

COMPARAÇÃO ENTRE IMUNOENSAIO E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA NA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARELENONA EM AMOSTRAS DE MILHO EM GRÃO E FUBÁ*

Thais V. MILANEZ**
Márcia Bittar ATUI**
Flávio A. LÁZZARI***

RIALA 6/828

MILANEZ, T.V.; ATUI, M.B. & LÁZZARI, F.A..- Comparação entre imunoenensaio e : cromatografia em camada delgada na dcterminação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 65-71, 1998.

RESUMO: Duas técnicas, uma delas utilizando cromatografia em camada delgada e outra ensaio imunoenzimático (ELISA) foram comparadas na determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. Para tal, foram analisadas sete amostras de milho em grão e vinte amostras de fubá provenientes de uma indústria no Estado do Paraná. O método imunoenzimático mostrou-se mais simples e mais rápido e os níveis obtidos foram um pouco superiores àqueles obtidos por cromatografia em camada delgada. Falsos resultados positivos foram observados com o método imunoenzimático tornando-se necessária a confirmação da identidade das micotoxinas pesquisadas.

DESCRITORES: ELISA, cromatografia em camada delgada, imunoenensaio, aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, milho, fubá.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona são metabólitos tóxicos, conhecidos como micotoxinas produzidos por determinadas cepas fúngicas em condições adequadas. Micotoxinas têm grande importância devido aos danos provocados à saúde humana e animal e também quanto aos prejuízos financeiros provocados.^{10,12}

As aflatoxinas são produzidas por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são contaminantes naturais de vários produtos como milho, amendoim e ração animal. Elas são altamente tóxicas, especialmente a aflatoxina B₁ (AFB₁) que é considerada o mais potente carcinógeno humano^{5,23}.

A ocratoxina A (OA) é mutagênica, teratogênica e nefrotóxica principalmente em suínos e parece estar envolvida na etiologia da nefropatia endêmica dos Balcãs. Esta micotoxina é produzida por algumas cepas de *Aspergillus*

ochraceus e *Penicillium verrucosum* em produtos diversos como trigo, cevada, milho, café cru, feijão.^{12,23}

A zearalenona (ZEA) é um metabólito produzido por algumas cepas de *Fusarium graminearum* (*F. roseum*), *F. culmorum* e *F. crookwellense* principalmente em cereais como trigo, cevada, triticale e milho com teor de umidade superior a 22,0%. O principal efeito em animais é o hiperestrogenismo, sendo os suínos os animais mais sensíveis.^{10,12,22,23}

Devido aos danos provocados à saúde animal e humana e em consequência aos prejuízos financeiros provocados tem-se despertado grande interesse no desenvolvimento de técnicas rápidas e sensíveis para determinação de micotoxinas em alimentos, rações e fluidos biológicos.

Muitos métodos analíticos para determinação de micotoxinas têm sido desenvolvidos para os mais variados produtos alimentícios tanto para consumo humano como animal e também em fluidos biológicos.^{3,8,15,18,20,21}

* Realizado nas Seções de Microscopia Alimentar e Química Biológica da Divisão de Bromatologia e Química – INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902 – São Paulo -SP

** Do Instituto Adolfo Lutz

*** Da Universidade Federal do Paraná

Os métodos variam quanto ao preparo da amostra, sua complexidade e forma de determinação. Muitos deles são precisos porém necessitam de um preparo longo das amostras e, às vezes, complexo.^{3,8,9,15,18,19,20,21}

Tradicionalmente tem-se utilizado a cromatografia em camada delgada (CCD) que vem sendo substituída nos últimos anos pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e mais recentemente tem sido desenvolvidos métodos imunquímicos para detectar não apenas AFB₁ como também outras micotoxinas como ocratoxina A, vomitoxina, zearalenona, e fumonisinas.^{4,13}

Existem atualmente no comércio vários tipos de kits baseados em métodos imunoenzimáticos (ELISA) tanto para a detecção qualitativa como para a determinação quantitativa de micotoxinas.^{13,14,17} Tem-se observado a grande aceitação deste tipo de kits de imunoensaio, tanto pela facilidade de uso quanto pela rapidez na obtenção dos resultados.

