

## AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> EM MILHO

Simone Magda CAMARGOS  
Miguel MACHINSKI JUNIOR\*  
Lucia M. VALENTE SOARES\*\*

RIALA 06/868

CAMARGOS, S.M. et al.- Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B1 e B2 em milho. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 71-79, 1999.

**RESUMO:** Sistemas de extração e limpeza foram avaliados para determinação de fumonisinas em milho. O método descrito por Sydenham et alii (1992) apresentou a melhor limpeza. A recuperação encontrada, no entanto, estava abaixo de 50% para fumonisinas B1 e B2 (FB1 e FB2). O método foi modificado e a extração com metanol / água (3+1) foi mantida, os volumes de solvente no condicionamento e lavagem da coluna de troca aniônica forte foram aumentados para 10 mL e o volume e composição do solvente de eluição alterado para 20 mL metanol / ácido acético (95+5). Após estas modificações a recuperação elevou-se para a faixa de 93 a 96% para FB1 e 69 a 85% para FB2. O solvente de eluição por CLAE com detecção por fluorescência foi modificado para acetonitrila / água / ácido acético glacial (50+50+0,5) durante os primeiros 15 minutos com troca para acetonitrila pura até o final da corrida. As condições de derivação das FB1 e FB2 com o o-ftaldialdeído (OPA) foram também otimizadas empregando 100 L de extrato com 200 L do reagente OPA entre 5 — 15°C por 60 segundos. As novas condições melhoraram os limites de detecção para 20 e 40 ng/g para FB1 e FB2, respectivamente, e o desvio padrão relativo entre duplicatas para 0,6% para FB1 e 2,2% para FB2.

**DESCRITORES:** Micotoxinas, fumonisinas, milho, cromatografia líquida de alta eficiência.

### INTRODUÇÃO

As fumonisinas são toxinas capazes de causar leucoencefalomalácia equina (LEME)<sup>18</sup>, edema pulmonar e hidrotórax em suínos<sup>9</sup>, câncer hepático em ratos<sup>11</sup> e leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos<sup>5</sup>. Os altos níveis de uma destas toxinas (fumonisina B<sub>1</sub>) em milho, utilizado na dieta humana em algumas localidades da África do Sul e no norte da China, tem sido apontado como a possível causa da alta incidência de câncer de esôfago nas populações envolvidas<sup>8,27,29</sup>.

Esta família de toxinas é de descoberta recente e sua existência foi primeiro relatada em 1988<sup>11,12</sup> por um grupo de pesquisadores da África do Sul. São produzidas por cepas de *Fusarium moniliforme* Sheldon<sup>30</sup>, *F. proliferatum* Seção Liseola<sup>15</sup> e *F. nygamai*<sup>7</sup>. O milho tem sido o cereal mais implicado em contaminação por fumonisinas, tanto em frequência como em níveis. Realmente, o *F. moniliforme* e o *F. proliferatum* são invasores frequentes do milho em todo o mundo<sup>6</sup>.

Originalmente, BEZUIDENHOUT *et alii*<sup>4</sup> descreveram e caracterizaram quimicamente quatro metabóli-

\* Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Toxicologia. Av. Colombo, 5790. 87020-900. Maringá. Paraná.

\*\* Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. CP 6121 13081-970 — Campinas — São Paulo.

tos, as fumonisinas A<sub>1</sub> (FA<sub>1</sub>), A<sub>2</sub> (FA<sub>2</sub>), B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). A FB<sub>1</sub> é a mais importante do grupo, constituindo frequentemente até 70% do total das fumonisinas, produzidas tanto em cultivos, quanto em milho naturalmente contaminado.

O milho é o cereal mais produzido no Brasil<sup>14</sup> e o nosso país é o terceiro produtor mundial. Apesar disto a produção nacional não satisfaz as necessidades internas e grandes volumes de importação são realizadas. Algumas espécies de *Fusarium* já foram isoladas de milho, trigo, arroz e rações, procedentes de vários Estados brasileiros, em proporções variadas, com predominância de *F. moniliforme* e *F. graminearum*<sup>19</sup>. Segundo WENTZ *et alii*<sup>35</sup>, 90% das amostras de milho e de rações, para suínos e aves, por eles examinadas no Estado de Santa Catarina, estavam contaminadas com *Fusarium* spp. ASEVEDO<sup>3</sup> trabalhando com 90 amostras de milho procedentes de várias regiões do Brasil, encontrou *Fusarium* spp em 62,2% das amostras. CORREA *et alii*<sup>10</sup>, verificaram uma frequência de 85,1% de *F. moniliforme* em milho pós-colheita.

