

FUMONISINAS: ASPECTOS ANALÍTICOS

Miguel MACHINSKI JUNIOR

M. MACHINSKI J. – Fumonisinas: Aspectos Analíticos – Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Laboratório de Toxicologia. Av. Colombo, 5790. CEP 87020-900. Maringá – Pr. Fone (044) 262-4350. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 73-88, 1998.

RIALA 07/842

RESUMO: As fumonisinas, micotoxinas presentes em alimentos e rações, principalmente no milho, são produzidas por fungos do gênero *Fusarium*. Foi demonstrado experimentalmente que a fumonisina B¹ causa a leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar em suínos (EPS) e câncer hepático em ratos, além de ser provável agente responsável pelo câncer de esôfago em humanos, como demonstram os estudos epidemiológicos realizados na África do Sul e na China. Com a finalidade de fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de fumonisinas em alimentos e rações, foi realizada uma revisão da metodologia analítica relatados na literatura científica.

DESCRITORES: Fumonisinas, métodos analíticos, alimentos, rações.

INTRODUÇÃO

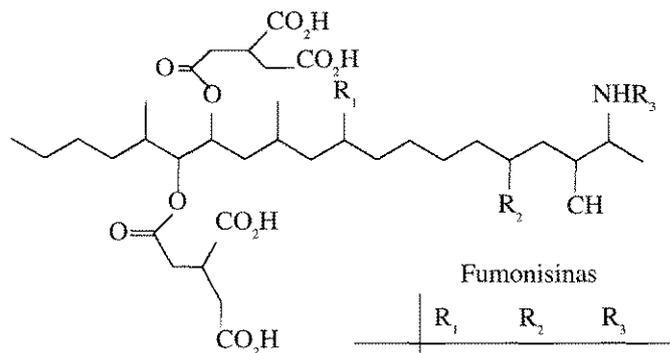
A micotoxina fumonisina B¹ (FB¹) foi isolada e purificada por GELDERBLUM et alii¹⁵ em 1988 em culturas de *Fusarium moniliforme* e caracterizada estruturalmente por BEZUIDENHOUT et alii¹⁹ (Figura 1). A FB¹ tem sido a principal causa do câncer hepático em ratos¹⁶, leucoencefalomalácia (LEME) em equinos³⁵, edema pulmonar em suínos¹³. Leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI et alii, 1996), está associada com câncer de esôfago em humanos⁶². Os efeitos tóxicos sugerem a necessidade de controlar a presença de fumonisinas em alimentos e rações.

O conhecimento dos níveis de fumonisinas em produtos naturalmente contaminados por estas micotoxinas só pode ser observado através de métodos analíticos adequados. Tais métodos são necessários para a fiscalização, monitoramento e pesquisa nos seus vários aspectos, seja análise de alimentos e rações, estudo epidemiológicos, estudo da produção de fumonisinas e do metabolismo dos fungos, verificação da estabilidade durante o processamento de alimentos e condições para descontaminação⁴⁰.

As etapas envolvidas no procedimento analítico para a detecção de fumonisinas são: extração, purificação, detecção, quantificação e confirmação (Tabela 1).

Esta revisão resume as informações sobre a metodologia analítica para a determinação de fumonisinas.

Figura 1 – Estrutura química das fumonisinas.



Fumonisinas

	R ₁	R ₂	R ₃
FA1	OH	OH	CH ₂ CO
FA2	H	OH	CH ₂ CO
FB1	OH	OH	H
FB2	H	OH	H
FB3	OH	H	H
FB4	H	H	H

EXTRAÇÃO

As fumonisinas são compostos fortemente polares, solúveis em água, bastante solúveis em acetonitrila-água e muito solúveis em metanol, mas não são solúveis em solventes não polares³⁹.

TABELA 1
Etapas envolvidas no procedimento analítico de fumonisinias.

Etapas	Descrição
1. Extração	solventes agitação filtração e/ou centrifugação fluido supercrítico
2. Purificação	cromatografia de troca iônica cromatografia de fase reversa cromatografia de imunoafinidade
3. Detecção/Quantificação	cromatografia em camada delgada cromatografia em camada delgada de alta eficiência cromatografia líquida de alta eficiência - detector por absorvância no ultra-violeta - detector de fluorescência - detector de massas cromatografia gasosa - detector de ionização de chama - detector de massas eletroforese capilar imunoensaíais - ELISA - fibra óptica
4. Confirmação	derivação química espectrometria de massas imunoensaíais

A extração de fumonisinias de amostras, sejam milho, rações, arroz, leite, meios de cultura ou outras, requer o uso de solventes ou mistura destes (Tabela 1). A combinação de metanol-água (3:1) é a mais utilizada. Outras proporções também empregadas são: 3:2, 1:1, 1:3 e 4:1 (Tabela 2). A mistura acetonitrila-água (1:1) tem apresentado boa recuperação de fumonisinias presentes em amostras naturalmente contaminadas^{08, 34, 36}. RICE et alii³⁴ observaram que acetonitrila-água (1:1) fornece uma melhor recuperação para as fumonisinias B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) em um curto tempo de agitação (30 minutos) e que extratos lípidos são obtidos com o uso de acetonitrila e metanol, enquanto são necessários métodos de clarificação (por exemplo, a centrifugação) quando a água é usada como solvente extrator.

A etapa de extração de fumonisinias requer um adequado estudo, devendo-se observar os fatores que podem alterar a recuperação do método. ALBERTS et alii⁰⁴ e SCOTT & LAWRENCE⁴⁴ observaram o efeito do pH durante a extração de fumonisinias em meios de cultura,

milho e seus derivados. ALBERTS et alii⁰⁴ demonstraram uma recuperação 17% maior de FB₁ em uma extração com pH 3,5 usando metanol-água (3:1) do que em pH 6. Esta última, 30% maior do que em pH 8 e 19% maior do que em pH 2. Enquanto, SCOTT & LAWRENCE⁴⁴ observaram que o uso de tampão borato pH 9,2 melhorou a recuperação de FB₁ e FB₂ em farelo de milho. Portanto, verifica-se que a natureza da matriz é outro fator importante.

Para a extração de fumonisinias em milho são necessários longos períodos de agitação (15 a 60 minutos) ou o uso de potentes agitadores, como o *Polytron mixer* (2 a 5 minutos)³⁴. A filtração e a centrifugação auxiliam a próxima etapa que é a purificação da amostra.

SELIM et alii⁴⁶ desenvolveram e otimizaram um método de extração para fumonisina B₁ em milho utilizando fluido supercrítico. O método é rápido, eficiente e preciso, além de reduzir o uso e a exposição a solventes orgânicos. O uso de 15 mL de CO₂ líquido, ácido acético como modificador em uma concentração de 5 % e em um volume de 750 µL

TABELA 2

Levantamento de métodos para extração de fumonisinias em diversos substratos.

