

## TESTES CONFIRMATÓRIOS PARA TRICOTECENOS

Maria Angélica MAROCHI\*  
Lucia M. Valente SOARES\*\*  
Regina P. Z. FURLANI\*\*

RIALA 6/808

MAROCHI, M.A.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. - Testes Confirmatórios para Tricotecenos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (2): 17-20, 1996.

**RESUMO:** Testes para confirmação da identidade de alguns tricotecenos (deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina T-2, roridina A, verrucarina A) em cromatografia de camada delgada são descritos, envolvendo (a) uma reação de acetilação antes do desenvolvimento cromatográfico e (b) o uso de 5 reveladores (ácido sulfúrico, sulfato de cério, 2,4 dinitrofenil hidrazina, p-anisaldeído, ácido cromotrópico) após o desenvolvimento cromatográfico. Nivalenol não respondeu aos reveladores e não pode ser incluído na presente proposta. O sistema foi testado em oito amostras de milho inoculadas e incubadas com cepas toxigênicas de *Fusarium* e que produziram diacetoxiscirpenol e toxina T-2, e os resultados, comparados com os obtidos com espectrometria de massa, demonstram a utilidade e facilidade de aplicação do sistema para confirmação destes tricotecenos em camada delgada.

**UNITERMOS:** Micotoxinas, tricotecenos, cromatografia em camada delgada, testes confirmatórios para tricotecenos.

### INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são responsáveis pelas síndromes denominadas aleucia tóxica alimentar (ATA), fusario-toxicoses e ainda toxicoses do milho embolorado. Os sintomas agudos da ATA, descritos primeiramente em humanos na Rússia no século XIX, compreendem febre, angina necrótica, leucopenia, hemorragias generalizadas, exaustão da medula óssea e morte<sup>20</sup>. Vômitos e recusa alimentar são observados em animais. Tricotecenos são poderosos imunossupressores e inibidores da síntese proteica, o que pode predispor animais a outras doenças e mascarar a toxicose inicial<sup>9</sup>. Apesar de que todos os animais são afetados quando da ingestão de tricotecenos, a severidade dos sintomas depende do composto efetivamente presente no alimento ou ração, o grau ou duração da exposição e da espécie de animal envolvido. Suínos e outros animais monogástricos (inclusive humanos) são os mais sensíveis. Galinhas e perus exibem tolerância maior e finalmente, os menos sensíveis vem a ser os ruminantes<sup>11</sup>.

De acordo com SCOTT<sup>13</sup>, o número de tricotecenos isolados em laboratório supera 100 compostos, porém a ocorrência natural comprovada em alimentos está limitada a cerca de cinco componentes desta família (deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T-2 (T-2) e HT-2 (HT-2)). Levantamentos mais recentes tem revelado também a presença de 15-acetildeoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol<sup>6</sup>, fusarenona -X<sup>5</sup>. Na Alemanha, T-2 triol e T-2 tetraol foram encontrados em cereais ainda na década de 80<sup>19</sup>. Em seu trabalho de revisão sobre o assunto, SCOTT<sup>13</sup> mostra que os tricotecenos tem sido encontrados em

todos os tipos de cereais consumidos pelo homem. Paralelamente, relatos de amostras contaminadas tem ocorrido em todas as partes do mundo em que levantamentos tem sido realizados<sup>5, 13, 18</sup>.

A determinação de micotoxinas envolve necessariamente métodos cromatográficos na etapa de quantificação devido a necessidade de separar as toxinas dos muitos possíveis interferentes. Pois, como acontece com muitos processos analíticos para substâncias presentes em traços, o processo de extração do alimento e limpeza de interferentes não elimina a necessidade de uma última etapa envolvendo cromatografia. Processos cromatográficos, por sua vez, não dão certeza quanto a identidade do composto, criando-se assim a obrigatoriedade de uma etapa de confirmação.

SCOTT<sup>15</sup> cita testes de confirmação da identidade das micotoxinas que incluem: formação de derivado por reação química, espectrometria de massa, uso de dois detectores diferentes em cromatografia líquida e o uso de dois comprimentos de onda no mesmo detector de fluorescência ou UV/visível do cromatógrafo líquido. A estes poderíamos acrescentar imunoenaios, pois por sua especificidade também preenchem o requisitos necessários para teste de confirmação.

Para tricotecenos, porém, a única abordagem relatada na literatura tem sido espectrometria de massa<sup>10, 17</sup>. Os tricotecenos são convertidos em derivados trimetilsilinizados, heptaflourobutirados ou triflouralquilados para que através de um diagnóstico de seu padrão específico de fragmentação tenham sua identidade confirmada.

