

## Zearalenona e desoxinivalenol em trigo brasileiro – cenário sobre necessidade de monitoramento analítico

## Zearalenone and deoxynivalenol in Brazilian wheat – cenary requesting for analytical monitoring

Joice Sifuentes dos Santos<sup>1</sup>, Elisabete Yurie Sataque Ono<sup>2</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>3</sup>, Elisa Yoko Hirooka<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Ciência de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. Bolsista do CNPq do Brasil.

<sup>2</sup>Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>3</sup>Docente do Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. Bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq do Brasil

### Endereço para correspondência:

Joice Sifuentes dos Santos

e-mail: joice.sifuentes@gmail.com

### Resumo

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial agropecuário, favorecido pelo fator climático e extensão do território nacional, sendo um dos raros países ainda com possibilidade de expandir a fronteira agrícola sem afetar a área de preservação ecológica. Aliado à preocupação com a ampliação da área plantada e rendimento das mais variadas *commodities*, o país também deve se preocupar com a qualidade do alimento produzido, seja para o consumo interno quanto à exportação. Micotoxinas constituem toxinas naturais de ocorrência inevitável em produtos de origem vegetal, sendo o constante monitoramento um requisito obrigatório na rotina de controle de qualidade. Metodologias analíticas sem o uso de solventes tóxicos e equipamentos sofisticados têm sido uma meta na inserção de nanotecnologia na análise laboratorial. Zearalenona e desoxinivalenol são toxinas produzidas principalmente por *Fusarium graminearum*, responsável pela fusariose em trigo, um dos principais alimentos da cadeia alimentar humana. A revisão compila informações enfocando a química, bioquímica, toxicologia e perigo de contaminação por meio do consumo de trigo e produtos derivados.

**Palavras-chave:** micotoxinas, zearalenona, desoxinivalenol, trigo, toxicidade.

### Abstract

Brazilian agri-food system plays an important role in the world agribusiness, due to its favorable climatic condition and huge territorial land. Brazil is classified as an exceptional country with possibility of further expansion of agricultural frontier without ecological preservation damage. In addition to care concerning the enlargement of cultivated area and *Biosaúde*, Londrina, v. 12, n. 1 / 2, 2010

commodities yield, the country has to improve the food quality for both internal consumption and exportation. Mycotoxins are natural toxins of unavoidable occurrence in vegetable origin products, where the continuous monitoring is requested in the routine of quality control. Analytical methodologies avoiding the use of toxic solvents and sophisticated equipments have been the goal of the rapid nano-laboratorial analysis. Zearalenone and deoxynivalenol are toxins produced mainly by *Fusarium graminearum*, which causes Fusarium head blight in wheat, that is the major ingredient in food. The review compiles recent information focused on chemistry, biochemistry and toxicological hazard due to the use of contaminated wheat and derived products.

**Keywords:** mycotoxins, zearalenone, deoxynivalenol, wheat, toxicity.

## INTRODUÇÃO

Alimentos isentos de contaminantes tóxicos constituem assunto prioritário na saúde humana, cuja preocupação crescente tem exigido rigoroso controle. As micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos, relevantes na toxicologia humana e animal, sendo classificados na categoria de “toxinas naturais” <sup>(1)</sup>. *Fusarium* spp. constitui fitopatógeno freqüente em grãos como trigo, milho, cevada, entre outros. O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um alimento de consumo mundial, sendo um dos ingredientes mais difundidos na dieta humana. *Fusarium graminearum* causa fusariose ou giberela e predomina no trigo contaminado, sendo a mais importante doença desta cultura. O fato constitui motivo de perda econômica devido à redução na produtividade, além da produção de metabólitos secundários tóxicos pertencentes ao grupo de tricotecenos e zearalenona. Entre tricotecenos do grupo B, o desoxinivalenol ou vomitoxina induz vômito e conseqüente perda de peso, principalmente em suínos, enquanto que zearalenona causa problemas reprodutivos devido ao hiperestrogenismo. Esta revisão enfoca a química, bioquímica e toxicologia de zearalenona e desoxinivalenol, bem como o perigo de contaminação oriundo de rotineiro consumo de trigo e produtos derivados.

### Trigo

O trigo, originário do Oriente Médio (Ásia), cultivado no Brasil desde 1534, foi introduzido pelos imigrantes portugueses <sup>(2)</sup>. Ocupando cerca de 20% da área mundial cultivada, é um dos principais alimentos da humanidade, cuja produção aproximada de 500 milhões de toneladas/ano concentra-se na Rússia, Ucrânia, Estados Unidos, China, Índia e França, responsáveis pela oferta de 60% da produção.

No Brasil, a produção de trigo atingiu 4.710.158 toneladas no ano 2005, valor que diminuiu na safra de 2007, chegando a 3.870.194 toneladas. Em 2005, o Estado do Paraná contribuiu com a maior parcela nacional (60% da produção, 2.816.253 ton), seguido pelos Estados do Rio Grande do Sul (1.392.327 ton), Mato Grosso e São Paulo (136.000 ton cada) <sup>(3)</sup>. No entanto, o consumo nacional é de cerca de 10 milhões de toneladas, havendo a necessidade de importação do produto <sup>(4)</sup>.

O trigo brasileiro (*Triticum aestivum* L) atinge 0,5 a 1,5 m de altura e apresenta raiz em forma de cabeleira, caule oco e reto (colmo), 6 a 9 folhas estreitas e compridas; as flores em grupo de 3 a 5 formam espiguetas, agrupados em número de 15 a 20, constituindo a espiga. O fruto (grão) é uma cariopse seca e pequena, cujo desenvolvimento é concluído 30 dias após a fecundação. Sendo cereal de clima temperado e moderadamente seco, geadas no início do desenvolvimento favorecem a produtividade, uma vez que estacionam o crescimento vegetativo em favor do sistema

radicular. Todavia, as geadas tardias, no estágio da floração, são totalmente desfavoráveis, com o conseqüente abortamento de flores.

A composição centesimal deste grão é 12,38 g de umidade; 12,81 g de proteínas; 1,53 g de cinzas; 1,89 g de lipídios, 14,67 g de fibra alimentar e 56,72 g de carboidratos disponíveis <sup>(5)</sup>. O teor máximo de umidade tecnicamente recomendada para a conservação e empacotamento do trigo é 13% <sup>(6)</sup>.

