

DETERMINAÇÃO DE DEOXINIVALENOL EM TRIGO E MILHO EM GRÃO POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA*

Myrna SABINO**
Alice Haruko ICHIKAWA**
Emiko Ikejiri INOMATA**
Leda C. A. LAMARDO**

RIALA6/673

SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L. C. A —
Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em
camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):155-159, 1989.

RESUMO: Em amostras de milho em grão e trigo de várias procedências, foi
verificada a ocorrência de deoxinivalenol (DON), utilizando a técnica de cromatografia
em camada delgada. Das 120 amostras analisadas, apenas duas apresentaram
deoxinivalenol com concentração de 183,0 µg/kg. O limite de determinação do
método foi de 110,0 µg on meg. Os testes de recuperação variaram de 80 a 100% para
o trigo e de 75 a 100% para o milho com médias de 90 a 85%, respectivamente. O
coeficiente de variação foi de 11%, tanto para o trigo como para o milho.

DESCRIPTORIOS: deoxinivalenol; análise milho; trigo; cromatografia em camada
delgada.

INTRODUÇÃO

Deoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente pelos fungos *Fusarium graminearum*. Infestação de grãos de milho e cereais por *F. graminearum* e concomitante produção de DON ocorrem mais freqüentemente durante aqueles anos quando a maturação e época de colheita é chuvosa e fria². Os efeitos deletérios de DON em suínos e animais de laboratório foram descritos por vários autores^{7,24,27} e incluem recusa de alimentos, diminuição da eficiência dos alimentos, redução do ganho de peso, emesis, depleção do glicogênio hepático e hipoglicemia.

Estudos atuais do metabolismo têm sido conduzidos para determinar o destino desta toxina nos animais. YOSHIZAWA et alii³⁰ foram os primeiros a caracterizar um metabólito de DON, denominado DOM-1, em fezes e urina de rato.

DON, também conhecido como vomitoxina, foi pela primeira vez caracterizado no Japão²⁹ como um

metabólito de *Fusarium roseum* (*Fusarium graminearum*) isolado de cevada, que mostrou ser idêntico ao fator emético (vomitoxina) isolado de milho nos Estados Unidos de uma espiga deteriorada, produzindo vômitos em suínos²⁶. É um dos tricotecenos que ocorrem naturalmente e tem sido detectado em amostras de milho, cevada e trigo^{21,23,36}.

Os tricotecenos quando presentes em grãos utilizados nas rações de animais de criação causam doenças conhecidas como fusariotoxicoses^{5,8}. Informações sobre efeitos tóxicos em animais e humanos, expostos ao DON, são limitadas⁹.

Vários métodos têm sido propostos para a identificação e quantificação de DON: cromatografia em camada delgada^{3,25}, cromatografia a gás, cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa^{16,22}, cromatografia líquida de alta resolução, utilizando o método de Romer modificado¹ e Elisa²⁸. Para a detecção de DON e outros tricotecenos, reagentes cromogênicos têm sido usados. Três destes reagentes, nicotinamida e 2 —

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

acetilpiridina⁶, 4 — (p-nitrobenzil) piridina¹⁰, e ácido cromotrópico¹², são específicos para tricotecenos. Porém, as análises relatadas têm sido aplicadas em padrões e não nas micotoxinas extraídas de grãos de cereais e rações.

No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas em amendoim é alta^{4,11,13,14,15,16}, mas existem trabalhos^{17,19}, que demonstram que a incidência em milho é baixa. Com relação à incidência de tricotecenos pouco ou nada se conhece.

O objetivo deste trabalho é determinar deoxinivalenol pela técnica de cromatografia em camada delgada, cujos limites de detecção e reprodutibilidade são satisfatórios. Isto fornecerá dados sobre a incidência de DON, dando subsídios para a preservação da integridade dos grãos de cereais (principalmente milho e trigo) utilizados na produção de alimentos para o consumo humano e animal.

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 120 amostras de várias procedências, algumas adquiridas no comércio da cidade de São Paulo e outras enviadas para análise no Instituto Adolfo Lutz devido à suspeita de intoxicação em animais de criação. Estas eram constituídas de 50 amostras de milho em grão e 70 de trigo e derivados (farinha, farelo etc.).

O método empregado para análise foi o descrito por TRUCKSESS et alii²⁵, cuja representação esquemática está na figura 1.

A identificação, quantificação e recuperação do deoxinivalenol (DON) foram feitas pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de silicagel G 60 impregnadas com $AlCl_3$ 15%. Os resíduos finais das amostras foram dissolvidos em 200 μ l de clorofórmio-acetonitrila (4 + 1). Alíquotas de amostras (20 μ l para o trigo e 10 μ l para o milho) foram aplicadas nas placas, bem como alíquotas do padrão de concentrações conhecidas, e o cromatograma foi desenvolvido utilizando como fase móvel clorofórmio-acetona-isopropanol (8 + 1 + 1). Como alternativa, acetato de etila — éter etílico (1 + 1) — pode também ser empregado. Nos testes de recuperação, a segunda opção demonstrou melhor resolução.