Substratos analisados	Fumonisinias	Solventes	Tempo de agitação (min)	Filtração (Whatman nº)	Centrifugação	Referências
Milho e seus produtos derivados	FB1, FB2	metanol-água (3:1)	5-30	4	500 g/10' - 4°C	03, 33, 34, 49, 51, 53, 66, 67
			2-3	1		
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)				43, 54, 55
	FBI	metanol-água (3:1)	3-30	2		57, 71
	FBI	metanol-água (4:1)	60	4		64
	HFBI		3	4		42
	FBI, FB2	metanol-tampão borato pH 9,2 (3:1)	5	4		44
	FBI, FB2	metanol-água HCl 5N (3:1:0,3)	5	4		44
	FB1, FB2	NaCl/metanol-água (4:1)	2	4		65, 72
	FB1, FB2	metanol-HCl 0,1M (3:1)	5		4000g/10' -4°C	23
	HFBI	metanol-acetonitrila-água (1:1:2)		4		42
	FB1, FB2, FB3, HFBI	acetoneitrila-água (1:1)	30-60	4	15000 rpm/15'	08, 20, 31, 33, 34, 37, 48
	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		34
Rações a base de milho	FB1, FB2	acetato de etila / metanol-água (3:1)	30	4		32
	FBI	acetoneitrila-água (1:1)	20-60	4		19, 36
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	2-30	4	500 g/10' - 4°C	54
Leite	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		34
	FB1, FB2	metanol-acetona (1:1)	10		10000 rpm/10' -20°C	26
	FB1, FB2	acetoneitrila-água (1:1)	10		10000 rpm/10' -20°C	26
Arroz	FB1	metanol-água (3:1)	3	4		14
Cultura de fungos	FB1, FB2	acetato de etila/metanol-água (3:1)	30-60	4		09, 10, 15
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	5	4	500 g/10' - 4°C	04, 05, 34, 53
	FB1	metanol-água (3:2)	30-60	4		68
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (1:3) e (1:1)	30-60	4		04

TABELA 2

Levantamento de métodos para extração de fumonisinas em diversos substratos.

Substratos analisados	Fumonisinias	Solventes	Tempo de agitação (min)	Filtração (Whatman nº)	Centrifugação	Referências
	FB1, FB2	clorofórmio-metanol (1:1)	2	4		70
	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		04
	FB1, FB2, FB3	metanol	30-60	4		04
	FB1, FB2	acetoneitrila-água (1:1)			2000 rpm/5'	04
Plasma e urina	FB1	metanol				50

Obs.: HFB1 - hidrolizado de fumonisina B1.

por grama de amostra, 1200 *psi* de pressão e vinte minutos de extração estática foram as condições ótimas para a extração da fumonisina B₁ em milho contaminado.

PURIFICAÇÃO

A etapa de purificação na análise de fumonisinas é necessária para remover os compostos interferentes que

são co-extraídos com os solventes. Os procedimentos de limpeza do extrato envolvem a partição líquido-líquido, colunas de extração com fase sólida e mais recentemente o uso de colunas de imunoafinidade³⁹ (Tabela 3).

Segundo WARE et alii⁷¹, o procedimento de purificação utilizando coluna de fase reversa C₁₈ é rápido, eficiente e preciso. Os interferentes polares são removidos da amostra pela lavagem com metanol-água (1:3), (1:1) ou KCl 1%-acetoneitrila (9:1). De acordo com ALBERTS

TABELA 3

Principais técnicas de purificação dos extratos obtidos nas análises de fumonisinas.

Técnicas de purificação	Descrição	Referências
Colunas de Extração de - Fase reversa C ₁₈	Fase Sólida	
	metanol-água (1:1) → metanol-água (3:1)	10, 15
	metanol-água (1:3) → metanol-água (3:1)	04, 05, 53
	água acetoneitrila-água (2:8) acetoneitrila-água (7:3)	20, 36
	KCl 1% acetoneitrila-KCl 1% (1:9) acetoneitrila-água (7:3)	18, 19, 33, 34, 37, 48, 73
	metanol-água (1:3) → acetona-acetato de etila (1:1) → clorofórmio-metanol-ácido acético (60:40:10)	08, 71
- Troca aniônica forte (TAF)	metanol-água (3:1) → metanol → metanol-ácido acético (0,5 a 5%)	14, 19, 23, 26, 43, 44, 49, 50, 51, 54, 58, 61, 63, 67
- Combinações	fase reversa C ₁₈ troca aniônica forte (SAX)	19, 42
Colunas de Imunoafinidade	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → Na ₂ B ₄ O ₇ 0,05M em água-metanol (1:4)	72
	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → metanol-água (4:1)	65
	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → metanol	41

et alii⁶⁴ a perda de fumonisinias, principalmente a FB₁, é grande quando usa-se metanol-água (1:1) ao invés de metanol-água (1:3). Segundo WARE et alii⁷¹ para a remoção de interferentes não polares usa-se o acetato de etila-acetona (1:1) e a FB₁ é eficientemente eluída da coluna quando utiliza-se clorofórmio-metanol-ácido acético (60:40:10). A eluição das fumonisinias de colunas C₁₈ é geralmente realizada com metanol-água (3:1)^{64, 65, 10, 15, 53} ou acetonitrila-água (7:3)^{18, 19, 20, 33, 34, 36, 37, 48}. Quando empregaram-se acetonitrila-água (7:3) para a eluição das fumonisinias, WILSON et alii⁷³ preconizaram lavar a coluna com acetonitrila-KCl 1% (1:9) para remover os interferentes de matriz e permitir que as fumonisinias sejam fossem quantitativamente eluídas. RICE et alii³⁴ mostraram que o fator crítico na purificação com C₁₈ é a própria coluna, pois há diferença na recuperação das fumonisinias entre marcas diferentes e até mesmo em diferenças de lotes de fabricação da mesma marca.

A coluna de troca aniônica forte (TAF) foi primeiramente utilizada por SHEPHARD et alii⁴⁹ na análise de fumonisinias e é a mais citada na literatura^{03, 14, 19, 23, 26, 43, 44, 50, 51, 54, 58, 61, 67}. Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que os solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos por deslocamento com outros íons com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Apesar deste princípio ser simples, o mecanismo de separação de troca iônica pode ser complexo. Vários fatores como pH, força iônica e fluxo de eluição podem afetar a retenção ou eluição das fumonisinias^{14, 54, 63}. Baixas recuperações podem ser obtidas se o fluxo de eluição for maior que 1 mL/min ou o pH do extrato for menor que 5,8^{54,63}. DAWLATANA et alii¹⁴ obtiveram uma melhor recuperação em pH 6,2 para extratos de arroz. SYDENHAM et alii⁵⁴ indicaram que o uso de solvente com maior força iônica (metanol-ácido acético 1%) reduz o volume de eluato sem co-eluir compostos intrínsecos do milho que interferem com a determinação cromatográfica de fumonisinias. As colunas TAF podem ser regeneradas e reutilizadas para purificação de fumonisinias sem perda na recuperação do analito⁵⁴.

BENNETT & RICHARD⁶⁸ recomendaram o uso de colunas C₁₈ ou TAF para a etapa de purificação de fumonisinias. Entretanto, deve-se testar a recuperação devido a grande variações observadas em diferentes lotes de colunas C₁₈. Observaram também que as colunas TAF são mais eficientes na eliminação de compostos interferentes dos extratos e os extratos são mais límpidos, mas deve-se eluir as fumonisinias lentamente (<1 mL/min) e o pH do extrato deve estar entre 6 e 7.

A limpeza com ambas colunas C₁₈ e TAF foi realizada por HOLCOMB et alii¹⁹ para diminuir os altos picos da linha de base. A presença destes picos aumenta o ruído e diminui a sensibilidade do método.