Informações sobre a incidência de fumonisinas em milho e produtos à base de milho brasileiros são raras na literatura científica. No entanto, as existentes mostram a importância do problema para o nosso país. Em trabalho realizado por SYDENHAM *et alii*<sup>25</sup>, foram analisadas 21 amostras de ração associadas a casos de micotoxicoses na região de Londrina, Paraná. Os resultados revelaram que 95,2% continham FB<sub>1</sub> e 85,7% continham FB<sub>2</sub>. Já HIROOKA *et alii*<sup>13</sup> investigaram 48 amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, das safras de 1990-1991. Das amostras analisadas, 97,4% apresentavam-se positivas para FB<sub>1</sub> e 94,8% para FB<sub>2</sub>. Um total de 4 amostras excederam a 10 µg/g, valor considerado crítico para o desencadeamento da LEME.

Devido ao amplo potencial de contaminação do milho e derivados com fumonisinas<sup>16,21,29,32,36</sup>, métodos analíticos que monitorem os níveis de fumonisinas nos produtos agrícolas são de grande interesse para analistas ligados a órgãos de fiscalização ou de pesquisa. Este fato é reforçado pelas necessidades de fiscalização do cereal e seus produtos originados interna ou externamente. É também possível que a escassez de informações sobre a incidência de fumonisinas, no Brasil, advenha exatamente das dificuldades encontradas no país com a metodologia analítica. Diante deste quadro os objetivos do presente trabalho foram: (1) avaliar um conjunto de técnicas já existentes relatadas na literatura e julgadas promissoras para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em milho; (2) uma vez escolhido o método analítico, proceder à sua otimização e adequação para as condições de trabalho encontradas em laboratórios brasileiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: amostras de milho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, São Paulo. As amostras foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 20 mesh e acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis à água. Foram mantidas a -18°C até o momento da análise.

Padrões de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: soluções estoques individuais de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila-água (1+1) segundo VISCONTI *et alii*<sup>34</sup>, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas em concentrações de 50 µg/mL de FB<sub>1</sub> e de FB<sub>2</sub>, respectivamente. Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

Fase móvel: as fases móveis testadas foram filtradas através de uma membrana HVLP 01300 de 0,45 µm de diâmetro (Millipore Corporation, Milford, MA) e degaseificadas em banho de ultra-som. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min.

Reagente de derivação: dissolver 40 mg de o-ftaldialdeído em 1 mL de metanol e diluir com 5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (dissolver 3,8 g de tetraborato de sódio em 100 mL de água deionizada e corrigir o pH para 10,4 com hidróxido de sódio 0,1 M), adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol e misturar. Estocar em frasco âmbar vedado com papel alumínio sob temperatura de 5 a 15 °C. Estável por uma semana.

Cromatógrafo à líquido: bomba (Waters Associates, Milford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc. M-7125 (Cotati, CA). Detector de fluorescência HP 1046 A (Hewlett Packard, Avondale, PA) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 335 e 440 nm e fenda espectral de 17 e 50 nm, respectivamente. Integrador HP 3393 A (Hewlett Packard, Avondale, PA). Coluna de fase reversa (250 mm x 4,6 mm da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS). Coluna de guarda da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com C<sub>18</sub> ODS (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL). Pré-coluna da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com sílica Sil-X-1 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

Otimização da separação cromatográfica das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: fases móveis com diferentes composições foram avaliadas através da resolução das toxinas, com padrões e posteriormente com amostras artificialmente contaminadas com 2 µg/g de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

Otimização da derivação da fumonisina B<sub>1</sub> com o-ftaldialdeído: a formação do derivado FB<sub>1</sub>-OPA foi estudada: (1) variando-se o tempo e temperatura durante a reação de derivação; (2) verificando a relação ótima

entre a concentração dos padrões e o volume do reagente de derivação. Foi realizada análise de variância dos dados obtidos.

Avaliação de sistemas de extração e limpeza: quatro sistemas de extração e limpeza foram avaliados quanto a sua eficiência usando-se amostras de milho artificialmente contaminadas. Foram avaliados os métodos de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA<sup>22</sup>, PRADO *et alii*<sup>17</sup>, ZOLLER *et alii*<sup>36</sup> e SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>. O primeiro sistema de extração e limpeza foi preconizado para aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A e esterigmatocistina e o segundo para aflatoxinas. Foram escolhidos para avaliação devido a características de praticabilidade e facilidade de emprego em laboratórios nacionais. A concentração de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> nas amostras enriquecidas de milho foi de 2 µg/g.