No presente trabalho são propostos testes para confirmação da identidade de alguns tricotecenos baseados na

\* Bolsista da CAPES.

\*\* Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Caixa Postal 6121, 13081-970 Campinas, S.P.

acetilação e na revelação das toxinas, acetiladas ou não, com diversos reveladores e observação das cores surgidas com a revelação, assim como do comportamento dos compostos em cromatografia de camada delgada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os testes propostos para confirmação da identidade dos tricotecenos compreendem uma reação de acetilação e revelação com cinco reveladores diferentes.

**Preparo de padrões:** (concentrações aproximadas que podem ser empregadas: 80 mg/mL DON, 139 mg/mL NIV, 117 mg/mL DAS, 68 mg/mL T-2, 91 mg/mL ROR, 76 mg/mL VER)

**Acetilação dos tricotecenos:** (a) para deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e toxina T-2 - aplicar amostra e padrão lado a lado, duas vezes na placa de camada delgada de sílica gel 60. Sobre as segundas manchas do padrão e da amostra, aplicar piridina/anidrido acético (1+1). Deixar secar e desenvolver em tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1) (b) Para todos os tricotecenos testados - Colocar em um pequeno frasco de aproximadamente 4 mL, com tampa, cerca de 50 mL de um dos padrões de tricoteceno ou 50 mL de amostra que possua concentração equivalente ou maior às indicadas. Adicionar 200 mL de anidrido acético e 200 mL de piridina. Aquecer a 65°C por 2,5 horas ou, opcionalmente, deixar em repouso por 20 horas à temperatura ambiente. Secar em banho-maria sob nitrogênio. Ressuspender em 200 mL de benzeno e agitar em banho de ultrassom. Aplicar 20 mL ou mais, em camada delgada e desenvolver, como descrito em (a). Nebulizar com o Revelador 1 e proceder como descrito abaixo em "Aplicação de reveladores". O resultado será considerado positivo caso o comportamento cromatográfico do padrão e da amostra derivados coincidir, assim como o par não derivado. No entanto, os pares devem apresentar comportamento diverso quando comparados um com o outro.

**Aplicação de reveladores:** aplicar as amostras e os padrões em camada delgada de sílica gel 60. Preparar desta maneira quantas placas quantos forem os reveladores a serem empregados. Desenvolver cada placa em tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1). Nebulizar em cada placa um dos seguintes reveladores e deixar na estufa o tempo recomendado: 1- ácido sulfúrico 20% em metanol (10 minutos a 110°C), 2- sulfato de cério, 1% em ácido sulfúrico 6N (10 a 20 minutos a 110°C), 3- 2,4 dinitrofenil hidrazina, 0,5g dissolvidos em uma mistura de 3,5 mL ácido sulfúrico concentrado, 37,5 mL de etanol e 85 mL de água (10 a 20 minutos a 110°C), 4- p-anisalaldeído, 0,5 mL em uma mistura de 5 mL de ácido sulfúrico, 10 mL ácido acético glacial e 400 mL metanol (20 minutos a 110°C), 5- ácido cromotrópico, 1 parte de solução aquosa de ácido cromotrópico a 10% e 5 partes de ácido sulfúrico/água (5+3) (5 a 10 minutos a 110°C).

Os testes propostos foram avaliados com amostras de milho inoculadas com cepas toxigênicas de *Fusarium* (*F. poae* NRRL 3511, *F. sporotrichioides* NRRL 3510 (obtida do NRRL em 1982), *F. tricinctum* NRRL 3510 (obtida do NRRL em 1988) e *F. tricinctum* NRRL 3299 (obtida do NRRL em 1988). Cada cepa foi inoculada em duas amostras de milho que haviam sido previamente autoclavadas a 121°C por 15 minutos para destruir a microbiota natural. A metade das amostras foram acondicionadas a 5°C durante 30 dias e a outra metade a 25°C. Após este período, as amostras foram autoclavadas a