O trigo representa aproximadamente 20% das calorias na dieta humana, tornando-o componente importante na alimentação. Os derivados imediatos consistem de farinha branca e integral para a produção de pão, macarrão, bolo, massas (tortas, empadas, pastéis), panqueca, pizza, assim como o trigoilho utilizado no preparo de quibe, torta de quibe, tabule e produtos diversos <sup>(7)</sup>. Os produtos a base de trigo fornecem proteínas de alto valor biológico e carboidratos complexos (principalmente amido e fibras), bem como vitaminas do complexo B e ferro <sup>(7)</sup>.

### **Importância de *Fusarium* spp. na cultura do trigo**

O gênero *Fusarium* se distribui amplamente na natureza, seja como saprófitas ou parasitas de plantas, encontrado numa grande variedade de plantas e produtos agrícolas, principalmente cereais. Entre as espécies de *Fusarium*, na cultura do trigo predomina o *Fusarium graminearum*, capaz de colonizar também o milho, cevada e outros cereais <sup>(8)</sup>.

As toxinas fúngicas produzidas na pré-colheita são denominadas toxinas de campo, onde se enquadram os tricotecenos, fumonisinas e zearalenona. As produzidas na pós-colheita constituem as toxinas de armazenamento, a exemplo de ocratoxina e aflatoxinas <sup>(9)</sup>.

As espécies de *Fusarium* são normalmente responsáveis pela produção de toxinas de campo, com destaque a *Fusarium graminearum* Schwabe, causador da fusariose ou giberela em trigo. *F. graminearum* é a fase assexual do fungo *Giberella zeae* <sup>(10)</sup>. A giberela constitui em envolturas florais de espiga infectada, surgindo pequenas massas rosadas constituídas pelos esporos do patógeno (“espiga-branca”). A giberela é uma doença de infecção floral, cujos esporos caem sobre as anteras expostas, germinam e emitem micélios e, através de filete atinge o ovário. A instalação da infecção requer um prolongado período de molhamento da espiga (30 a 48 horas) e temperatura entre 22 e 25°C <sup>(2)</sup>. A doença resulta em perdas na produção de até 50% <sup>(11)</sup> e contaminação adicional com zearalenona, desoxinivalenol e outros tricotecenos (nivalenol, toxina T-2, toxina HT-2 <sup>(12)</sup>. Além disso, a fusariose destrói os grânulos de amido e paredes celulares, afetando a estocagem de proteínas do endosperma, resultando em uma baixa qualidade do produto <sup>(13)</sup>. Devido à característica hidrossolúvel de desoxinivalenol e deslocamento no floema, assume-se que ocorra fluxo desta micotoxina para tecidos não infectados por *Fusarium* spp.

Entre os fatores que influenciam o aparecimento da fusariose, o clima é um fator determinante. No entanto, em um determinado ano, campos vizinhos podem desenvolver diferentes níveis de contaminação, em razão da influência do sistema de plantio <sup>(9)</sup>. O uso de fungicidas no decorrer do plantio de trigo não garante a ausência de toxinas no grão colhido. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem na produção de metabólitos fúngicos, podendo ocorrer produção simultânea de micotoxinas <sup>(14)</sup>. O atual estímulo à produção orgânica parece reduzir as taxas de infecção de fusariose e conseqüente menor contaminação por micotoxinas, se comparado ao sistema convencional de produção <sup>(15)</sup>.

O controle estratégico de giberela baseia-se no desenvolvimento de cultivares resistentes e uso de fungicidas aplicados na parte aérea na fase de floração. Existem características morfológicas que auxiliam na proteção contra a infecção <sup>(13)</sup>. No trigo,

plantas altas sem barba e plantas com espigas frouxas, tendem a menores taxas de infecção natural do que plantas de porte menor com barbas. A giberela classifica-se como doença de difícil controle <sup>(10)</sup>. Para o controle citam-se os fungicidas metoconazole, procloraz, propioconazole e tebuconazole <sup>(16)</sup>. A resistência à fusariose pode ser caracterizada por dois componentes: resistência à penetração inicial (tipo I) e resistência à propagação do patógeno no tecido hospedeiro (tipo II) <sup>(13)</sup>.

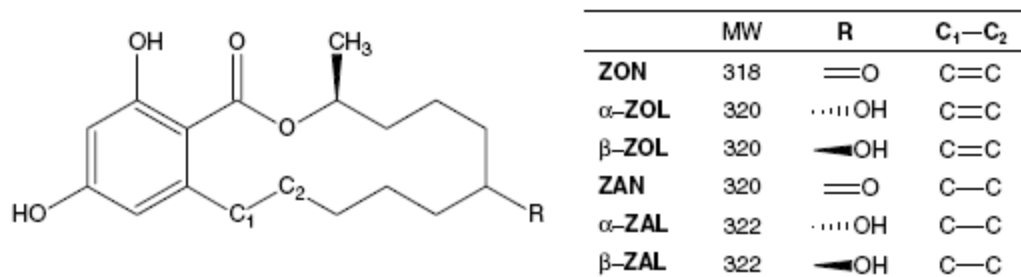
As micotoxicoses produzem uma variedade de sinais clínicos, dependendo de fatores como o tipo e concentração da micotoxina, duração da exposição e grau, gênero, idade e saúde do animal. Uma exposição prolongada resulta em imunodepressão, i.e. aumento da suscetibilidade a doenças secundárias causadas por vírus, bactérias e fungos <sup>(17)</sup>. Também deve-se considerar o fator sinérgico entre as diversas micotoxinas e fatores toxicológicos ambientais, resultando em multiplicação de efeitos adversos à saúde humana e animal.