A legislação brasileira segundo o Ministério da Saúde (Resolução 34/76 da CNNPA)² apresenta um limite máximo de 30 µg kg⁻¹ para a somatória das aflatoxina B₁ e G₁ e de acordo com as normas do MERCOSUL¹¹ (Grupo Mercado Comum) é de 20 µg kg⁻¹ para a somatória das quatro aflatoxinas (Resolução 56/94 internalizada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento pela portaria nº 183 de 21/03/1996)¹. Não existem valores estabelecidos para a ocratoxina A e zearalenona.

O objetivo deste trabalho foi comparar duas técnicas distintas, uma baseada em cromatografia camada delgada e outra numa técnica imunoenzimática quanto à determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho e fubá.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas sete amostras de milho em grão e vinte amostras de fubá provenientes de uma indústria no Estado do Paraná, no período de 24 de agosto à 17 de dezembro de 1994. As amostras de trabalho foram retiradas de vários pontos da amostra original e acondicionadas em sacos plásticos sob refrigeração até o procedimento das análises.

Métodos

Foram utilizados dois métodos:

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

- método descrito por Soares & Rodriguez-Amaya²¹ que utiliza cromatografia em camada delgada (CCD) usan-

do placas prontas de sílica. A mudança de fase móvel e cromatografia bi-dimensional forneceram dados para auxiliar a identidade das micotoxinas, porém a confirmação foi efetuada por derivação química com ácido trifluoroacético (TFA) com formação dos derivados característicos das aflatoxinas B₁ e G₁.¹⁶

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

- método imunoenzimático utilizando Kits ELISA (VERATOX, kits quantitativos para determinação de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A) fabricados por NEOGEN Corporation, Lansing, MI, EUA. Esta técnica utilizou 50 g da amostra moída e homogeneizada, extração com solução aquosa de metanol 70% com agitação manual vigorosa por três minutos. Procedeu-se filtração com papel Whatman nº1 e do filtrado retirou-se 100 µl para proceder-se a análise imunoenzimática de acordo com as orientações do fabricante destes "kits".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que constam nas Tabelas 1 e 2 permitem uma comparação entre as duas técnicas na determinação das aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. O método imunoenzimático utilizado permite apenas a determinação do total das aflatoxinas e o método cromatográfico permite a determinação de cada uma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Tabelas 3 e 4).

Utilizando-se os Kits Veratox os valores obtidos foram maiores do que aqueles valores encontrados nas análises efetuadas por CCD, sendo que, de forma geral, os resultados obtidos pelas duas técnicas foram concordantes.

Grande parte das amostras de fubá analisadas apresentou baixos teores de aflatoxinas pela técnica imunoenzimática e pelo método CCD os valores foram menores e próximos aos limites de detecção das aflatoxinas.

Quanto às amostras de fubá 3,4,5,6,8,12,15,17,20 (Tabela 2) supõe-se, no caso das aflatoxinas, de que se tratam de resultados falsos positivos, pois apesar de terem sido determinadas pelo método imunoenzimático não foram sequer detectadas pelo método CCD. Ainda não está claro até que ponto o problema de reações cruzadas foi superado na determinação das aflatoxinas na análise por métodos imunoenzimáticos.

A amostra 6 de milho (Tabela 1) apresentou 44,2 µg kg⁻¹ de aflatoxina total pelo método imunoenzimático. Entretanto pelo método cromatográfico nada foi detectado de qualquer das aflatoxinas, é possível que este comportamento possa ser devido ao processo de amostragem utilizado para as amostras de milho. A distribuição das micotoxinas é heterogênea exigindo uma amostragem bem

TABELA 1 - Determinação de micotoxinas em amostras de milho em grão utilizando técnicas de CCD e ELISA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$).