121°C por 15 minutos e secas em estufa a 100°C. Foram então trituradas em moinho até obter-se uma granulometria de 20 mesh e submetidas ao método para determinação de tricotecenos descrito por MAROCHI & SOARES<sup>7</sup>. Foram confirmadas simultaneamente pelo sistema aqui proposto e por espectrometria de massa. Para análise por espectrometria de massa, as micotoxinas foram isoladas por cromatografia preparativa e analisadas em um espectrometro de massa VARIANT MAT 311 A, nas seguintes condições: temperatura de entrada na faixa de 100 a 110°C, temperatura da sonda na faixa de 100 a 275°C, corrente iônica total na faixa de 0,1 a 2,0 e energia de elétrons, 70 V.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de testes proposto e que inclui a visualização de tricotecenos acetilados e não acetilados (Tabela 1) com ácido sulfúrico, assim como a visualização com reveladores diversos (Tabelas 2 e 3), mostra uma gama de Rf's e cores capaz de possibilitar a confirmação da identidade das toxinas examinadas, exceto o nivalenol que mostrou-se refratário a todos os reveladores empregados. O sulfato de cério (Revelador 2), no entanto, tornou visível o nivalenol acetilado como uma mancha cinza, sob luz natural, com um limite de detecção de 700 ng. O fato de apenas este revelador ter-se mostrado eficaz, afasta, porém, a possibilidade de confirmar esta toxina com a ajuda dos testes aqui descritos.

Os limites de detecção para cada composto e cada revelador (Tabelas 4 e 5) foram incluídos por constituírem um ponto de orientação importante para o analista. O fato de não encontrar toxinas com um determinado revelador, pode significar que quantidade insuficiente foi aplicada na placa. Como os testes são qualitativos, pode-se aplicar grandes quantidades na camada delgada. Esta é uma situação inversa à do trabalho quantitativo, no qual não deve-se aplicar volumes superiores a 10 µL na placa, sob pena de incorrer-se em erro na medida do volume. Como a derivação, por sua vez, não é quantitativa, um pouco da mancha do composto inicial pode ser vista na placa após o desenvolvimento e revelação.

A reação de acetilação, apesar de conhecida, não foi até o momento sugerida para confirmação de tricotecenos. Foi utilizada em alguns trabalhos como uma preparação para cromatografia gasosa de tricotecenos<sup>16</sup>.

A formação de derivativo específico com propriedades cromatográficas diferentes do composto original constitui um enfoque simples e prático para muitos laboratórios e essencial para aqueles que não tem acesso a instrumentos mais dispendiosos como espectrômetros de massa. Com métodos de derivação, a prova de confirmação pode ser parte da rotina do laboratório, tenha ele acesso a um massa ou não. Por outro lado, é desejável que os analistas disponham de uma gama tão ampla quanto possível de métodos analíticos de maneira que possam escolher o que mais lhe convém em termos de recursos e tempo disponível.

Derivações químicas tem sido amplamente utilizadas com relação a outras micotoxinas. Para as aflatoxinas, que são as micotoxinas que mais frequentemente são alvo de determinações analíticas, o método de confirmação mais utilizado é a derivação química inicialmente proposta por PRZYLBYSKI<sup>12</sup> e adotada pela A.O.A.C. e pela A.A.C.C.<sup>2</sup>. O método consiste em uma hidratação do grupo éter vinílico, catalizada por um ácido. O mesmo

tipo de reação vem sendo usado para aflatoxina M<sup>21</sup> e esterigmatocistina<sup>1</sup>. As ocratoxinas A e B tem sua identidade confirmada com a formação de um éter etílico catalizada por trifluoreto de boro<sup>1</sup>. A reação de acetilação com anidrido acético foi proposta para zearalenona, ácido penicílico, citrinina, esterigmatocistina e ocratoxina A<sup>4</sup>.

O cuidado das autoras em incluir, além da acetilação, a visualização com diversos reveladores e a observação do comportamento cromatográfico, deve-se ao fato dos tricotecenos constituírem-se numa família tão extensa. Desta maneira visa-se eliminar possíveis identificações errôneas através da introdução de uma bateria de testes suficientemente grande, permitindo, por outro lado, que sejam incluídos futuramente tricotecenos não abordados no presente trabalho.

O sistema de confirmação foi testado em oito amostras de milho inoculadas com cepas toxigênicas de *Fusarium* que produziram DAS e T-2 (Tabela 6). Os resultados mostraram sua aplicabilidade para estas toxinas, porém, a própria lógica do sistema proposto vem a ser, provavelmente, a sua maior recomendação.

TABELA 1

Visualização de tricotecenos acetilados e não acetilados, desenvolvidos em cromatografia de camada delgada<sup>a</sup> e nebulizados com ácido sulfúrico 20% em metanol (Revelador 1), sob radiação ultravioleta e visível.