### Zearalenona

A estrutura química de zearalenona (ZEA) consiste de 6 (10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecil)- $\beta$ -ácido resorcílico-lactona, com os comprimentos de onda máximos de absorção em 236, 274 e 316 nm, sendo solúvel em soluções alcalinas, éter, benzeno, acetonitrila, álcool etílico, mas insolúvel em água <sup>(8)</sup>. Sendo um metabólito secundário estrogênico, causa alterações no sistema reprodutivo de animais domésticos e laboratoriais. A produção de ZEA tem sido reportada em grãos no campo, durante a colheita, processamento e/ou durante a estocagem de alimentos ou rações contendo grãos contaminados. O efeito tóxico de zearalenona e respectivos metabólitos ocorre principalmente devido à semelhança com os estrogênios naturais, estradiol, estrona e estriol, interagindo com receptores estrogênicos através de competição com o 17 $\beta$ -estradiol <sup>(8)</sup>.

Esta micotoxina induz hiperestrogenismo em animais, especialmente em fêmea de suínos <sup>(18)</sup> e gados <sup>(19)</sup>. A síndrome hiperestrogênica inclui aumento uterino, inchamento da vulva, glândulas mamárias e mamilos, prolapso da vagina ou reto, prolongamento ou interrupção do cio e pseudo-prenhez <sup>(20)</sup>. O  $\alpha$ -zearalenol, um análogo de zearalenona, foi produzido sinteticamente a partir de ZEA e utilizado como promotor do crescimento animal nos Estados Unidos e outros países, mas banido desde 1985 pela União Européia <sup>(21)</sup>.

Diversos efeitos tóxicos foram reportados em humanos envolvendo consumo de cereais contaminados com *Fusarium* spp., como esofagite e câncer esofágico na China e Coréia do Sul <sup>(22)</sup>; puberdade prematura em jovens de Porto Rico e Hungria; câncer cervical e hiperplasia de endométrio na Polônia <sup>(8)</sup> e leucemia tóxica alimentar (*alimentary toxic aleukia*) na Rússia <sup>(23)</sup>.



**Figura 1.** Estrutura química de zearalenona e análogos. ZON= zearalenona;  $\alpha$ -ZOL=  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -ZOL=  $\beta$ -zearalenol, ZAN= zearalanona,  $\alpha$ -ZAL=  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL=  $\beta$ -zearalanol, MW= massa molecular.

No Brasil, poucos trabalhos sobre avaliação de zearalenona em trigo têm sido reportados. Vieira et al. <sup>(24)</sup> analisando 54 amostras de farinha de trigo no Rio Grande do Sul, detectaram 25,9 % de amostras com possível contaminação por zearalenona, sendo esta confirmada em uma amostra com 52,88 µg/kg, empregando cromatografia em camada delgada (CCD).

Tutelyan <sup>(25)</sup>, analisando 839 amostras de trigo da Rússia entre as safras 1992 e 2002, detectou zearalenona em 7 %, sendo que a contaminação variou de 10 a 1480 µg/kg, estando uma amostra com nível superior ao limite máximo de exposição tolerável.

Quiroga et al. <sup>(26)</sup> analisaram amostras de trigo das safras de 1986 e 1989-1992 na Argentina utilizando CCD e detectaram contaminação por ZEA em 8,4 % das amostras, sendo das safras de 1986 (média total de 109,9 µg/kg) e 1991 (16,6 µg/kg). Os autores relataram que entre os anos de 1985 e 1986, as condições climáticas foram favoráveis à contaminação, sendo necessárias medidas de controle rígidas antes do armazenamento.

### **Desoxinivalenol**

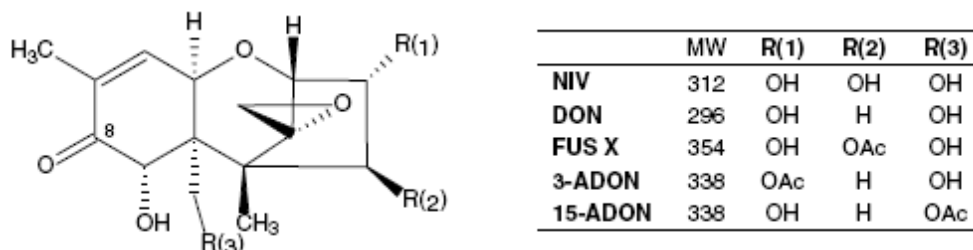
A toxina desoxinivalenol (DON) pertence ao grupo de tricotecenos da família de sesquiterpenóides, caracterizada pela estrutura química contendo principalmente uma dupla ligação entre as posições C9,10, um anel epóxido na posição 12,13 e um número variável de grupos hidroxila e acetil. Embora o número de tricotecenos identificados e caracterizados supere os 150 compostos análogos, somente poucos são detectados em cereais naturalmente contaminados, pertencendo principalmente a grupo de tricotecenos do tipo A ou B. Os tricotecenos do tipo A (toxina T-2, toxina HT-2, neosalaniol e diacetoxiscirpenol) não possuem função carbonila C8 conjugada à dupla ligação C9-10, impedindo a absorção de radiação ultravioleta. Em contraste, os tricotecenos do tipo B (desoxinivalenol e nivalenol) contém um grupo carbonila no C8, portanto, esta conjugação com a dupla C9-10, permite detecção empregando radiação ultravioleta.

DON tem sido a toxina de *Fusarium* spp. mais frequentemente reportada no mundo, assim como detectada em maior concentração, sendo considerada como “toxina indicadora” de contaminação por este grupo de fitopatógeno <sup>(27)</sup>.

Devido à toxicidade, os tricotecenos são classificados como toxinas gastrintestinais, dermatotoxinas, imunotoxinas, hematotoxinas e genotoxina <sup>(17)</sup>. Em cães, gatos e aves, os sintomas de toxicose aguda por tricotecenos incluem inflamação dérmica, taquicardia, diarreia, edema, necrose dérmica, hemorragia na mucosa estomacal e intestinal, distúrbios no sistema hematopoético, incluindo leucopenia, trombocitopenia, sangramento no cérebro, danos aos nervos e rejeição a alimentos <sup>(28)</sup>. Os efeitos crônicos se manifestam principalmente através de atrofia ou hiperplasia do sistema hematopoético, tumores de tireóide, dutos biliares e hipotálamo, hiperqueratose inflamatória do estômago, bem como papilomas e efeitos imunossupressores <sup>(28)</sup>. Necrose da cavidade bucal é freqüente em aves. Entre os tricotecenos, DON ou vomitoxina, tem como principal efeito tóxico o decréscimo ou rejeição de alimentação, vômitos e distúrbios digestivos com conseqüente perda de peso. Os suínos são os mais suscetíveis, se comparados a aves e ruminantes.