A cromatografia de imunoafinidade mostra-se apropriada para a etapa de purificação de fumonisinias em amostras 17. WARE et alii⁷² avaliaram a capacidade, seletividade, reprodutibilidade deste tipo de colunas e concluíram que estas colunas são excelentes para a etapa de purificação de fumonisinias em milho e outros seus derivados. As variações coluna-coluna e entre cada lote não foram significativamente diferentes. A curva é linear de 0,1 a 1,0 µg para FB₁ e FB₂. A curva indicou saturação dos sítios de ligação da coluna acima de 1,0 µg de FB₁ e FB₂. Interferentes de matriz têm pouca influência na eficiência da ligação da FB₁ e FB₂ na coluna. Estas fumonisinias possuem afinidade semelhante pela coluna, portanto, o anticorpo não distingue as duas moléculas. TRUCKSESS et alii⁶⁵ observaram que o metanol afeta a ligação antígeno-anticorpo e indicaram o uso de metanol-água (4:1) ao invés do metanol para a eluição da FB₁ em colunas de imunoafinidade.

SYDENHAM et alii⁵⁶ recomendam, quando possível, o uso de material de referência certificado para avaliar a qualidade de cada grupo ou lote de adsorvente.

A etapa final na preparação de amostra para análise de fumonisinias é a redução do volume por evaporação do solvente em rotaevaporador sob pressão reduzida ou banho aquecido sob fluxo de nitrogênio. A amostra seca será redissolvida em um volume conhecido de solvente ou sofrerá reação de derivação para ser usada na etapa de detecção/quantificação.

DETECÇÃO/QUANTIFICAÇÃO

A determinação de fumonisinias em amostras de alimentos e cultura de fungos tem sido realizada principalmente através de técnicas cromatográficas (Tabela 1).

Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência

A análise de fumonisinias por cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) pode ser realizada em fase normal^{01, 10, 14, 21, 32, 36, 53, 70} ou fase reversa^{01, 15, 37, 48, 68} (Tabela 4).

O método desenvolvido por GELDERBLUM et alii¹⁵ para a detecção de fumonisinias utiliza metanol-água (3:1) como sistema-solvente, placas de fase reversa e p-anisal-deído como agente cromogênico, mas possui um baixo limite de detecção (10 µg/g)³⁶. ROTTINGHAUS et alii³⁷ utilizaram o cloreto de potássio na fase móvel e a fluores-

TABELA 4

Valores de Rf das fumonisinas para diferentes sistemas-solventes e agentes cromogênicos ou de intensificação de fluorescência usados em CCD/CCDAE de fase normal ou reversa.

Sistema-solvente	Rf	Fase estacionária	Reveladores	Referências
metanol-água (3:1)	FB ₁ - 0,44 a 0,55 FB ₂ - 0,22	reversa C ₁₈	p-anisaldeído 0,5% (púrpura)	15, 68
metanol-água (80:20)	FB ₁ - 0,61 FB ₂ - 0,47	reversa C ₁₈	p-anisaldeído 0,5%	01
metanol-KCl 4% (3:2)	FB ₁ - 0,50 FB ₂ - 0,10	reversa C ₁₈	fluorescamina (fluorescência amarelo - esverdeada)	37, 48
clorofórmio- metanol-ácido acético (6:3:1)	FB ₁ - 0,15 a 0,30 FB ₂ - 0,20 a 0,30 FB ₃ - 0,26 FB ₄ - 0,31	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5% ou ninhydrina 0,2%	10, 21, 32 36, 53, 70 10
clorofórmio- metanol-ácido acético (7:2:1)	FB ₁ - 0,20	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,17%	14
clorofórmio-metanol- ácido acético (60:35:10)	FB ₁ - 0,32 FB ₂ - 0,52	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5%	01
clorofórmio-metanol- água-ácido acético (55:36:8:1)	FB ₁ - 0,23 FB ₂ - 0,30 FB ₃ - 0,30 FB ₄ - 0,37	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5% ou ninhydrina 0,2%	10

camina como agente intensificador de fluorescência para aumentar a sensibilidade (0,1 µg/g) e a especificidade.

JACKSON & BENNETT²¹ utilizaram a CCDAE para resolver a separação das fumonisinas devido à dificuldade em separar as FB₁, FB₂ e FB₃. WILSON et alii⁷³ citam que deve-se remover a água do extrato (acetonitrila-água, 1:1) antes do desenvolvimento cromatográfico em fase normal, o que não é necessário quando usa-se a cromatografia em fase reversa.

Outros métodos, além da CCD, têm sido desenvolvidos, permitindo uma melhor exatidão na quantificação do teor de fumonisinas em amostras, mas a CCD continua sendo uma importante técnica de confirmação^{30, 37}.

fluoroacetato das moléculas dos aminopolióis (aminopentol e aminotetraol originados das FB₁ e FB₂, respectivamente)^{09, 21, 32, 58, 68, 70}. Os derivados são bem separados por CG capilar (coluna DB-5, filme de 0,25 µm, 30 a 60 m de comprimento) e detectados por ionização de chama ou espectrometria de massas.

Os procedimentos acima possuem a vantagem de facilitar a combinação da CG com a espectrometria de massas, cuja finalidade é a confirmação do resultado⁶². A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas possui seletividade e especificidade, mas perde em sensibilidade e requer equipamentos sofisticados e de custo elevado⁶², além de não ser prática para análise de grande número de amostras⁵⁴.

CROMATOGRAFIA GASOSA

Os procedimentos de cromatografia gasosa (CG) capilar na determinação de amostras contaminadas por fumonisinas são precedidos pela hidrólise alcalina^{09, 21, 32, 58, 68, 70} ou ácida⁵³ de seus extratos, seguidos pela esterificação com isobutanol e anidrido heptafluorobutírico do ácido tricarbálico⁵³ e/ou acilação com trimetilsilil ou tri-

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Como as fumonisinas são solúveis em água, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) predomina entre as demais técnicas utilizadas para a detecção e quantificação destas micotoxinas. O uso de colunas de

TABELA 5

Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de fumonisinas.

