TR, Richard J. One step solid-phase extraction cleanup and fluorometric analysis of deoxynivalenol in grains. *JAOAC Intl* 1988; 81:448-52.
9. Trucksess MW, Thomas F, Young K, Stack ME, Fulgueras WJ, Page SW. Survey of deoxynivalenol in US 1993 and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *JAOAC Intl* 1995; 79:631-6
10. Trucksess MW, Ready Du WE, Pender MK, Ligmond CA, Wood GE, Page SW Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran. *JAOAC Intl* 1996;79: 884-7
11. Patel S, Hazel CM, Winterton AG, Mortby E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Addit Contam* 1996;13:833-41.
12. Placinta CM, Mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed and Science Technol* 1999;78:21-37.
13. Lambert L, Hines FA, Eppley RM. Lack of initiation and promotion potencial of deoxynivalenol for skin tumorigenesis in senear mice. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:217-22.
14. WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 105 . Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. IPCS (International Programme On Chemical Safety), Geneva. World Health Organization. 1990, cap.2, p.71-164.
15. WHO - World Health International Organization. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO Food and Nutrition Paper. Prepared by the Fifty Sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva World Health Organization, 2001, 701 p.
16. Sabino M, Ichikawa AH, Inomata EI, Lamardo LC. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1989; 49:155-9.
17. Furlong EB, Valente Soares LM, Lasca CC, Kohara EY. Mycotoxins and fungus in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Addit Contam* 1995a;12:683-8.
18. Furlong EB, Valente Soares LM, Lasca CC, Kohara EY. Mycotoxins and fungi in wheat harvest during 1990 in test pilots in the state of São Paulo, Brazil. *Mycopathology* 1995b; 131:185-90.
19. Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998- 2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002;61:1-6.
20. Prado G, Oliveira MS, Ferreira SO, Corrêa TBS, Affonso BRR. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T2 em milho pós colheita. *Ciênc Tecnol Alim* 1997;17:259-62.
21. Oliveira, AQ; Soares, LMV; Sawazaki, E. Survey of deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the State of São Paulo and popcorn commercialized in the city of Campinas, SP. *Ciênc Tecnol Alim* 2001;21:330-3.
22. Milanez TV. Tricotecenos em milho: otimização e avaliação de método analítico utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas e levantamento da incidência em milho e em produtos de milho no Estado de São Paulo. [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2003. 182pp.
23. Bennet GA, Shotwell OL. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. *J Assoc Off Anal Chem* 1990;73: 270-5.
24. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of the AOAC 15<sup>th</sup> edition. Washington DC, 1990
25. CE- Comission Directive 98/53/EC - July 16<sup>th</sup> 1998-Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs Official Journal of the European Communities-Annex II.
26. Horwitz W, Kamps LR, Boyder KW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 1980;63( 6):1344-1354.
27. Langseth W, Rundberget T. Instrumental methods for determination of non macrocyclic trichothecenes in cereals foodstuffs and culture (review). *J Chromatogr A* 1998; 815:103-21.
28. Krska, R. Performance of modern samples preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *J Chromatogr A* 1998;815:49-57.
29. Radova Z et al. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J Chromatogr A* 1998; 829: 259-67.
30. Eskola M, Papprikka P, Rizzo A. Trichothecenes, ochratoxin A, and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in finnish cereal samples in food. *Food Addit Contam* 2001;18: 707-18.
31. Furlong E.B. Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo. [Tese de Doutorado] Campinas, São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, 1992, 120pp.
32. Furlong EB, Valente Soares ,LM. Gas Chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. *JAOAC Intl* 1995; 78:86-390.