A elevada estabilidade de DON dificulta a sua redução, seja na estocagem ou durante o processamento térmico como cozimento, assamento ou fermentação <sup>(27)</sup>. Uma elevada contaminação por *Fusarium* spp. em trigo tem sido associada à perda na qualidade de panificação e redução no volume de pão. Portanto, medidas preventivas

desde o início do cultivo no campo tornam-se essenciais para evitar matéria-prima contaminada.



**Figura 2.** Estrutura química de tricotecenos e análogos. NIV= nivalenol, DON= desoxinivalenol, FUS X= fusarenona X, 3-ADON= 3- acetil desoxinivalenol, 15-ADON= 15-acetil desoxinivalenol, MW= massa molecular.

Sabino et al. <sup>(29)</sup> avaliando 70 amostras de trigo brasileiro, detectaram contaminação em apenas 2 amostras de farelo de trigo, com níveis de 183 µg/kg, sendo estas amostradas de matéria-prima utilizada como ingrediente de ração em caso suspeito de intoxicação. Segundo os autores, a ocorrência de DON nesta avaliação de 1989 não refletiu uma preocupação alarmante, sendo os baixos níveis detectados atribuídos às condições ambientais (umidade e temperatura). Portanto, o monitoramento deve prosseguir, ampliando o período e envolvendo maior número de amostras de regiões distintas, para obter visualização geral do nível e frequência da presença de DON no país.

Pesquisadores brasileiros <sup>(30)</sup> detectaram DON em 94% das amostras de trigo nacional (50 amostras) analisado e 88% de trigo importado (50 amostras, safra de 2005). O trigo nacional apresentou uma contaminação média de 332 µg/kg, enquanto o trigo importado apresentou uma contaminação estatisticamente inferior (90 µg/kg;  $p < 0,05$ ). As amostras de trigo nacional eram provenientes do Estado do Paraná (28%), São Paulo (28%) e Rio Grande do Sul (8%); o trigo importado da Argentina e Paraguai (50% de cada país).

Lamardo et al. <sup>(31)</sup> analisando 28 amostras de trigo comercial nacional, detectaram DON em 50% das amostras de farinha de trigo, com contaminação média de 296,3 µg/kg (amostras positivas), enquanto 33% das amostras de trigo em grão apresentaram contaminação de 753,2 µg/kg (média das amostras positivas) por CCD, sendo alguns confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tutelyan <sup>(25)</sup> avaliou 2166 amostras de trigo estocados entre 1989 e 2002 na Rússia e detectou DON em 69%. Entre as amostras positivas, o nível de DON variou de 50 a 8600 µg/kg, com 37% ultrapassando o limite máximo de exposição tolerável, empregando CCD e CLAE.

Quiroga et al. <sup>(26)</sup> analisaram amostras de trigo da Argentina entre os anos de 1985 e 1992 e, detectaram contaminação em 49,6% das amostras com DON em níveis variando de não detectável (safra 1990 e 1992) a 40,8 µg/kg (safra -1986), empregando CCD.

Lori et al. <sup>(32)</sup> analisando 145 amostras de trigo duro de cinco localidades da província de Buenos Aires-Argentina, detectaram níveis entre 0 e 8,44 µg/kg por CCD, sendo os níveis inferiores aos registrados na safra 1986.

Schollenberger et al. <sup>(33)</sup> avaliaram 5 amostras de trigo contaminadas na Alemanha, procedendo análise de DON por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os níveis de DON variaram de 31 a 95 µg/kg, abaixo dos limites máximos permitidos naquele país (500 µg/kg).

### Legislação e detoxificação

O limite máximo de zearalenona em milho e cevada no Uruguai é de 200 µg/kg. No Canadá, o limite para desoxinivalenol em ração para gado e ave é de 5000 µg/kg e para porcos, novilhas e animais em lactação de 1000 µg/kg. Na Alemanha, os limites de ZEA e DON em grãos para uso como alimento e seus produtos são 50 e 500 µg/kg, respectivamente, exceto para DON em pães e correlatos, onde não deve exceder 350 µg/kg<sup>(33)</sup>. Na França, o limite de zearalenona em cereais e óleos vegetais é de 200 µg/kg.

Estratégias de detoxificação para alimentos e rações contaminados para reduzir ou eliminar os efeitos tóxicos de micotoxinas por métodos químicos, físicos e biológicos são cruciais para a segurança, prevenção de perdas econômicas e recuperação de alimentos contaminados. Alguns processos são apresentados em revisão publicada por Zinedine et al.<sup>(34)</sup>. Degradação e detoxificação ocorrem sob altas concentrações de ozônio (O<sub>3</sub>). Também relata-se a destruição de micotoxinas por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dependente de concentração, temperatura e período de exposição. A extrusão de determinados produtos de cereais, amplamente utilizada na indústria para fabricação de cereais matinais, petiscos e ração para pequenos animais melhora a qualidade de produtos processados, além do potencial redutor nos níveis de micotoxinas. Conforme Ryu et al.<sup>(35)</sup>, os níveis de zearalenona reduziram 83% em cereais extrusados. No entanto, ainda existe a necessidade de demonstrar se a toxicidade ou atividade biológica de ZEA foi apenas reduzida ou completamente eliminada neste tipo de produto. Adição de adsorventes nutricionalmente inertes (aluminossilicatos e aluminossilicatos contendo argila) tem sido recentes propostas para reduzir a toxicidade de micotoxinas, mas questiona-se o efeito na biodisponibilidade de nutrientes essenciais traços<sup>(36)</sup>. Colestiramina (sal biliar) foi testada e confirmada como agente protetor contra micotoxinas<sup>(37)</sup>. Abordagem promissora com menor efeito colateral tem sido o uso de polissacarídeos naturais de origem microbiana, incluindo bactérias, leveduras e fungos<sup>(34)</sup>. Estes fatos indicam a importância de boas práticas de produção do alimento em nível de campo e/ou armazenagem, i.e., o melhor procedimento para evitar a contaminação de micotoxinas nos alimentos, devendo-se considerar desde a escolha de híbridos, manejo, plantio até as condições climáticas.