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram aquecidas durante 7 minutos, sendo a visualização feita sob luz ultravioleta (366 nm) e, após comparação das intensidades das manchas fluorescentes (azul a um $R_f = 0,6$), foi calculado o teor de deoxinivalenol presente na amostra analisada.

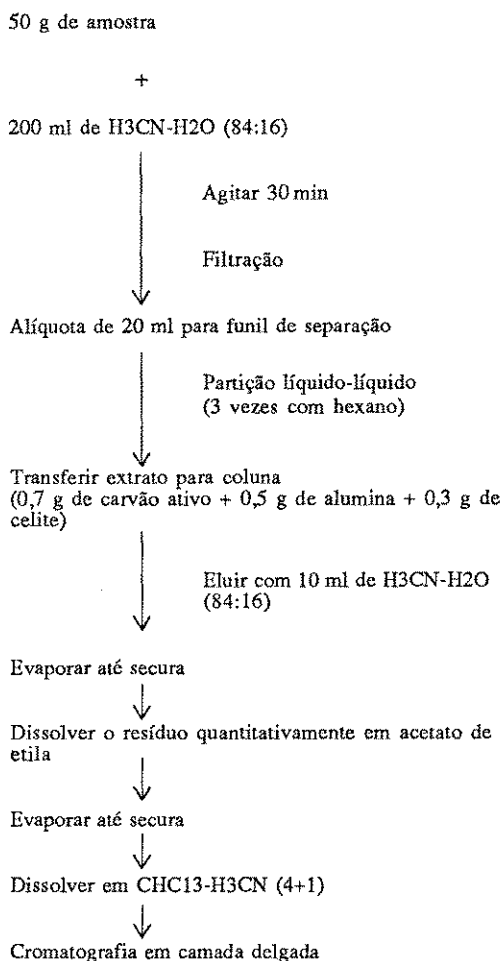


FIGURA 1 — Esquema de separação de deoxinivalenol

A determinação da concentração do padrão foi feita por espectrofotometria de absorção na região UV de acordo com AOAC²⁰, sendo que o padrão foi dissolvido sob agitação vigorosa em acetato de etila. A absorbância (A) foi medida em 260 nm; o peso molecular e absorvidade molar (E) de DON são 296 e 1.410, respectivamente. Para auxiliar a confirmação, foi realizada também a co-cromatografia, superpondo alíquotas de padrão nas alíquotas dos extratos das amostras no desenvolvimento do cromatograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Verificando a tabela 1, observa-se que não foi detectado deoxinivalenol em nenhuma das 50 amostras de milho analisadas.

TABELA 1

Níveis de DON em amostras de milho em grão determinadas por cromatografia em camada delgada

Procedências das amostras	Nº amostras analisadas	DON $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)
Estados Unidos	16	ND
São Paulo	14	ND
Santa Catarina	11	ND
Minas Gerais	4	ND
Rio Grande do Sul	5	ND
Total	50	

ND — não detectado: não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

TABELA 2

Níveis de DON em amostras de trigo determinados por cromatografia em camada delgada

Tipo de amostra	Nº amostras analisadas	DON $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)
Farinha de trigo comum	10	ND
Farinha de trigo especial	5	ND
Farinha de trigo integral	1	ND
Farelo de trigo	18	ND
Fibra de trigo	13	ND
Germe de trigo cru	9	ND
Germe de trigo torrado	9	ND
Trigo moído	2	ND
Farelo de trigo (como ração)	2	183
Trigo in natura	1	ND
Total	70	

ND — não detectado: não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

Observando-se a tabela 2, em que é mostrada a incidência de deoxinivalenol em 70 amostras de trigo, verificou-se que foi baixa, tendo sido detectada em apenas 2 amostras no teor de 183 $\mu\text{g}/\text{kg}$, amostras estas de farelo de trigo que estavam sendo utilizadas como ingrediente em ração e suspeitas de intoxicar os animais.

Os teores de deoxinivalenol foram expressos em $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) e o não aparecimento de fluorescência no cromatograma foi representado pela abreviatura ND (não detectado).

Os resultados de recuperação de deoxinivalenol adicionados em amostras de trigo e milho isentas de toxinas estão reportados na tabela 3.