Detecção	Fase móvel	Limite de detecção (µg/g)	Referências
Ultra-violeta			
anidrido maléico (230 a 250 nm)	metanol-tampão fosfato 0,05 a 0,1M pH 3,3 a 3,8 (70:30)	FB ₁ - 10 a 40 FB ₂ - 80 a 100	04, 05, 10, 15, 53
Fluorescência			
fluorescamina λ exc - 390 nm λ em - 475 nm	acetonitrila-tampão acetato 0,1M pH 3,3 (1:1) acetonitrila-KCl 1%-ácido acético (40:59:1) Gradiente: A 100%, 0,1 min → A e B 50%, 6 min → B 100%, 4 min. A = acetonitrila-água-ácido acético (40:59:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (60:39:1)	FB ₁ - 0,05 a 1 FB ₂ - 1 a 5	18, 53 37 36
o-ftaldialdeído (OPA) λ exc - 335 nm λ em - 440 nm	metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (80:20) metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (68:32) metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (66:34) acetonitrila-água-ácido acético (50:50:1) acetonitrila-tampão fosfato 0,05M pH 3,3 (40:60) metanol-água-ácido acético (77:23:1) Gradiente: 1) metanol-fosfato (55:45) → ace- tonitrila-água (8:2), 10 min 2) A B, 9 min C, 17 min A = acetonitrila-água-ácido acético (40:59:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (60:39:1) C = acetonitrila	FB ₁ - 0,05 FB ₂ - 0,10 FB ₁ e FB ₂ - 0,01 FB ₁ - 0,025 FB ₂ - 0,05 FB ₁ - 0,02	27, 36, 49 54 50, 60 51, 65 20, 33, 34 12 41, 42 61
naftaleno-2,3- dicarboxaldeído (NDA) λ exc - 410-420 nm λ em - 440-500 nm	acetonitrila-água-ácido acético (55:45:1) acetonitrila-água-ácido acético (60:40:1) Gradiente: 1) acetonitrila-água-ácido acético (55:45:1), 10 min → acetonitri-la-água (8:2), 7 min 2) A 60% e B 40%, 8 min → A 80% e B 20%, 16 min A = acetonitrila-água (99:1) B = água-ácido acético (99:1) 3) A 70% e B 30%, 2,6 min A 55% e B 45%, 10,1 min B 100%, 14,1 min A = metanol-água-ácido acético (75:24:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (75:24:1)	FB ₁ - 0,01	71 08, 72 41, 43, 44 08 26
4-fluor-7-nitro-benzeno -2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) λ exc - 460 nm λ em - 500 nm	Gradiente: A 100%, 5 min → A e B 50%, 15 min → B 100%, 10 min A = metanol-tampão fosfato pH 5 (1:1) B = acetonitrila-água (8:2)	FB ₁ - 0,02 FB ₂ - 0,02 HFB ₁ - 0,01	41, 42, 43, 44
6-aminoquinolil-N- hidrosuccini-midil carbamato (AccQ-Fluor) λ exc - 395 nm λ em - 418 nm	Gradiente: A e B 50%, 11 min B 65% e A 35%, 2 min A = tampão fosfato 0,1 M pH 7 B = metanol	FB ₁ - 0,26	67

TABELA 5 (continuação)

Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de fumonisinas.

Detecção	Fase móvel	Limite de detecção (µg/g)	Referências
9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) λ exc - 263 nm λ em - 313 nm	Gradiente: B 40% e A 60%, 9 min B 70% e A 30%, 8 min B 100%, 1 min A = acetonitrila-tampão citrato (30:70) B = acetonitrila-tampão citrato (70:30)	FB ₁ - 0,2	19
isotiocianato de fluoresceína (FITC) λ exc - 488 nm λ em - 520 nm	Gradiente: A 30% e B 70% → A 42% e B 38%, 7,2 min → A 90% e B 10%, 12 min → A 30%, 4 min A = metanol B = tampão fosfato 0,01 M pH 7,5	FB ₁ - 0,02	24
4-(N,N-dimetila- minosulfonil)-7- fluoro-2,1,3- benzoxadiazol (DBD-F) λ exc - 450 nm λ em - 590 nm	Gradiente: A 100% → B 15%, 5 min → B 90%, 13 min A = tampão fosfato 0,05 M-metanol (1:1) B = acetonitrila-água (75:25)	FB ₂ - 0,01 FB ₁ - 0,01	02, 03
Espectrometria de massa	Gradiente: B 40% e A 60% → B 100%, 7 min A = 0,05% de ácido trifluoroacético B = 0,05% de ácido trifluoroacético em metanol	FB ₁ - 0,0008	23

fase reversa (C₈ ou C₁₈) com diferentes fases móveis é amplamente citado na literatura científica^{04, 05, 08, 10, 12, 15, 18, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 32, 34, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 49, 50, 51, 53, 54, 60, 61, 65, 67, 71, 72}.

As fumonisinas têm sido separadas por eluição isocrática ou gradiente. Na eluição isocrática utiliza-se a mistura metanol-tampão fosfato 0,05 a 0,1 M pH 3,3 a 3,8 em diferentes proporções 80:20^{27, 36, 49}, 70:30^{05, 10, 15, 53}, 68:32⁵⁴ e 66:34^{50, 60}, ou as combinações acetonitrila-água-ácido acético na proporção 50:50:1^{51, 65}, 55:45:1⁷¹ e 60:40:1^{08, 72} e acetonitrila-tampão fosfato 0,05 M pH 3,3 (60:40)^{20, 33, 34}. Na eluição por gradiente emprega-se a mistura de dois ou mais solventes, como metanol e tampão fosfato ou acetonitrila, água e ácido acético^{08, 19, 23, 24, 26, 36, 41, 42, 43, 44, 61, 67}.

As fumonisinas não absorvem radiação ultravioleta (UV) e não fluorescem, portanto é necessário sofrerem uma modificação química para serem observadas pelos detectores comuns de CLAE.

O primeiro procedimento analítico por CLAE para análise de fumonisinas envolveu a modificação do método de SYLER & GILCHRIST⁵⁹ para determinação de fitotoxinas de *Alternaria alternata*. Um derivativo maleil de FB₁, FB₂ e FB₃ foi preparado a partir do anidrido maléico para detecção a 230 nm^{04, 05, 10, 53} ou 250 nm¹⁵.

Este método foi satisfatório para análise de culturas de fungos, pois tais culturas possuem altos teores de fumonisinas, mas esta metodologia foi pouco sensível para amostras naturalmente contaminadas^{04, 30}. A sensibilidade na análise de fumonisinas por CLAE foi aumentada significativamente com a conversão para derivativos fluorescentes e, portanto, o uso de detectores de fluorescência.

A derivação pré-coluna da amina primária das fumonisinas tem sido amplamente utilizada na determinação por CLAE com detecção de fluorescência. A fluorescamina é um dos reagentes utilizados na derivação de fumonisinas^{18, 36, 37, 53}. Entretanto, o derivado fumonisinina-fluorescamina elui em dois picos devido a formação de derivados ácido/álcool e lactona, o que dificulta a determinação quantitativa dos analitos em questão. Segundo ROSS et alii³⁶, a razão dos dois picos foi constante quando utilizaram uma fase móvel de pH baixo, portanto ambos os picos foram usados para quantificação. Obtiveram assim um limite de detecção de 1 µg/g para FB₁ e 5 µg/g para FB₂. HOLCOMB et alii¹⁸ relataram que o uso de ácido acético na fase móvel diminui satisfatoriamente o tamanho do pico menor (lactona-fluorescamina) e o limite de detecção aumenta para 0,5 µg/g para FB₁.

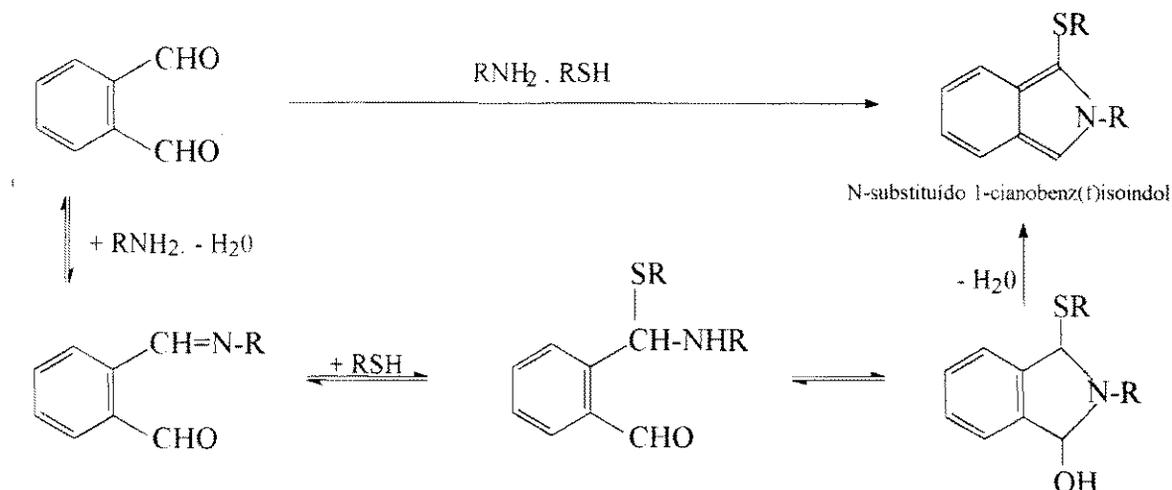


Figura 2 — Reação da amina primária da fumonisina com o o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol para formar um derivado N-substituído 1-cianobenz(f)isoindol (29).