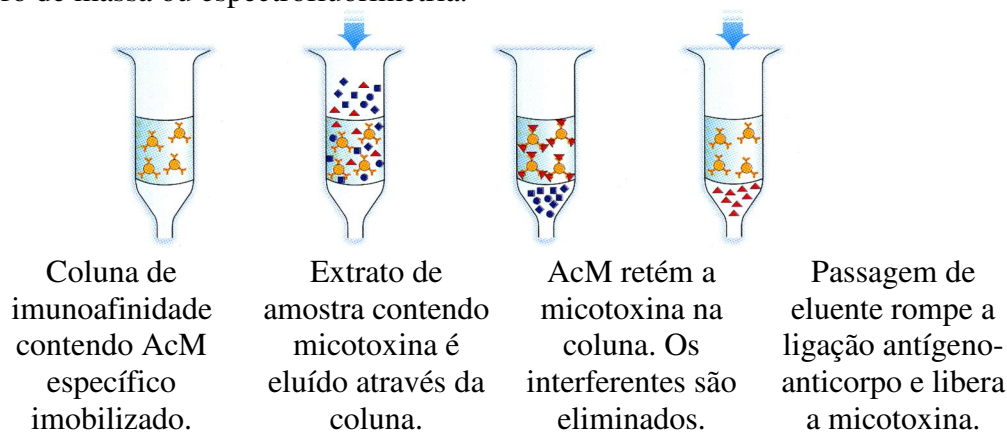
### Metodologia analítica

A análise de contaminantes em grãos e produtos vegetais não é simples. Diversas variáveis devem ser cuidadosamente controladas, sendo essencial uma amostragem adequada de quantidade representativa do material inicial; tratamento, estocagem, preparação e subamostragem de uma amostra, para garantir a real representatividade do material testado. Além disso, a análise também se complica pela possível heterogeneidade do material inicial e pela presença de contaminantes provenientes da estocagem ou distribuição. Durante a análise, testes como precisão, exatidão e limite de detecção são necessários para garantir que os níveis medidos sejam representativos do material de partida e que os erros analíticos sejam minimizados<sup>(38)</sup>.

Para pré-limpeza (*clean-up*), as técnicas utilizadas podem ser agrupadas em químicas e imunológicas. Entre as técnicas químicas, a extração em fase sólida tem sido o método mais freqüente (SPE, do inglês *solid phase extraction*). A metodologia emprega os mais diversificados materiais, sendo basicamente adsorventes, a exemplo de carvão-alumina<sup>(39)</sup>, resina de troca iônica<sup>(40)</sup>, sílica<sup>(40)</sup>, florisil<sup>(40, 41)</sup>, carbono preto grafitizado<sup>(42)</sup> e colunas MycoSep®<sup>(40, 43)</sup>. A dificuldade no uso destes materiais deve-se ao seu alto custo, impossibilidade de reutilização e manutenção de interferentes no extrato obtido. Para eliminar estes problemas, nos últimos anos, as colunas de

imunoafinidade (CIA) produzidas com anticorpos monoclonais de alta especificidade e sensibilidade têm sido desenvolvidas para obter extratos limpos, minimizando o efeito da interferência de matriz <sup>(40, 44, 45)</sup>.

A CIA contém anticorpo anti-micotoxina imobilizado em suporte como sílica ou Affi-gel® em tampão fosfato, empacotado em pequeno cartucho plástico (Figura 3). A micotoxina (antígeno) se liga ao anticorpo, sendo a impureza removida com água ou tampão. A micotoxina é eluída com pequena quantidade de solvente (metanol, metanol:água) e a micotoxina analisada por métodos como CLAE, CLAE acoplada a espectrômetro de massa ou espectrofluorimetria.



**Figura 3.** Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade. (Fonte: R-BIOPHARM RHÔNE Ltd., USA).

Métodos analíticos convencionais para análise de micotoxinas incluem cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG).

CCD para ZEA e DON geralmente utiliza sílica gel como adsovente <sup>(46)</sup>. Para zearalenona, os solventes empregados geralmente são clorofórmio misturado com metanol, hexano e acetona, ou tolueno:acetato de etila. A ZEA exibe fluorescência esverdeada sob luz ultravioleta a 274 nm, enquanto que o tratamento com ácido sulfúrico a 50% torna ZEA visível como um ponto amarelo/marrom. Para o desenvolvimento de DON, uma mistura de solventes orgânicos, como clorofórmio:acetona:isopropanol, é indicada pela AOAC <sup>(47)</sup>. Como DON não é fluorescente, para visualização a cromatoplaça é borrifada, por exemplo, com cloreto de alumínio.

A determinação de tricotecenos emprega CLAE com detector de ultravioleta (UV) e arranjo de fotodiodo <sup>(47)</sup>. Na maioria dos métodos, a separação ocorre em colunas C-18 de fase reversa, com misturas metanol e água ou acetonitrila como fase móvel. Para ZEA, o detector de fluorescência é o mais utilizado, com comprimento de onda de excitação entre 278-280 nm e emissão 450-470 nm.

Entre os métodos atualmente disponíveis para determinação de ZEA e DON em diversas matrizes, CLAE tem sido o método preferido. CLAE proporciona uma maior sensibilidade que CCD e requer procedimentos de purificação mais simples que os necessários para CG <sup>(40, 44, 45)</sup>. No entanto, determinadas micotoxinas não possuem grupos cromóforos quando expostos à radiação UV, necessitando de derivatização para atingir baixo nível de detecção requerido em alimentos naturalmente contaminados <sup>(40)</sup>. Segundo Ware et al. <sup>(49)</sup>, CLAE com detector de fluorescência foi aceito como primeiro método oficial para determinação de ZEA pela AOAC por apresentar fluorescência



natural. No entanto, segundo De Saeger et al. <sup>(20)</sup>, o detector de fluorescência apresenta sensibilidade muito menor, sendo desenvolvidas técnicas de detecção por UV.