Avaliação de colunas de extração em fase sólida: as colunas de troca aniônica forte de 500 mg, Sep Pak QMA (Waters Associates, Milford, MA) e SAX (Varian, Harbor City, CA 90710) e a coluna de fase reversa Sep Pak C<sub>18</sub> (Millipore Corporation, Milford, MA) foram avaliadas quanto à eficiência de limpeza e quanto à recuperação de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em amostras de milho artificialmente contaminadas.

Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: vários aspectos com relação a técnica analítica foram avaliados, incluindo a recuperação de cada fumonisina individualmente, a linearidade da curva padrão, o limite de detecção do método e a repetibilidade da técnica. Para a recuperação, 50 g da amostra de milho, livre de fumonisinas, foram contaminadas com 2 µg/g dos padrões de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>. A linearidade da curva padrão foi determinada pela análise cromatográfica de padrões diluídos em concentrações decrescentes e submetidos a reação com o o-ftaldialdeído. O limite de detecção do método foi definido para nossas condições de trabalho, como a concentração das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> presente na amostra que originou um pico com uma área de  $1 \times 10^5$  mV. Esta área foi escolhida por ser a menor que permitia visualização inequívoca do pico. A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) do resultado da análise de 4 amostras de milho contaminadas artificialmente com 2 µg/g de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

Descontaminação do material: todo o material utilizado foi descontaminado com uma solução concentrada de hipoclorito de sódio comercial, por 24 horas. Após a descontaminação o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco em estufa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização das condições de eluição no cromatógrafo à líquido: Várias fases móveis foram estudadas para separar os derivados de fumonisinas-OPA das impurezas resultantes da derivação ou de interferentes provenientes do extrato da amostra em cromatógrafo à líquido. A melhor resolução para o pico de FB<sub>1</sub> foi conseguida com acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5) como fase móvel. Com a fase móvel escolhida, o tempo de retenção da FB<sub>1</sub> foi de 10,1 e o da FB<sub>2</sub> de 42,6 minutos. Após 15 minutos da injeção da amostra, o sistema solvente foi mudado para acetonitrila pura. E assim o tempo de retenção da FB<sub>2</sub> foi reduzido para 26 minutos. Os cromatogramas das soluções padrão de 50 µg/mL de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> e do extrato de milho naturalmente contaminado estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

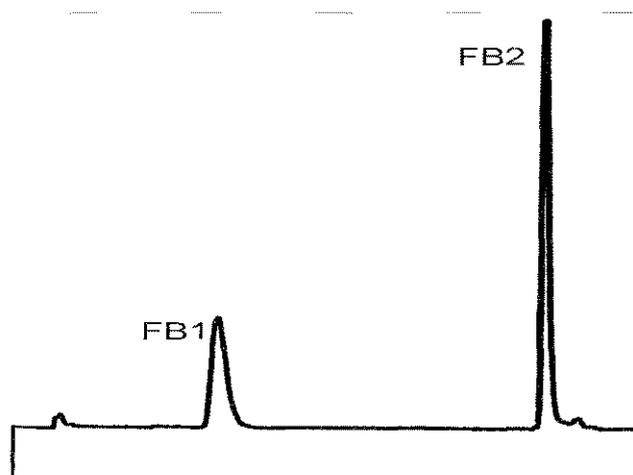


Figura 1 — Cromatograma das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (solução padrão com 50 µg/mL de cada).

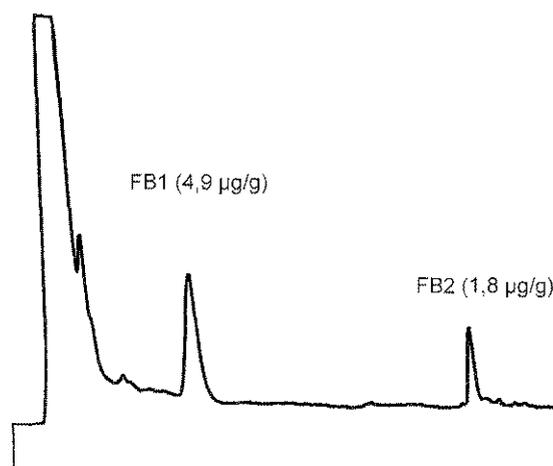


Figura 2 — Cromatograma de amostra de milho naturalmente contaminada com FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