O amplo uso do orto-ftaldialdeído (OPA) como agente na derivação para determinação de fumonisinas por CLAE deve-se à sua simplicidade e sensibilidade (limite de detecção de 50 ng FB_1/g e 100 ng FB_2/g) 49. Os derivados OPA-fumonisinas são preparados sob condições alcalinas (pH 9 a 10) na presença de 2-mercaptoetanol (Figura 2). SYDENHAM et alii⁵⁴ avaliaram a estabilidade do derivado e observaram que não há diferença significativa quando a injeção no cromatógrafo líquido ocorre até 4 minutos, entretanto, após 8 minutos, a resposta foi 95% da previamente observada e após 64 minutos, diminui 48% da leitura inicial. TRUCKSESS et alii⁶⁵ demonstraram que a intensidade máxima do derivado é obtida em 1 minuto após a adição do reagente OPA no extrato, e que a intensidade de fluorescência diminui 15% após 10 minutos e 30% após 1 hora da reação. Apenas RICE et alii³⁴ demonstraram que a reação completa entre o OPA e as fumonisinas ocorre em um pH

entre 8 a 8,5 e que não há alteração estatisticamente significativa no tempo de reação entre 4 a 40 minutos. Entretanto, o sinal cromatográfico é diminuído significativamente em um tempo menor que 4 minutos. Nesta técnica a razão de 20 mg de OPA e 20 μL de 2-mercaptoetanol em 10 mL de acetonitrila apresentou uma melhor resposta e estabilidade do derivado formado.

O procedimento de WARE et alii⁷¹ emprega o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) como agente na derivação para a detecção de fumonisinas em milho e seus derivados. O NDA reage com aminas primárias na presença do íon cianeto para formar um derivado 1-cianobenz(f)isoindol, como mostrado na figura 3.^{68,71} Este procedimento é sensível (limite de detecção de 10 ng FB_1/g) e o derivado é altamente estável, apenas 12 % do derivado NDA-fumonisina foi reduzido em um período de 25 horas.⁷¹ O derivado possui uma intensa banda de absorção UV em 250 nm e dois máximos de excitação fracos

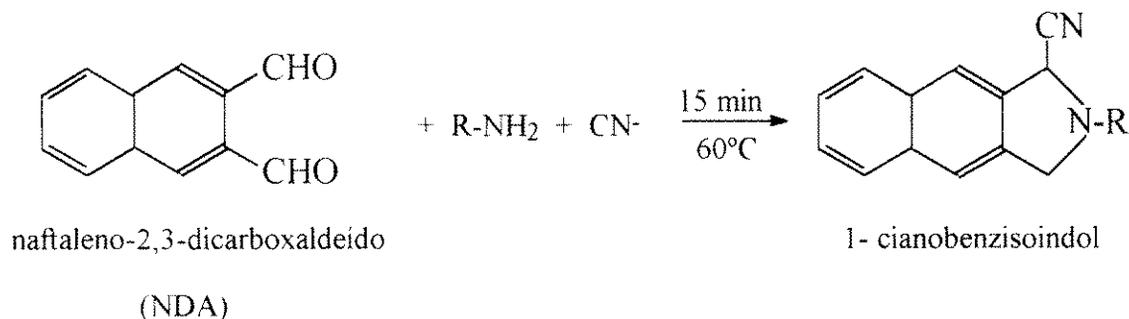


Figura 3 — Reação da amina primária da fumonisina com o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) na presença do íon cianeto para formar um derivado estável (08).

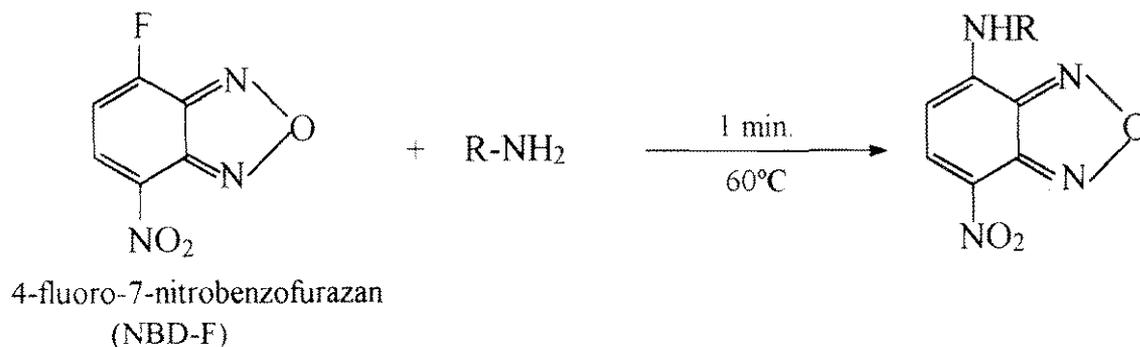


Figura 4 — Reação da amina primária da fumonisina com o 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) para formar um derivado estável (43).

na região visível em aproximadamente 420 e 440 nm. O comprimento de onda de 410 nm é o mais utilizado para excitação (exc) por apresentar menos interferentes na matriz⁷¹. WARE et alii⁷² indicaram que dois compostos fluorescentes são formados durante a reação de derivação do NDA com a FB₁ e que poderiam interferir na quantificação da FB₁, porém isto pode ser ajustado alterando a composição orgânica da fase móvel.

SCOTT & LAWRENCE^{43, 44} recomendaram o emprego do reagente 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) na determinação de fumonisinas. O NBD-F reage com o grupo amino primário das fumonisinas, onde o tempo de 1 minuto de reação a 60°C foi suficiente para ocorrer a formação do derivado (Figura 4). A estabilidade do derivado NBD-fumonisinina foi de aproximadamente 20 minutos⁴³, e a omissão de HCl 1 N na etapa de derivação aumentou a estabilidade dos derivados para cerca de 210 minutos⁴⁴. Entretanto, o derivado formado não foi suficientemente estável em procedimento automatizado⁰³.

Outros reagentes de derivação usados na determinação de fumonisinas por CLAE são: 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC - limite de detecção (LD) de 0,2 µg/g)¹⁹, 6-aminoquinolil N-hidroxissuccinimidilcarbamato (AccQ-Fluor - LD de 0,26 µg/g),⁶⁷ isotiocianato de fluoresceína (FITC - LD de 0,05 µg/g)²⁴ e o 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-F - LD de 10 ng/g)^{02, 03}.

MIYAHARA et alii²⁸ desenvolveram um método de alta sensibilidade (0,08 µg/g para FB₁ e FB₂), utilizaram cromatografia de par iônico e derivação pós-coluna. A reação de derivação das fumonisinas é realizada com OPA e N-acetil cisteína após a passagem destas pela coluna cromatográfica e detectadas por fluorescência cujo exc é 336 nm e o emissão é 460 nm.