A metodologia mais recente tem utilizado CLAE acoplada com espectrometria de massa <sup>(48)</sup>, apresentando a vantagem de acoplar o caráter confirmatório. Para análise de ZEA e DON, a fonte de ionização pode ser APCI (*atmospheric pressure ionization*) ou ESI (*electrospray ionization*), nos modos negativo e positivo. Todavia, a ionização no modo negativo tem sido mais aplicada na análise destas duas micotoxinas, por permitir a obtenção de resultados com maior sensibilidade e seletividade <sup>(50, 51, 52)</sup>.

A competitividade na indústria de alimentos e rações envolve grande redução de custo, com menor mão-de-obra e resultados imediatos. Métodos rápidos têm conquistado cada vez mais importância, devido ao menor custo, facilidade no uso e possibilidade de análise in loco. Normalmente, a expressão “método rápido” refere-se a um método muito mais rápido do que o método referência, e tem o objetivo de promovê-lo <sup>(53)</sup>. A maioria destes métodos fornecem resultados qualitativos ou semi-quantitativos em minutos, sendo recomendados para triagem.

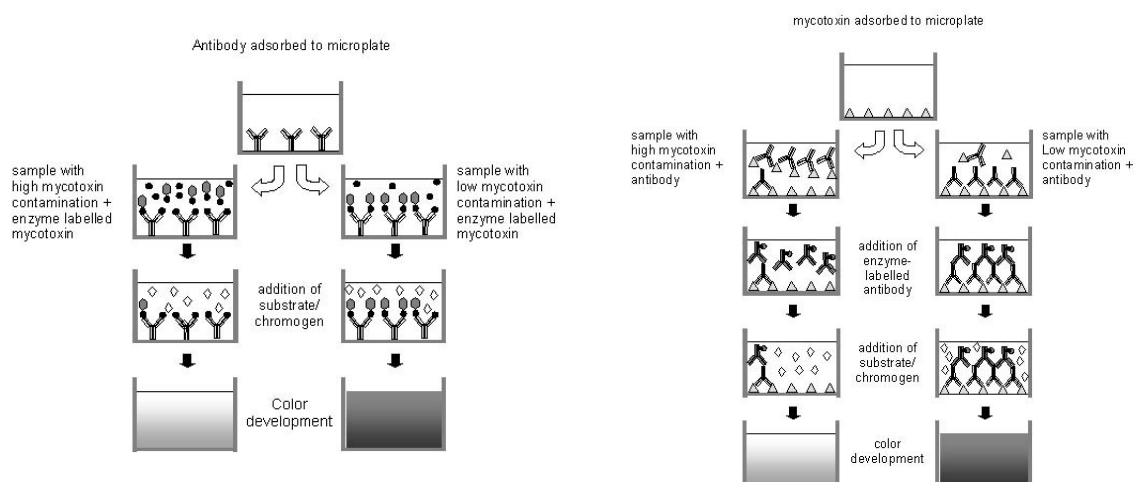
As técnicas de imunoensaio são procedimentos analíticos baseados na ligação não covalente entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) e, desenvolvidos para detectar o Ag ou Ac <sup>(54)</sup>. A produção de Ac anti-micotoxina envolve anticorpo monoclonal (AcM) empregando hibridoma. Devido a característica de hapteno de micotoxinas, ocorre a necessidade de obtenção de conjugado toxina-proteína produzido com toxina cancerígena de alta pureza, em escala de rotina. Os hibridomas são células especiais, produzidas pela fusão de linfócitos B e células tumorais (mieloma), tendo a capacidade de proliferar, produzindo AcM específico para a confecção da coluna de imunoafinidade com alta afinidade e especificidade de ligação, homogeneidade e em quantidades ilimitadas.

Os métodos de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para micotoxinas estão disponíveis comercialmente há décadas, sendo a tecnologia baseada na capacidade de um Ac específico distinguir estrutura tridimensional de uma micotoxina específica.

ELISA competitivo direto baseia-se na sensibilização da microplaca com Ac (Figura 4). Após extração, uma alíquota da amostra e o conjugado enzima-micotoxina são adicionados à microplaca. Qualquer micotoxina (amostra ou padrão) competirá com o conjugado enzima-micotoxina pelos sítios de ligação do Ac. Após a etapa de lavagem, o substrato cromógeno é adicionado para desenvolver a coloração (intensidade da cor inversamente proporcional à concentração de micotoxina). A solução de bloqueio é adicionada, interrompendo a reação enzimática e, a absorvância determinada em leitora de microplacas.

ELISA competitivo indireto baseia-se na sensibilização da microplaca com antígeno, i.e., a micotoxina (amostra ou padrão), seguida de Ac anti-micotoxina (Figura 4). Após lavagem, adiciona-se o Ac marcado com enzima, procede-se nova lavagem, seguida de adição de substrato cromógeno para desenvolver a coloração. A solução de bloqueio é adicionada e a absorvância determinada, sendo esta inversamente proporcional à concentração de micotoxina.

Os kits de ELISA apresentam vantagens de requerer pequeno volume de amostra e etapa de extração e limpeza menos laboriosa do que métodos como CCD e CLAE. São rápidos, simples, específicos, sensíveis e portáteis, podendo ser usados no campo para detecção de micotoxinas em alimentos e rações. Este método pode ser qualitativo ou quantitativo.



**Figura 4.** Esquema de ELISA competitivo direto (esquerda) e ELISA competitivo indireto (direita). ONO EYS, BIAZON L, FUJII S, ONO MA, HIROOKA EY. Advances in immunochemical methods for mycotoxin/mycotoxigenic fungi detection in the agri-food system In: **Fungi: Multifaceted Microbes** ed. New Delhi : Anamaya Publishers, 2006, p. 275-293

Testes ELISA e CIA com fluorimetria também têm sido usados para determinação de ZEA<sup>(55, 56)</sup>. De acordo com Bennett et al.<sup>(55)</sup>, o método de ELISA foi aprovado pela AOAC como primeira ação para triagem em milho, trigo e ração para suínos.