Melhores resultados obtidos na recuperação foram no nível de 110 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sendo, portanto, nosso limite de determinação para os dois produtos (trigo e milho). Concentrações abaixo desta não foram de boa resolução tanto nas amostras de milho como nas amostras de trigo. TRUCKSESS *et alii*²⁵ obtiveram maior sensibilidade. O limite de determinação encontrado por estes autores foi de 40 ng/g para o trigo e 100 ng/g para o milho.

A concentração mínima por nós detectada foi de 22 ng/mancha, enquanto a concentração mínima detectável por TRUCKSESS *et alii*²⁵ foi de 20 ng/mancha. É importante salientar que a intensidade de fluorescência das manchas de DON depende da concentração de AlCl_3 impregnado na placa de sílica gel (15%) e também do tempo de aquecimento.

A não detecção do DON nas amostras de milho analisadas e a incidência em 3% das amostras de trigo não significa que o problema não existe. Outros estudos devem ser efetuados com um número maior de amostras.

Estudos realizados no Canadá têm mostrado que, em geral, os níveis de DON decrescem cerca de 40%

TABELA 3

Recuperação de DON adicionada em farinha de trigo e milho

Tipo de amostra	DON adicionada (ng/g)	Recuperação (média) %	dp	cv %
Trigo	110	90 (100, 80, 100, 80, 90)	10,0	11
Milho	110	85 (75, 86, 100, 80, 86)	9,3	11

dp = desvio padrão

cv = coeficiente de variação

durante o processamento industrial do trigo bruto para a obtenção da farinha, exceto no processo de fermentação para a produção de "donuts" que indica um aumento no teor de DON²¹.

TANAKA *et alii*²¹ verificaram a ocorrência da vários tricotecenos, entre eles do DON, em amostras de cereais, alimentos e rações procedentes de 19 países. Trigo, cevada, aveia, centeio, arroz, e seus produtos, totalizando 500 amostras, foram positivas para nivalenol, DON e zearalenona em 244, 223, 219 amostras, respectivamente. Cerca de 40 a 50% das amostras analisadas foram positivas para DON com uma concentração média de 292 ng/g.

A habilidade do fungo produzir a toxina é grandemente influenciada por fatores ambientais como temperatura e umidade. Portanto, análises seqüenciais de cereais são necessárias para dar maior valor na informação sobre o nível de freqüência da ocorrência da toxina fúngica.

TANAKA *et alii*²¹, de acordo com os dados acumulados, sugerem que a contaminação de ce-

reais, por exemplo, por nivalenol, não é problema local no Japão e outros países da Ásia. E detectado em várias amostras de cereais e alimentos procedentes de diferentes países e distritos. Em adição é importante salientar que há algumas diferenças entre países quanto ao nível e freqüência de nivalenol e DON em cereais. No Japão e Coreia, os níveis de nivalenol em trigo e cevada são muito mais altos do que o DON, enquanto na Argentina, Canadá, China, Polônia e Alemanha Ocidental, DON é o maior contaminante. Além disso, em um mesmo país há diferenças regionais.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos indicam que a incidência de DON não reflete uma preocupação mais séria como ocorre com aflatoxina em amendoim. Entretanto, estes dados poderiam ser atribuídos às condições ambientais (umidade e temperatura), necessitando de um estudo por um período mais longo e maior número de amostras de regiões distintas, a fim de se ter uma visão do nível e a freqüência da presença do DON em nosso meio.

RIALA6/673

SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Survey of deoxynivalenol in wheat and corn grain using thin-layer chromatography method. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):155-159, 1989.

ABSTRACT: the occurrence of deoxynivalenol was shown by thin-layer chromatography in samples of corn grain and wheat from various places of the city of São Paulo. Of 120 samples analysed, two had deoxynivalenol at levels of 183 µg/kg. The limit of DON determination is about 110 µg/kg. Recoveries of DON added to wheat and corn ranged from 80 to 100% and 75 to 100%, respectively. The coefficient of variation obtained with artificially contaminated samples was 11% for both wheat and corn.

DESCRIPTORS: deoxynivalenol; analysis corn; wheat; thin layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANG, H.L.; DEVRIES, J.W.; LARSON, P.A. & PATEL, H.H. — Rapid determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by liquid chromatography using modified Romer column cleanup. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:52-4, 1984.
2. CÔTÉ, L.M.; NICOLLETTI, J.; SWANSON, S.P. & BUCK, W.B. — Production of deepoxy deoxynivalenol (DOM-1), a metabolite of deoxynivalenol, by in vitro rumen incubation. *J. agric. food Chem.*, 34:458-60, 1986.
3. EPPLEY, R.M.; TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; THORPE, C.W.; WOOD, G.E. & POHLAND, A.E. — Deoxynivalenol winter wheat: thin layer chromatographic method and survey. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:43-5, 1984.
4. FONSECA, H. — Contribuição e estudo de aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea* L.) da colheita à industrialização. Piracicaba 1969. 98p. [Tese livre docência — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós" — Universidade de São Paulo].
5. FORSYTH, D.M.; YOSHIZAWA, T.; MOROOKA, N. & TUIE, J. — Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. environ. Microbiol.*, 34:547-52, 1977.
6. JOSEFSSON, E. & MOLLER, T.E. — Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin, and zearalenone in cereals. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:1369-71, 1977.
7. KHERA, K.S.; ARNOLD, D.L.; WHALEN, C.; ANGERS, G. & SCOTT, P.M. — Vomitoxin (4-