O uso de detectores de massas ou espectrometria de massas para a detecção, identificação e quantificação de fumonisinas separadas por CLAE tem sido relatado

recentemente^{23, 61, 74} e demonstrado sensibilidade (limite de quantificação de 0,8 ng/g) e seletividade.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas tem sido usada em muitos estudos para a identificação e consequentemente, confirmação na análise de fumonisinas. BEZUIDENHOUT et alii⁶⁹ e PLATTNER et alii³² identificaram a FB₁ por espectrometria de massas de íon secundário (SIMS), pois o íon molecular formado por impacto de elétrons é muito instável, portanto, realizou-se a ionização química das moléculas de fumonisinas com isobutano a altas pressões (0,3 torr), formando o íon molecular protonado de m/z 722 para FB₁ e de m/z 706 para FB₂. A técnica acima requer que a amostra seja vaporizada antes da ionização, tornando difícil a análise de FB₁ por ser uma molécula lábil ou estar na forma ionizada. KORFMACHER et alii²² utilizaram técnicas de ionização alternativas como "thermospray", "electrospray" e "fast atom bombardment" e demonstraram que o "Electrospray Mass Spectrometry" (ESMS) e o "Fast-atom Bombardment Mass Spectrometry" (FABMS) são úteis na determinação de nanogramas do analito em questão, enquanto o "Thermospray Mass Spectrometry" (TSMS) analisa quantidades maiores (microgramas) de FB₁. A confirmação da presença de fumonisinas na amostra analisada é realizada com detectores de massas ou espectrômetros de massas acoplados ao cromatógrafo gasoso^{12, 33, 62, 68, 70} ou ao cromatógrafo líquido^{23, 61, 74}.

ELETROFORESE CAPILAR

As fumonisinas podem ser separadas por técnicas eletroforéticas devido a presença dos dois grupos de

ácido tricarbálfico em sua estrutura (Figura 1). MARAGOS²⁴ preparou derivados de FB₁, FB₂ e hidrolizado de FB₁ (HFB₁) com isotiocianato de fluoresceína e os analisou por eletroforese capilar (CZE) com detector de fluorescência. O limite de detecção relatado foi de 0,025 pg para FB₁. O problema do método é a possível decomposição das fumonisinas devido as condições de reação de derivação, como: longo tempo de reação (90 minutos), alta temperatura (60°C) e pH alcalino (9,5); o que levaria a resultados falsos negativos²⁸.

IMUNOENSAIOS

A produção de anticorpos para ensaios imunoenzimáticos (EIA) tem sido desenvolvida para a análise direta e indireta de fumonisinas^{06,07,11,25,38,45,52,66,75}. AZCONA-OLIVERA et alii^{06,07} obtiveram anticorpos monoclonais e policlonais, contra a FB₁, de linfócitos esplênicos de ratos imunizados com o conjugado FB1-toxina colérica. O teste direto competitivo ELISA baseado em anticorpos monoclonais foi desenvolvido, onde o conjugado FB1-peroxidase e FB₁ livre competem pelo anticorpo imobilizado nas placas^{07,25}. Se a micotoxina está presente na amostra (FB₁ livre) ela poderia se ligar ao anticorpo na placa, ao invés do conjugado FB₁-peroxidase, diminuindo a quantidade do sinal espectrofotométrico. O limite de detecção foi de 50 ng/mL para FB₁⁰⁷ e de 2 ng/mL para HFB₁²⁵. USLEBER et alii⁶⁶ e SCHNEIDER et alii³⁸ prepararam anticorpos policlonais contra FB₁, os quais foram também utilizados em um teste direto competitivo ELISA em placas e membranas, respectivamente. O limite de detecção para FB₁ foi de 0,17 ng/mL⁶⁶ no teste em placas e de 40-60 ng/g³⁸ em membranas para amostras de milho. As fumonisinas são super-estimadas em testes diretos competitivos ELISA como indicam os estudos comparativos^{31,52,55,57,60}, isto deve-se a matriz alimentar que aumenta a resposta inibitória no teste ELISA ou devido a reação cruzada entre compostos estruturalmente relacionados a FB₁.

SHELBY & KELLEY⁴⁷ descreveram um teste indireto competitivo ELISA para análise de FB₁ em milho com anticorpos monoclonais, onde o conjugado FB1-albumina bovina imobilizado e FB₁ livre competem pelo anticorpo anti-FB₁ livre. Se a micotoxina está presente na amostra (FB₁ livre), o anticorpo anti-FB₁ ligado à enzima ligaria-se a FB₁ da amostra ao invés da FB₁-albumina bovina imobilizada na placa, diminuindo a resposta espectrofotométrica. SHELBY et alii⁴⁸ compararam o método acima com o de ROTTINGHAUS et alii³⁷ por cromatografia em camada delgada, e observaram que o método de ELISA indicou uma maior quantidade de FB₁, devido a reação cruzada com as outras fumonisinas.

Outros métodos usados na determinação de fumonisinas por imunoenaios são o uso de imunossensor de fibra óptica⁶⁴ e a produção de anticorpos anti-idiotipo¹¹.

CONFIRMAÇÃO

A etapa final da metodologia analítica é a confirmação da identidade das fumonisinas. A confirmação do resultado analítico pode ser realizada através de derivação química, onde o derivado formado possui características cromatográficas distintas da micotoxina inalterada. Segundo ROTTINGHAUS et alii³⁷ um dos testes confirmatórios é a formação de amino-alcóois C²² a partir da hidrólise da FB₁ e FB₂ e análise por cromatografia em camada delgada, utilizando fluorescamina como agente revelador. A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo gasoso ou líquido de alta eficiência é um procedimento de confirmação altamente específico na análise de fumonisinas^{12,23,33,62,68,70}, onde a monitorização de três íons é preferível para a exatidão da identidade, para FB₁ são eles m/z 722, 406 e 187³². Estes métodos são seletivos e sensíveis, mas requerem equipamentos de alto custo. Procedimentos mais acessíveis e de menor custo são os imunoenaios, devido a especificidade pelo sucesso na produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra a FB₁, FB₂ e FB₃³⁰.

ESTUDOS COLABORATIVOS

Os estudos colaborativos inter-laboratoriais realizam uma rigorosa avaliação da exatidão, repetibilidade (variação intra-laboratorial) e reprodutibilidade (variação inter-laboratorial)⁴⁰. No estudo colaborativo o número mínimo de amostras analisadas por 8 ou mais laboratórios é cinco, sendo necessário realizar uma ou mais replicatas. Estes resultados serão analisados estatisticamente fornecendo dados sobre "outliers", erros sistemáticos, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), valores falso positivos e falso negativos.

Somente dois métodos publicados para análise de fumonisinas foram testados em estudos colaborativos⁵⁶.⁶³ e um estudo de intercomparação na Comunidade Européia⁶⁹. O método de SHEPHARD et alii⁶⁹ para determinação de FB₁ e FB₂ em milho foi estudado cooperativamente por 11 laboratórios⁶³. A variação intra-laboratorial foi de 7,7 a 25,5% para FB₁ e 12,5 a 36,8% para FB₂, enquanto a variação inter-laboratorial foi de 18 a 26,7% para FB₁ e 28 a 45,6% para FB₂. A razão HORRAT, que é a razão entre o desvio padrão relativo encontrado no estudo interlaboratorial e o desvio padrão calculado pela equação de Horwitz^{66,63}, demonstrou reproduti-

bilidade aceitável em todas as concentrações de FB_1 testadas e 4 das 5 concentrações de FB_2 analisadas, pois os valores foram inferiores a 2. A recuperação de FB_1 e FB_2 foi de 99,5 e 85,9%, respectivamente⁴⁹.