Outros imunoenaios são baseados em membranas, como sondas *dipstick*, *flow-through assay* e o *lateral flow test*<sup>(57)</sup>. Nestes testes, Ac específicos são imobilizados em uma membrana, criando uma zona de reação para todas as etapas subsequentes. Ao final, ocorre desenvolvimento de uma cor específica na membrana, que é dependente da presença/ausência de micotoxina e visualmente avaliada contra um controle negativo, que fornece o máximo de intensidade de cor.

O *flow-through assay* é baseado no mesmo princípio do ELISA competitivo direto. Ac anti-micotoxina recobre a superfície de uma membrana. A micotoxina extraída é adicionada à membrana, seguida pela adição do conjugado enzima-micotoxina. A micotoxina e o conjugado enzima-micotoxina competem pelos sítios de ligação do anticorpo. Após lavagem, o substrato cromógeno é adicionado e reage com o conjugado enzima-micotoxina, desenvolvendo a cor. Para amostra negativa (nível de micotoxina menor que o limite de detecção do método) haverá desenvolvimento de um ponto colorido visível no centro da membrana. Para amostra positiva, não haverá desenvolvimento de cor. A concentração de micotoxina das amostras positivas pode ser confirmada por um método quantitativo, como CLAE.

O *lateral flow test* se assemelha a um teste de gravidez, baseado na detecção imunológica de gonadotropina coriônica humana. Este ensaio utiliza Ac marcados (partículas de látex – azul; ou ouro coloidais – vermelho). Amostra líquida é colocada em contato com a membrana teste do dispositivo. Através de capilaridade, o líquido contendo o analito migra através da membrana, redissolvendo em certa área os Ac específicos (marcados) na membrana. Enquanto o líquido contendo as partículas solubilizadas migra pela membrana, antígeno e anticorpo continuam reagindo. No

campo indicador da membrana, o resultado desta reação é visualizado. A formação de cor indica a presença do Ag (resultado positivo), enquanto ausência de coloração indica ausência de Ag (resultado negativo) <sup>(57)</sup>.

No imunoensaio de polarização de fluorescência, a micotoxina é marcada com fluoróforo. Micotoxina livre e marcada competem por um sítio específico do Ac. Na ausência de micotoxina livre, a marcada se liga ao Ac. O aumento da massa molecular do complexo afeta a rotação da molécula alvo, mudando a orientação da fluorescência. A quantidade de alvo ligado pode ser medida (polarização), sendo inversamente proporcional à quantidade de micotoxina livre presente na amostra. Diferindo de ELISA, a separação de micotoxina livre e ligada ao Ac não é necessária. A medida da polarização pode ser feita utilizando um equipamento portátil <sup>(57)</sup>.

*Surface plasmon resonance* mede a mudança na concentração de massa na superfície de um sensor devido à ligação de moléculas. Em um comprimento de onda e ângulo de incidência específicos, luz será absorvida por elétrons livres em fino filme de metal da superfície de um sensor, diminuindo a intensidade da luz refletida. O ângulo em que o fenômeno ocorre muda proporcionalmente à mudança de concentração de massa na superfície do sensor. As mudanças na concentração de massa medida pelo biossensor são aquelas devido à ligação e dissociação de moléculas interativas, entre o antígeno imobilizado (micotoxina) e o anticorpo específico adicionado à amostra <sup>(58)</sup>.

Uma outra abordagem é a análise dos genes de toxicidade por PCR (*polymerase chain reaction*). Li et al. <sup>(59)</sup> desenvolveram um PCR para detecção de *F. graminearum* produtor de DON e nivalenol. O método é baseado nos genes *Tri5-Tri6*, envolvidos no metabolismo de micotoxinas por *Fusarium* spp., e foi capaz de detectar um fragmento de 300 pares de base. Os autores afirmam que este ensaio pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para evitar ou reduzir a contaminação de micotoxinas em cereais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trigo e produtos derivados constituem alimentos de amplo consumo no país, portanto, o controle da contaminação por micotoxinas é de suma importância. A segurança irrestrita dos produtos consumidos depende do monitoramento contínuo, empregando métodos de alta sensibilidade e baixo custo, constantemente avaliados e comparados com métodos químicos oficiais, em contínuo avanço. Os métodos imunoquímicos surgiram como uma alternativa para minimizar o custo de análise, como o emprego de colunas de imunoafinidade para pré-limpeza de zearalenona e desoxinivalenol. A utilização de métodos imunológicos reduziria a exposição dos analistas a solventes tóxicos e a contaminação ambiental. A aplicação de métodos imunológicos como biossensores, *microarrays*, imunossensores eletroquímicos, polarização de fluorescência constituem alternativas atraentes no controle de qualidade de alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuiper-Goodman T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters*, v.82/83, p.853-859, 1995.
  2. Osório EA. A cultura do trigo. São Paulo: Globo, 1992, 218 p.
  3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. In [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2007
  4. CONAB – Companhia nacional de abastecimento. Indicadores agropecuários, 2005. In: [www.conab.gov.com](http://www.conab.gov.com).
  5. Fujita AH, Figueroa MOR. Composição centesimal e teor de  $\beta$ -glucanas em cereais e derivados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.2, p.116-120, 2003.
  6. Brasil. Instrução Normativa Nº 7, DE 15 DE AGOSTO DE 2001, publicada no Diário Oficial da União em 21/08/2001, Seção 1 . Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Trigo.
  7. Cornell HJ, Hoveling AW. *Wheat: Chemistry and utilization*. Lancaster: Technomic Publishing CO., INC, 1998, 426 p.
  8. Briyones-Reyes D, Gómez-Martínez L, Cuerva-Rolón R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, México. *Food Chemistry*, v.100, p.693-698, 2007.
  9. Champeil A, Foubert JF, Doré T, Rossignol L. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, v.23, p.531-537, 2004.
  10. Casa RT, Reis EM, Blum MMC, Bogo A, Scheer O, Zanata T. Danos causados pela infecção de *Giberella zeae* em trigo. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.289-293, 2004.
  11. Parry DW, Jenkinson P, Mcleod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, v.44, p.207–238, 1995.
  12. Placinta CM, D’mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* micotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, v.78, p.21-37, 1999.
  13. Snijders CHA. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichotecene formation. *Toxicology Letters*, v.153, p.37-46, 2004.
  14. Bullerman LB, Schoederer LL, PARK K Y. Formation and control of mycotoxins in food. *Journal of Food Protection*, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.
  15. Birzele B, Meier HH, Krämer J, Dehne HW. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *European Journal of Plant Pathology*, v.108, p.667-673, 2002.
- Biosáude*, Londrina, v. 12, n. 1 / 2, 2010