Tricoteceno	Rf	Cor (366nm)	Cor (Visível)
DAS	0,29	azul	cinza
DAS acetilado	0,49	amarelo	cinza
T-2	0,30	azul	cinza
T-2 acetilada	0,51	amarelo	cinza
DON	0,12	tijolo	cinza
DON acetilado	0,48	amarelo	cinza
NIV	-	nv	nv
NIV acetilado <sup>c</sup>	-	nv	nv
ROR	0,30	marrom	marrom claro
ROR acetilada <sup>b</sup>	0,21	rosa	marrom claro
	0,58	rosa	marrom claro
VER	0,44	azul	marrom claro
VER acetilada <sup>b</sup>	0,26	rosa	
	0,58	amarelo	marrom claro

<sup>a</sup> - Fase móvel: Tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1);  
<sup>b</sup> - duas manchas; <sup>c</sup> - nivalenol acetilado pode ser visualizado com o Revelador 2 (sulfato de cério), com um limite de detecção de 700 ng; nv - não visualizado.

TABELA 2

Tricotecenos revelados com reagentes diversos: Cores visualizadas sob luz visível.

Reve- lador	DAS	T-2	DON	NIV	ROR	VER
2	marron	nv	cinza	nv	marron	marron
3	amarelo claro	amarelo claro	nv	nv	amarelo claro	nv
4	rosa	rosa	rosa forte	nv	azul escuro	rosa claro
5	violeta	violeta	violeta	nv	ocre	ocre

Reveladores: 2 - sulfato de cério, 3 - 2,4 dinitrofenil hidrazina, 4 - p-anisaldeído, 5 - ácido cromotrópico. Fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1). nv - não visualizado.

TABELA 3

Tricotecenos revelados com reagentes diversos: Cores visualizadas sob radiação ultravioleta de 366nm.

Reve- lador	DAS	T-2	DON	NIV	ROR	VER
2	amarelo	amarelo	marron	nv	amarelo	amarelo
3	amarelo	amarelo	nv	nv	amarelo	nv
4	violeta	azul	marron	nv	tijolo	nv
5	marron	marron	violeta	nv	amarelo	amarelo

Reveladores: 1 - ácido sulfúrico, 2 - sulfato de cério, 3 - 2,4 dinitrofenil hidrazina, 4 - p-anisaldeído, 5 - ácido cromotrópico. Fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1). nv - não visualizado.

TABELA 4

Limites de detecção (em ng) de tricotecenos revelados com reagentes diversos: cores visualizadas sob radiação ultravioleta de 366 nm.

Reve- lador	DAS	T-2	DON	NIV	ROR	VER
1	50	40	40	-	40	50
2	350	340	480	-	160	300
3	700	300	-	-	90	-
4	700	340	480	-	1060	-
5	3150	2040	1690	-	528	912

Reveladores: 1 - ácido sulfúrico, 2 - sulfato de cério, 3 - 2,4 dinitrofenil hidrazina, 4 - p-anisaldeído, 5 - ácido cromotrópico. Fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1). nv - não visualizado.

TABELA 5

Limites de detecção (em ng) de tricotecenos revelados com reagentes diversos: Cores visualizadas sob luz visível.

Reve- lador	DAS	T-2	DON	NIV	ROR	VER
1	350	270	80	-	200	300
2	580	-	240	-	330	380
3	1050	2040	-	-	1060	-
4	350	680	240	-	790	600
5	350	340	1690	-	240	910

Reveladores: 1 - ácido sulfúrico, 2 - sulfato de cério, 3 - 2,4 dinitrofenil hidrazina, 4 - p-anisaldeído, 5 - ácido cromotrópico. Fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (6+3+1). nv - não visualizado.

TABELA 6

Toxinas produzidas por diferentes cepas de *Fusarium* em milho e submetidas à confirmação pelos testes propostos e por espectrometria de massa.

Cepa inoculada	Temperatura de incubação(°C)	Toxina confirmada Sistema proposto	Espectrometria de massa
<b>F. poae</b>	5	T-2	T-2
NRRL 3511	25	T-2	T-2
<b>F. sporotrichioides</b>	5	T-2	1
NRRL 3510	25	ND	-
<b>F. tricinctum</b>	5	T-2	T-2
NRRL 3510	25	DAS	1
	25	ND	-
<b>F. tricinctum</b>	5	ND	-
NRRL 3299	25	ND	-

ND - não detectado. 1 - quantidade isolada insuficiente para aplicação no espectrômetro de massa.

MAROCHI, M.A.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. - Confirmatory Tests for Trichothecenes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (2): 17-20, 1996.