O segundo estudo colaborativo 56 envolveu 12 participantes e verificaram o método de SYDENHAM et alii⁵⁴, o qual baseia-se no método de SHEPHARD et alii⁴⁹ com acréscimo da FB_3 . A recuperação foi de 81,1 a 84,2%, 75,9 a 81,9% e 75,8 a 86,8% para FB_1 , FB_2 e FB_3 , respectivamente. A variação intra-laboratorial variou de 5,8 a 13,2% para FB_1 , de 7,2 a 17,5% para FB_2 e 8 a 17,2% para FB_3 . A variação inter-laboratorial variou de 13,9 a 22,2% para FB_1 , de 15,8 a 26,7% para FB_2 e 19,5 a 24,9% para FB_3 . A razão HORRAT variou de 0,75 a 1,73 demonstrando reprodutibilidade aceitável.

CONCLUSÃO

De acordo com as recomendações evidenciadas pelos diversos autores, pode-se concluir que:

- os métodos analíticos para a determinação de fumonisin têm sido desenvolvidos, mas são necessários alguns melhoramentos para se tornarem mais exatos, baratos e rápidos.
- recuperações melhores têm sido obtidas com o uso de colunas de troca iônica forte (TAF) ao invés das colunas de fase reversa (C_{18}) na etapa de limpeza^{68, 54, 69}.
- imunoenaios são úteis para uma triagem rápida e confirmação dos resultados.
- a realização de estudos colaborativos inter-laboratoriais deve ser incentivada.

RIALA 07/842

M. MACHINSKI J. – Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Laboratório de Toxicologia. Av. Colombo, 5790. CEP 87020-900. Maringá – Pr. Fone (044) 262-4350.

SUMMARY: Fumonisin are mycotoxins produced by *Fusarium* spp. and occur in corn used for food and in corn-based animal feeds. They have been shown to cause equine leukoencephalomalacia (ELEM), porcine pulmonary edema (PPE), and liver cancer in rats. epidemiological data from South Africa and China have associated fumonisin with esophageal cancer. The present paper reviews the analytical methodology currently described in the literature for the determination of fumonisin in foods and feeds.

DESCRIPTORS: Fumonisin, analytical methods, foods, feeds.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ACKERMANN, T. - Fast thin-layer chromatography systems for fumonisin isolation and identification. *J. Appl. Toxicol.*, **11**: 451, 1991.
02. AKIYAMA, H.; MIYAHARA, M.; TOYODA, M.; SAITO, Y. - Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis. *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **112**: 112-117, 1994.
03. AKIYAMA, H.; MIYARA, M.; TOYODA, M.; SAITO, Y. - Liquid chromatographic determination of fumonisin B_1 and B_2 in corn by precolumn derivatization with 4(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **36**(1): 77-81, 1995.
04. ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O. - Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. *Mycotoxin Res.*, **8**: 2-12, 1992.
05. ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SCHALKWYK, D.J.; BEHEREND, Y. - Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(6): 1729-1733, 1990.
06. AZCONA-OLIVERA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; PESTKA, J.J. - Generation of antibodies reactive with fumonisin B_1 , B_2 , and B_3 by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(1): 169-173, 1992.
07. AZCONA-OLIVERA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; PESTKA, J.J. - Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisin B_1 , B_2 , and B_3 . *J. Agric. Food Chem.*, **40**(3): 531-534, 1992.
08. BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. - Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisin. *J. AOAC Int.*, **77**(2): 501-506, 1994.

09. BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. - Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **11**: 743-745, 1988.
10. BUCCI, T.; HANSEN, D. K.; La BORDE, J. B.; - Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin Fumonisin B₁. *Natural Toxins* **4**:51-52, 1996.
11. CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. - Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.*, **39**(11): 1958-1962, 1991.
12. CHU, F.S.; HUANG, X.; MARAGOS, C.M. - Production and characterization of anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(1): 261-267, 1995.
13. CHUNG, S.H.; KIM, Y.B. - Natural occurrence of fumonisin B1 in Korean corn and rough rice. *Foods Biotechnol.*, **4**(3): 216-216, 1995.
14. COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R. - Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathol.*, **117**: 79, 1992.
15. DAWLATANA, M.; COKER, R.D.; NAGLER, M.J.; BLUNDEN, G. - A normal phase HPTLC method for the quantitative determination of fumonisin B1 in rice. *Chromatographia*, **41**(3/4): 187-190, 1995.
16. GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. - Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(7): 1806-1811, 1988.
17. GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. - Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, **12**: 1247-1251, 1991.
18. HANSEN, T.J.; ZABE, N.A.; SKIPPER, P.L. - Immunoaffinity isolation of fumonisin B1 and application to analysis in corn. *Abst. 106th AOAC Int. Ann. Mtg.*, 230, 1992. Apud: SCOTT, P.M. - Fumonisin. *Internat. Journal Food Microbiol.*, **18**, 257-270, 1993.
19. HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J.B.; CHIARELLI, M.P.; KORFMACHER, W.A.; THOMPSON Jr, H.C.; LAY Jr, J.O.; HANKINS, L.J.; CER-NIGLIA, C.E. - HPLC and FAB Mass Spectrometry analysis of fumonisins B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(3): 357-360, 1993.
20. HOLCOMB, M.; THOMPSON Jr, H.C.; HANKINS, L. J. - Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(5): 764-767, 1993.
21. HOPMANS, E.C.; MURPHY, P.A. - Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. *J. Agric. Food Chem.*, **41**(10): 1655-1658, 1993.
22. JACKSON, M.A.; BENNETT, G.A. - Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(8): 2296-2298, 1990.
23. KORFMACHER, W.A.; CHIARELLI, M.P.; LAY Jr, J.O.; BLOOM, J.; HOLCOMB, M.; McMANUS, K.T. - Characterization of the mycotoxin fumonisin B₁; comparison of thermospray, fast-atom bombardment and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**: 463-468, 1991.
24. LUKACS, Z.; SCHAPER, S.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H.U. - Identification and determination of fumonisin FB₁ and FB₂ in corn and corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray-ionization Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). *Chromatographia*, **43**(3/4): 124-128, 1996.
25. MARAGOS, C.M. - Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(2): 390-394, 1995.
26. MARAGOS, C.M.; PLATTNER, R.D.; MIKLASZ, S.D. - Determination of hydrolysed fumonisin B₁ (HFB1) in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Add. Contam.*, **13**(1): 105-113, 1996.
27. MARAGOS, C.M.; RICHARD, J.L. - Quantitation and stability of fumonisins B₁ and B₂ in milk. *J. AOAC Internat.*, **77**(5): 1162-1167, 1994.
28. MEREDITH, F.I.; BACON, C.W.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P. - Preparative LC isolation and purification of fumonisin B₁ from rice culture. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(1): 195-198, 1996.
29. MIYHARA, M.; AKIYAMA, H.; TOYODA, M.; SAITO, Y. - New procedure for fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products by ion pair chromatography with o-phthalaldehyde postcolumn derivatization and fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(3): 842-847, 1996.
30. MONTIGNY, P.; STOBAUGH, J.F.; GIVENS, R.S.; CARLSON, R.G.; SRINIVASACHAR, K.;