AMOSTRAS	ELISA			CCD*		
	Aflatoxinas**	OA	ZEA	Aflatoxinas**	OA	ZEA
1	nd	nd	166,6	2,5	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	44,2	nd	nd	nd	nd	nd
7	38,2	nd	nd	20,0	nd	nd

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

** somatória

Limites de detecção para CCD obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Limites de detecção dos "kits":

Aflatoxinas: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 100,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

TABELA 2 - Determinação de micotoxinas em amostras de fubá utilizando técnicas de CCD e ELISA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$).

AMOSTRAS	ELISA			CCD *		
	Aflatoxinas**	OA	ZEA	Aflatoxinas**	OA	ZEA
1	4,9	2,2	nd	6,0	nd	nd
2	6,0	2,4	nd	8,0	nd	nd
3	5,0	3,0	nd	nd	nd	nd
4	3,6	2,2	nd	nd	nd	nd
5	4,9	2,3	nd	nd	nd	nd
6	3,7	2,6	nd	nd	nd	nd
7	4,9	nd	nd	2,5	nd	nd
8	4,1	9,5	nd	nd	nd	nd
9	7,6	7,3	nd	3,0	nd	nd
10	7,3	6,8	nd	2,5	nd	nd
11	7,2	5,8	nd	2,5	nd	nd
12	6,6	4,4	nd	nd	nd	nd
13	7,8	3,4	nd	2,5	nd	nd
14	7,4	4,1	nd	2,5	nd	nd
15	8,8	3,4	nd	nd	nd	nd
16	8,3	3,6	nd	4,5	nd	nd
17	9,1	2,6	nd	nd	nd	nd
18	9,0	4,6	nd	3,5	nd	nd
19	8,4	6,0	nd	3,5	nd	nd
20	2,2	4,9	nd	nd	nd	nd

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

** somatória

Limites de detecção para CCD obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Limites de detecção dos "kits":

Aflatoxinas: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 100,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

TABELA 3- Determinação de aflatoxinas por CCD em amostras de milho em grão ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)*.

AMOSTRAS	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Aflatoxinas
1	nd	nd	2,5	nd	2,5
2	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd
6	2,5	nd	nd	nd	nd
7	15,0	5,0	nd	nd	20,0

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

Limites de detecção para CCD

obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

TABELA 4 - Determinação de aflatoxinas por CCD em amostras de fubá ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)*.

AMOSTRAS	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Aflatoxinas
1	6,2	nd	nd	nd	6,2
2	7,5	nd	nd	nd	8,0
3	nd	nd	nd	nd	nd
4	2,5	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd
7	2,5	nd	nd	nd	2,5
8	nd	nd	nd	nd	nd
9	nd	nd	3,0	nd	3,0
10	2,5	nd	nd	nd	2,5
11	2,5	nd	nd	nd	2,5
12	nd	nd	nd	nd	nd
13	2,5	nd	nd	nd	2,5
14	2,5	nd	nd	nd	2,5
15	nd	nd	nd	nd	nd
16	2,5	2,0	nd	nd	4,5
17	nd	nd	nd	nd	nd
18	2,5	1,0	nd	nd	3,5
19	2,5	1,0	nd	nd	3,5
20	nd	nd	nd	nd	nd

nd-não detectado

* determinação em duplicata e valores calculados na média de dois analistas

Limites de detecção para CCD

obtidos no nosso laboratório:

AFB₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFB₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₁: 2,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

AFG₂: 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

OA: 7,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

ZEA: 288,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

feita. No caso das amostras de fubá o próprio processamento já garante a homogeneidade das amostras, o que pode ser observado pelos resultados que foram mais concordantes para as duas técnicas utilizadas.

Observou-se na determinação de ocratoxina A que os valores encontrados para milho e fubá pelo método imunoenzimático, estavam quase na totalidade abaixo do limite de detecção do método CCD. Com exceção das amostras 8 e 10 de fubá que apresentaram 9,5 e 7,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ocratoxina A, respectivamente (Tabela 2). Desta forma não é possível fazer uma comparação efetiva entre as duas técnicas, apenas considerando que muitos destes valores pequenos encontrados possam ser presuntivos positivos pois não havia metodologia mais sensível à disposição para confirmá-los.