**ABSTRACT:** Tests are described for confirmation of the identity of trichothecenes (deoxynivalenol, diacetoxycyperol, toxin T-2, roridin A, and verrucarín A) on thin layer chromatography using (a) an acetylation reaction employed previous to a chromatographic development and (b) 5 spray reagents (sulfuric acid, ceric sulfate, 2,4 dinitrophenylhydrazine, p-anisaldehyde, chromotropic acid) employed after a chromatographic development. Nivalenol did not respond to the spray reagents being utilized and thus could not be included in the present proposal. The system was tested on eight samples of corn previously inoculated and incubated with *Fusarium* trichothecene producing strains. Diacetoxycyperol and T-2 toxin were obtained and confirmed by the proposed tests. The results when compared with the ones obtained with mass spectrometry data, demonstrate the usefulness and ease of application of the system for confirmation of the identity of the above mentioned trichothecenes on thin layer chromatography.

**UNITERMS:** Mycotoxins, trichothecenes, thin layer chromatography, confirmatory tests for trichothecenes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. *Approved methods of analysis*, 8<sup>o</sup> ed., St. Paul, Minnesota, American Association of Cereal Chemists, Method 45 -30, p. 1-8, 1983.
2. BRUMLEY, W.C.; NESHEIM, S.; TRUCKSESS, M. W.; TRUCKSES, E.W.; DREIFUS, P.A.; ROACH, J.A.G.; ANDRZEJEWSKI, D.; EPPLEY, R.M.; POHLAND, A.E.; THORPE, C.W. & SPHON, J.A. Negative ion chemical ionization mass spectrometry of aflatoxins and related mycotoxins. *Anal. Chem.*, **53**: 2003-2006, 1981.
3. BUSBY JR, W.F. WOGAN, G.N. Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. In: RIEMANN, H. (ed) - *Food-borne infections and intoxications*. 2<sup>o</sup> ed., New York, Academic Press, 1979, p. 519-610.
4. GOLINSKI, P. & GRABARKIEWCZ-SZCESNA, 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**: 1108-1110, 1984.
5. 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**: 223-230, 1989.
6. LUO, L.; YOSHIZAWA, T.; YANG, J.S.; ZHANG, S.Y. & ZHANG, B.J. A survey of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat samples from Shaanxi and Shanxi Provinces, China. *Mycotoxin Res.*, **8**: 85-91, 1992.
7. MAROCHI, M.A. & SOARES, L.M.V. Uma metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. *Bol. S.B.C.T.A.*, **27**: 1-8, 1993.
8. OKOYE, Z.S.C. *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon-x in mouldy maize harvested from farms in Jos district, Nigeria. *Food Add. Contam.*, **10**: 375-379, 1993.
9. PESTKA, J.J. & BOUDY, G.S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **68**: 1009-1016, 1990.
10. PLATTNER, R.D. & BENNETT, G.A. Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadrupole mass spectrometry/ mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**: 1470 - 1477, 1983.
11. PRELUSKY, D.B.; ROTTER, B.A. & ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. (eds) - *Mycotoxins in Grain*. St. Paul, Minnesota, Eagan Press, p. 359-404, 1994.
12. PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on the thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**: 163 - 364, 1975.
13. SCOTT, P.M. The natural occurrence of trichothecenes. In: BEASLEY, R.V. (ed) *Trichothecene mycotoxicoses: Pathophysiologic effects*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 1 - 26, 1989.
14. SCOTT, P.M. Natural Poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists*. 15<sup>o</sup> edição, Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1990, p. 1184-1213.
15. SCOTT, P.M. Methods of Analysis for Mycotoxins - An Overview. In: ROSSELL, J.B. & PRITCHARD, J.L.R. (eds) - *Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods*. London, Elsevier, 1991, p. 141 - 183.
16. SCOTT, P.M. Gas chromatography of mycotoxins. In: BETINA, V. (ed) - *Chromatography of mycotoxins: Techniques and applications*. Amsterdam, Elsevier, p. 373 - 425, 1993.
17. SHOTWELL, O.L. Chemical survey methods for mycotoxins. In: COLE, R.J. - *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*, Orlando, Florida, Academic Press, 1986, p. 51 - 94.
18. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; LEE, U.-S.; SUGIURA, Y. & UENO, Y. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. I. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 979-983, 1988.
19. THALMANN, A. Fusaritoxine in Futtermitteln und Lebensmittelrohstoffen. *Agrarund Umweltforschung in Baden-Wurtemberg*, **14**, 1-49, 1986.
20. UENO, Y. Toxicology. In: UENO, Y. (ed) - *Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Tokyo, Japan, Kodansha Ltd., 1983, p. 135-170.
21. VAN EGMOND, H.P. & STUBBLEFIELD, R.D. Improved method for confirmation of identity of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in dairy products and animal tissue extracts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**: 152-155, 1981.

Recebido para publicação em 11/07/95