- STERNSON, L.A.; HIGUCHI, T. - Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. *Anal. Chem.*, **59**(8): 1096-1101, 1987.
31. NORRED, W.P. - Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health*, **38**: 309-328, 1993.
32. PESTKA, J.J.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; PLATTNER, R.D.; MINERVINI, F.; DOKO, M.B.; VISCONTI, A. - Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J. Food Prot.*, **57**(2): 167-172, 1994.
33. PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; PETERSON, R.; SHACKELFORD, D.D.; WEISLEDER, D. - A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia*, **82**(6): 698-702, 1990.
34. RICE, L.G.; ROSS, P.F. - Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Prot.*, **57**(6): 536-540, 1994.
35. RICE, L.G.; ROSS, P.F.; DEJONG, J.; PLATTNER, R.D.; COATS, J.R. - Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. *J. AOAC Internat.*, **78**(4): 1002-1009, 1995.
36. ROSS, P.F.; LEDET, A.E.; OWENS, D.L.; RICE, L.G.; NELSON, H.A.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M. - Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**: 69, 1993.
37. ROSS, P.F.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; OWENS, D.L.; NELSON, H.A.; RICHARD, J.L. - Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathol.*, **114**: 129-135, 1991.
38. ROTTINGHAUS, G.E.; COATNEY, C.E.; MINOR, H.C. - A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**: 326-329, 1992.
39. SCHNEIDER, E.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. - Rapid detection of fumonisin B₁ in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay/enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(9): 2548-2552, 1995.
40. SCOTT, P.M. - Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**: 257-270, 1993.
41. SCOTT, P.M. - Mycotoxin methodology. *Food Add. Contam.*, **12**(3): 395-403, 1995.
42. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Analysis of beer from fumonisins. *J. Food Prot.*, **58**(12): 1379-1382, 1995.
43. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Determination of hydrolysed fumonisin B₁ in alkali-processed corn foods. *Food Add. Contam.*, **13**(7): 823-832, 1996.
44. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. AOAC Internat.*, **75**(5): 829-834, 1992.
45. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. - Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J. AOAC Internat.*, **77**(2): 541-545, 1994.
46. SCOTT, P.M.; YEUNG, J.M.; LAWRENCE, G.A.; PRELUSKY, D.B. - Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins. *Food Add. Contam.*, **14**(5): 445-450, 1997.
47. SELIM, M.I.; EL-SHARKAWY, S.H.; POPENDORF, W.J. - Supercritical fluid extraction of fumonisin B₁ from grain dust. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(10): 3224-3229, 1996.
48. SHELBY, R.A.; KELLEY, V. C. - Detection of fumonisins in corn by immunoassay. *Phytopathology*, **82**: 500, 1992.
49. SHELBY, R.A.; ROTTINGHAUS, G.E.; MINOR, H.C. - Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detection of fumonisin on maize. *J. Agric. Food Chem.*, **42**(9): 2064-2067, 1994.
50. SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. - Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.*, **13**(10): 2077-2087, 1990.
51. SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. - Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **574**: 299-304, 1992.
52. STACK, M.E.; EPPLEY, R.M. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. *J. AOAC Internat.*, **75**(5): 834-837, 1992.
53. SUTIKNO; ABOUZIED, M.M.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; HART, L.P.; PESTKA, J.J. - Detection of fumonisins in *Fusarium* cultures, corn, and corn products by polyclonal antibody-based ELISA: relation to fumonisin B₁ detection by liquid chromatography. *J. Food Prot.*, **59**(6): 645-651, 1996.

54. SYDENHAM, E.W.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. - Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **38**(1): 285-290, 1990.
55. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. *J. AOAC Internat.*, **75**(2): 313-318, 1992.
56. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; BIRD, C.; MILLER, B.M. - Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(1): 159-164, 1996.
57. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; SCHALKWYK, D.J. - Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *J. AOAC Internat.*, **79**(3): 688-695, 1996.
58. SYDENHAM, E.W.; STOCKENSTRÖM, S.; THIEL, P.G.; RHEEDER, J.P.; DOKO, M.B.; BIRD, C.; MILLER, B.M. - Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC methods for the determination of fumonisins in corn: a comparative study. *J. Food Prot.*, **59**(8): 893-897, 1996.
59. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R. - Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.*, **38**(10): 1900-1903, 1990.
60. SYLER, D.J.; GILCHRIST, D.J. - Determination of host-selective phytotoxins from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* as their maleyl derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **238**: 167-173, 1982.
61. TEJADA-SIMON, M.V.; MAROVATSANGA, L.T.; PESTKA, J.J. - Comparative detection of fumonisin by HPLC, ELISA, and immunocytochemical localization in *Fusarium* cultures. *J. Food Prot.*, **58**(6): 666-672, 1995.
62. THAKUR, R.A.; SMITH, J.S. - Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, an meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(4): 1047-1052, 1996.
63. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.A. - The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathol.*, **117**: 3-9, 1992.
64. THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J. - Study of the reproducibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. *J. AOAC Internat.*, **76**(2): 361-366, 1993.
65. THOMPSON, V.S.; MARAGOS, C.M. - Fiber-optic immunosensor for the detector of fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(4): 1041-1046, 1996.
66. TRUCSESS, M.W.; STACK, M.E.; ALLEN, S.; BARRION, N. - Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisins B₁ in canned and frozen sweet corn. *J. AOAC Internat.*, **78**(3): 705-710, 1995.
67. USLEBER, E.; STRAKA, M.; TERPLAN, G. - Enzyme immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn-based food. *J. Agric. Food Chem.*, **42**(6): 1392-1396, 1994.
68. VELÁZQUEZ, C.; BLOEMENDAL, C.; SANCHIS, V.; CANELA, R. - Derivation of fumonisins B₁ and B₂ with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(6): 1535-1537, 1995.
69. VESONDER, R.; PETERSON, R.; PLATTNER, R.D.; WEISLEDER, D. - Fumonisin B₁: isolation from corn culture, and purification by high performance liquid chromatography. *Mycotoxin Res.*, **6**: 85-88, 1990.
70. VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; SOLFRIZZO, M.; PASCALE, M.; BOENKE, A. - European intercomparison study for the determination of fumonisins in maize. *Mikrochim. Acta*, **123**: 55-61, 1996.
71. VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; BACON, C.W.; NORRED, W.P. - Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathol.*, **112**: 81-92, 1990.
72. WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN Jr., A.; CARTER, L.; BENNETT, G.A. - Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Letters*, **26**(8): 1751-1770, 1993.
73. WARE, G.M.; UMRIGAR, P.; CARMAN Jr., A.; KUAN, S.S. - Evaluation of fumonitoxin immunoaffinity columns. *Anal. Letters*, **27**(4): 693-715, 1994.
74. WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; RICE, L.G. - Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 213-216, 1990.

75. XIE, W.; MIROCHA, C.J.; CHEN, J. - Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B₁ in corn by on-line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(4): 1251-1255, 1997.
76. YEUNG, J.M.; PRELUSKY, D.B.; SAVARD, M.E.; DANG, B.D.; ROBINSON, L.A. - Sensitive immunoassay for fumonisin B₁ in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(11): 3582-3586, 1996.

Recebido para publicação em 08/04/98