Alguns autores tem estudado a correlação entre os resultados de CCD e ELISA. HONGYO et al.⁶ compararam o desempenho de um teste ELISA com CCD e CLAE para determinação de AFB₁ em milho contaminado e ração e os resultados obtidos indicaram boa correlação entre os três métodos analíticos.

Poucos kits ELISA comerciais tem sido avaliados em estudos colaborativos interlaboratoriais¹⁸ e de forma geral observa-se boa correlação desta técnica com métodos convencionais como CCD e CLAE. Os kits comerciais avaliados por estudos colaborativos tem causado muita controvérsia pois alguns deles já estudados tem seus resultados modificados em função do contínuo avanço da técnica imunoenzimática. Pestka et al.¹⁴ fizeram levantamento dos kits comerciais disponíveis e segundo este levantamento, o kit Veratox tem limites de detecção para aflatoxinas 5 ppb e para zearalenona 250 ppb, valores estes que já foram modificados. Estes mesmos autores verificaram que algumas vezes extratos de alimentos sem micotoxinas podem interferir na ligação micotoxina-enzima ao anticorpo fase sólida e neste caso a resposta falsa positiva quando comparada à curva padrão preparada no solvente extrator com tampão.

HORWITZ et al.⁷ avaliaram os parâmetros de precisão através de dados provenientes de um estudo colaborativo para detecção de micotoxinas utilizando CCD, CLAE e ELISA. De acordo com os resultados obtidos, os autores verificaram uma precisão insatisfatória entre os laboratórios participantes deste estudo, pois a precisão dos métodos para determinação de micotoxinas é inferior quando comparada à determinação de macroanalitos. Isto é resultado da baixa concentração do analito e problemas com calibração e padrões. Os métodos imunoenzimáticos levam a crer que tem precisão mais pobre comparados aos métodos CCD

e CLAE, além disso os métodos imunoenzimáticos mostraram grande variabilidade nos seus resultados (30-300%) e baixa reprodutibilidade.

Existem kits de imunoenensaio específicos para determinação de aflatoxina B₁ e outros para determinação do total de aflatoxinas como o utilizado neste estudo que não determina níveis exatos de cada uma delas e portanto dificulta seu uso nas análises para vigilância sanitária e pesquisa. Os laudos emitidos para fiscalização devem explicitar valores de aflatoxinas B₁ e G₁ presentes nas amostras para desta forma atender à exigência da Legislação Brasileira, Resolução 34/76 da CNNPA que determina limite máximo de 30 $\mu\text{g/kg}$ (ppb) na somatória das aflatoxinas B₁ e G₁². Este fato torna os "kits" pouco indicados para órgãos envolvidos com a fiscalização.

Segundo Horwitz et al.⁷ os métodos de triagem são métodos rápidos e confiáveis na eliminação de um grande número de amostras negativas (ou positivas) para restringir o número de amostras que requerem a aplicação de um método mais rigoroso. No caso de micotoxinas resultados falsos positivos são aceitáveis pois serão checados por métodos confirmatórios, mas os resultados falsos negativos devem ser ausentes.

Os "kits" atendem de forma geral às necessidades da indústria e do campo, pois a técnica de imunoenensaio é um teste rápido e simples que permite verificar a qualidade da matéria-prima que está sendo adquirida, quanto à presença de micotoxinas quando comparado por outros métodos, seja CLAE ou CCD, que requerem limpeza por partição líquido-líquido ou coluna cromatográfica, o que toma muito mais tempo de análise.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização dos kits se mostrou adequada para a determinação de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A em amostras de milho e derivados desde que os resultados sejam sempre confirmados por outras técnicas para evitar resultados falsos positivos.