16. Reunião da Comissão Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de trigo, 19, Londrina, PR. Informações Técnicas das Comissões Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale para a Safra de 2004. 218 p.
  17. Conková E, Laciaková A, Kovác G, Seidel H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The Veterinary Journal*, v.165, p.214-220, 2003.
  18. Liu MT, Ram BP, Hart LP, Pestka JJ. Indirect enzyme-linked immunosorbent-assay for the mycotoxin zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, v.50, p.332 - 336, 1985.
  19. Diekman MA, Green ML. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, v.70, p.1615-1617, 1992.
  20. De Saeger S, Sibanda L, Van Peteghem C. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal using high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.487, p.137-143, 2003.
  21. Council Directive 85/649/EEC e 88/146/EC, 1985, 1988 (União Européia).
  22. Luo Y, Yoshizaawa T, Katayama T. Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* micotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.3723-3726, 1990.
  23. Steyn PS. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*, v.82/83, p.843-851, 1995.
  24. Vieira AP, Badiale-Furlong E, Oliveira MLM. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.16, p.221-225, 1999.
  25. Tutelyan VA. Deoxynivalenol in cereals in Rússia. *Toxicology Letters*, v.153, p.173-179, 2004.
  26. Quiroga N, Resnik S, Pacim A, Martínez E, Pagano A, Riccobene I, Neira S. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. *Food Control*, v.6, p.201-204, 1995.
  27. Prange A, Birzele B, Krämer J, Meier A, Modrow H, Köhler P. *Fusarium*-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control*, v.16, p.739-745, 2005.
  28. Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, v.8, p.39-69, 2005.
  29. Sabino M, Ochikawa AH, Inomata EI, Lamardo LCA. Determinação de desoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.49, n.2, p.155-159, 1989.
- Biosaúde*, Londrina, v. 12, n. 1 / 2, 2010

30. Calori-Domingues MA, Alemida RR, Tomiwaka MM, Gallo CR, Gloria EM, Dias CTS. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.1, p.181-185, 2007.
31. Lamardo LCA, Navas S, Sabino M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.65, n.1, p.32-35, 2006.
32. Lori GA, Sisterna MN, Haidukowski M, Rizoo I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiology Research*, v.158, p.29-35, 2003.
33. Schollenberger M, Muller HM, Ruffle M, Suchi S, Plank S, Drochner W. Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, v.97, p.317-326, 2005.
34. Zinedine A, Sorian JM, Moltó JC, Manñes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, p.1-18, 2007.
35. Ryu D, Hanna MA, Bullerman LB. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection*, v.62, p.1482-1484, 1999.
36. Lemke SL, Grant PG, Phillips TD. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.3789-3796, 1998.
37. Avantiaggiato G, Havenaar R, Visconti A. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, v.41, p.1283-1290, 2004.
38. Soares LV. *Curso Básico de Instrumentação Para Analistas de Alimentos e Fármacos*. Barueri: Ed. Manole, 2006. 337p.
39. Romer TR. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxin in food and feeds. *Journal of AOAC International*, v.69, p.699-703, 1986.
40. Mateo JJ, Mateo R, Hinojo MJ, Llorens A, Jiménez M. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *Journal of Chromatography A*, v.955, p.245-256, 2002.
41. Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.882, p.23-28, 2000.
42. Lagana A, Curini R, D'ascenzo G, De Leva I, Faberi A, Pastorini E. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification of trichothecenes in maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.17, p.1037-1043, 2003.
- Biossaúde*, Londrina, v. 12, n. 1 / 2, 2010

43. Schothorst RC, Jekel AA. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry*, v.73, p.111-117, 2001.
44. Krska R. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A*, v.815, p.49-57, 1998.
45. Nuryono N, Noviandi CT, Bohm J, Razzazi-Fazeli E. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. *Food Control*, v.16, p.65-71, 2005.
46. Betina V. Thin layer chromatography of mycotoxins, *Journal of Chromatography A*, v.334, p.211-276, 1985.
47. Krska R, Welzig E, Boudra H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, v.137, p.241-264, 2007.
48. Cavaliere C, D'ascenzo G, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Laganà A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. *Food Chemistry*, v.92, p.559-568, 2005.
49. Ware GM, Zhao Y, Kuan SS, Carman AS. Preparative method for isolating zearalenol and zearalenone using extracting disk. *Journal of AOAC International*, v.82, 90-94. 1999.
50. Rosenberg E, Krska R, Wissiack R, Kmetov V, Josephs R, Razzazi E, Grasserbauer M. High-performance liquid chromatography – atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *Journal of Chromatography A*, v.819, p.277-288, 1998.
51. Zöllner P, Jodlbauer J, Lidner W. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. *Journal of Chromatography A*, v.858, p.167-174, 1999.
52. Zöllner O, Mayer-Helm P. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1136, p.123–169, 2006.
53. Zheng MZ, Richard JL, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, v.161, p.261-273, 2006.
54. Ono EYS, Mendes AM, Meirelles PG, Hirooka EY, Ono MA. Micotoxinas em alimentos – Progressos na imunodeteção. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n.32, p.69-80, 2004.
55. Bennett GA, Nelsen TC, Miller BM. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in maize, wheat, and pig feed: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.77, p.1500–1509, 1994.

56. Scott PM, Trucksess MW. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, 80, 941–949, 1997.
57. Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Martlauber E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicology Letters*, v.153, p.113-121, 2004.
58. Gaag B, Spath S, Dietrich H, Stigter E, Boonzaaijer G, Osenbruggen T, Koopal K. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*, v.14, p.251-254, 2003.
59. Li H-P, Wu A-B, Zhao C-S, Scholten O, Löffler H, Liao Y-C. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.243, p.505-511, 2005.