- Deoxynivalenol): Effects on reproduction of mice and rats. *Toxicolog. appl. Pharmacol.*, 74:345-56, 1984.
8. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; SCHAUERHAMER, B. & CHRISTENSEN, C.M. — Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:553-6, 1976.
 9. PATHRE, S.V. & MIROCHA, C.J. — Trichothecenes: natural occurrence and potential hazard. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 56:820-823, 1979.
 10. PATTERSON, D.S.P. & ROBERTS, B.A. — Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone, and T-2 toxin. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62: 1265-67, 1979.
 11. PRADO, G. - Incidência de aflatoxina B1 em alimentos. *Rev. Farm. Bioquim.*, 5: 147-57, 1983.
 12. ROBERTS, B.A.; GLANCY, E.M. & PATTERSON, D.S.P. — Rapid, economical method for determination of aflatoxin and ochratoxin in animal feedstuffs. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 64:961 - 3, 1981.
 13. SABINO, M. — Variações de níveis de aflatoxina B1 em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:153-8, 1980.
 14. SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. — Aflatoxina B1 em feijão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:837-7, 1981.
 15. SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Variação dos níveis de aflatoxina B1 em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42:39-44, 1982.
 16. SCOTT, P.M. — Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 65:876-83, 1982.
 17. SCUSSEL, V.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. — Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980/82. *Bol. Soc. bras. Ciênc. Tecnol. Alimen.*, Campinas, 19:109-19, 1985.
 18. SCUSSEL V.M.; RODRIGUEZ -AMAYA, D.B. & SILVA, W.J. — Incidência de aflatoxina em milho (*Zea mays L.*) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 6:75-85, 1986.
 19. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. — Survey of aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by Using Multi - toxin Thin-Layer Chromatographic Method. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 72:22-6, 1989.
 20. STOLOFF, L. & SCOTT, P.M. — Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists 14 th ed.* Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1984. p. 479 [item 26009].
 21. 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. 1. Survey of 19 countries. *J. agric. Food Chem.*, 36:979-83, 1988.
 22. TERHUNE, S.J.; NGUYEN, N.V.; BAXTER, J.A.; PRYDE, D.H. & QURESHI, S.A. — Improved gas chromatographic method for quantitation of deoxynivalenol in wheat, corn and feed. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:1102-04, 1984.
 23. TRENHOLM, H.L.; COCHRANE, W.P.; COHEN, H.; ELLIOT, J.L.; FARNWORTH, E.R.; FRIEND, D.W.; HAMILTON, R.M.G.; STANDISH, J.F. & THOMPSON, B.K. — Survey of vomitoxin contamination of 1980 Ontario white winter wheat crop: results of survey and feeding trials. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 66:92-7, 1983.
 24. TRENHOLM, H.L.; THOMPSON, B.K.; HARTIN, K.E.; GREENHALGH, R. & McALLISTER, A.J. — Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol) contaminated wheat by nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 68:1000-5, 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.*, 67:40-3, 1984.
 26. VESONDER, R.F.; CIEGLER, A. & JENSEN, A.H. — Isolation of the emetic principle from Fusarium infected corn. *Appl. Microbiol.*, 26:1008-10, 1973.
 27. VESONDER, R.F.; CIEGLER, A.; JENSEN, A.H.; ROHWEDDER, W.K. & WEISLEDER, D. et alii — Co-identity of the refusal and emetic principle from Fusarium infected corn. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:280-5, 1976.
 28. XU, YI-CHUN; ZHANG, G.S. & CHU, FUN S. — Enzyme-Linked Immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat. *J. Assoc. off. anal. chem.*, 71(5):945-9, 1988.
 29. YOSHIZAWA, T. & MOROOKA, N. — Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from Fusarium roseum and moldy barley. *Agric. biol. Chem.*, 37:2933-34, 1973.
 30. YOSHIZAWA, T.; TAKEDA, H. & OHI, T. — Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 2133-5, 1983.
 31. YOUNG, J.C.; FULCHER, R.G.; HAYHOE, J.H.; SCOTT, P.M. & DEXTER, J.E. — Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern canadian wheats. *J. agric. Food Chem.*, 32(3): 659-64, 1984.

Recebido para publicação em 10 de abril de 1989.