Os kits são fáceis de operar, rápidos, utilizam pouca vidraria e pequenos volumes de solventes orgânicos diminuindo o risco de exposição do analista. A melhor atitude ao adotar esta técnica é avaliá-la criteriosamente de acordo com o nível de precisão e o propósito requeridos.

A maior utilidade destes kits é no campo, armazéns e indústrias que precisam fazer uma triagem rápida para aceitar ou rejeitar determinado produto ou lote.

MILANEZ, T.V.; ATUI, M.B. & LÁZZARI, F.A. - Comparison between immunoassay and thin-layer chromatography for determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn and corn meal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 57-71,1998.

ABSTRACT: Two techniques, one of them using thin-layer chromatography and the other enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were compared for the determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone. Seven samples of corn and twenty samples of corn meal from an industry in Paraná State were analysed for this purpose. The ELISA method was simpler to use, faster, showing higher concentrations than the thin-layer chromatography method. False positives requiring confirmation of the mycotoxins were observed with the ELISA method.

DESCRIPTORS: ELISA, thin-layer chromatography, immunoassay, aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, corn and corn meal.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à NEOGEN Corporation-Michigan, ALTECH do Brasil pelo fornecimento dos kits para análise de micotoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc., Portaria nº183 de 21/03/1996 que internaliza a Resolução 56/94 do Mercado Grupo Comum, Ministério da Agricultura e Abastecimento. *Diário Oficial*, Brasília, 25 mar. 1996.
2. BRASIL, Leis, decretos, etc.- Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Seção I, pt.I, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
3. CHAMBON, P.; DANO, S.D.; CHAMBON, R. & GEACHAN, A. Rapid determination of aflatoxin M₁ milk and milk products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 259(2): 372-374, 1983.
4. CHU, F.S.; UENO, I. Production of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:1125-1128, 1977.
5. IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to man. Lyon, 1975. *Some naturally occurring substances*. Lyon, IARC, 1976. p.51-72 (IARC Monographs, 10)
6. HONGYO, K.I.; ITOH, Y.; HIFUMI, E.; TAKEYASU, A. Comparison of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay with thin-layer chromatography and liquid chromatography for aflatoxin B₁ determination in naturally contaminated corn and mixed feed. *J. AOAC Internat.*, 75(2): 307-312, 1992.
7. HORWITZ, W.; ALBERT, R.; NESHEIM, S. Reliability of mycotoxin assays - an update. *J. AOAC Internat.*, 76(3): 461-491, 1993.
8. LANSDEN, J.A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 964-966, 1986.
9. LANSDEN, J.A. Liquid chromatographic analysis system in peanuts. for a cyclopiazonic acid. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67: 728-731. 1984.
10. LAZZARI, F.A. 1993. *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. Curitiba, Ed. do Autor, 140p.
11. MERCOSUL GMC \ Resolução nº 56/94 - Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas.
12. MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J. Stored Prod. Res.*, 31 (1): 1-16, 1995..
13. MORGAN, M.R.A.; KANG, A.S. & CHAN, H.W.S. Aflatoxin determination in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 908-914, 1986.
14. PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N. & SUTKINO Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technology*, 49(2): 120-128, 1995.
15. PONS, W.A. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62: 586-594, 1979.
16. PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58: 163-164, 1975.
17. SCOTT, P.M. Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern.*, 76:112, 1993.
18. SCOTT, P.M. Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 12(9): 373-381, 1993.
19. SCOTT, P.M.; LAU, P. & KANHERE, S.R. Gas chromatography with electron capture and mass

- spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 1364-1371, 1981.
20. SHANNON, G.M.; SHOTWELL, O.L. & KWOLEK, W.F. Extraction and thin layer chromatography of aflatoxin B₁ in mixed feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66: 582-586, 1983.
21. SOARES, L.V.S.; 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):22-26,1989.
22. WATSON, S.A. & RAMSTAD, P.E. 1987 - Corn: Chemistry and Technology. St. Paul, M.N.: American Association of Cereal Chemists, Inc., 605 p.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Mycotoxins. Geneva, WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria, 11).

Recebido para publicação em 07/11/97