Formação do derivado FB<sub>1</sub>-OPA: As fumonisinas não apresentam fluorescência e absorvem pobremente no ultravioleta/visível (UV/VIS). Assim sendo, uma reação de derivação é necessária para possibilitar a sua determinação por CLAE com detetor de fluorescência ou de absorvância no UV/VIS. A reação com marcador fluorescente tem sido favorecida por permitir limites de detecção (LD) mais baixos. Os reagentes propostos até agora tem sido fluorescamina (LD < 10 mg/kg), o-ftal-dialdeído (OPA, LD 50 ng/g), naftaleno — 2 — 3 dicarboxaldeído (NDA, LD 5 ng/mL, usado em leite), 4 — fluoro — 7 — nitrobenzofurazano (NBD-F, LD 100 ng/g) e fluorenilmetil cloroformato (FMOC, LD 200 ng/g)<sup>24</sup>. O OPA oferece como vantagens um custo muito inferior aos demais, exceto a fluorescamina, ser facilmente disponível e melhor limite de detecção. A reação com o OPA dá-se com grupos funcionais do tipo amina.

O derivado fumonisina OPA não é estável. Assim o efeito do tempo de reação na derivação das fumonisinas foi estudado. Para verificar qual seria o melhor tempo de reação, manteve-se o tempo de agitação inicial em 30 segundos e variou-se o tempo para injeção no cromatógrafo à líquido em 30, 45, 60, 90 e 120 segundos após o início da reação. O tempo de reação de 60 segundos antes da injeção da amostra apresentou intensidade máxima de fluorescência. No mesmo tempo de reação, a repetibilidade dos resultados foi a melhor (coeficiente de variação — 23,6%). Nos outros tempos de reação analisados houve maior variação e menor intensidade de fluorescência.

Para conseguir maior rendimento na formação do derivado fumonisinas-OPA, foram estudadas diferentes temperaturas de reação (5 a 30°C). A faixa de temperatura entre 5 — 15°C dá origem a picos com áreas maiores, possivelmente por melhorar a estabilidade do derivado evitando que se degrade rapidamente. Este resultado contraria os apresentados por THAKUR & SMITH<sup>25</sup> que verificaram não haver diferença significativa na estabilidade da fluorescência do derivado em temperaturas entre 4 a 25°C.

Para verificar a melhor relação entre a concentração e o volume da solução de fumonisinas, por um lado, e o volume do reagente de derivação OPA, por outro, foi utilizado um esquema fatorial com análise de variância. Foram analisados: concentração do padrão — 25 e 50 µg/mL; volume do padrão — 50, 100, 150 e 200 µL; e volume do reagente de derivação — 150, 200 e 250 µL. A condição ótima de trabalho foi obtida quando a concentração do padrão de fumonisinas foi a de 25 µg/mL, o volume do padrão 100 µL e o volume do reagente OPA de 200 µL.

Avaliação de sistemas de extração e limpeza:

Os métodos descritos por SOARES E RODRIGUEZ-AMAYA<sup>22</sup> E POR PRADO *ET ALII*<sup>17</sup>, não produziram uma limpeza adequada, apresentando grande quantidade de interferentes no cromatograma. O emprego de sulfato de amônio, em ambos os métodos, dá origem a um precipitado quando o extrato é re-suspendido em acetonitrila/água (1+1), para injeção em cromatógrafo à líquido. O uso de acetato de chumbo, no método de PRADO *et alii*<sup>17</sup>, pode, por sua vez, danificar a coluna analítica pela introdução de um metal pesado no sistema. O desengorduramento com isoctano foi acrescentado para remover os compostos lipossolúveis. A partição para clorofórmio, uma outra etapa do processo de limpeza, mostrou melhor recuperação das fumonisinas quando empregada sozinha e não quando precedida de desengorduramento com isoctano. No entanto, a recuperação das fumonisinas foi inadequada e inferior a 20% em todos estes casos e as etapas de uma maneira geral mostraram-se trabalhosas.

Tanto o método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>, como o de ZOLLER *et alii*<sup>36</sup>, apresentaram recuperações inferiores a 50%. A limpeza do método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>, no entanto mostrou menor número de interferentes. Por este motivo foi considerado mais promissor e modificações foram introduzidas no sentido de otimizá-lo. Este método, por outro lado, foi objeto de estudos colaborativos internacionais<sup>30,31</sup> e foi adotado pela AOAC International<sup>2</sup>.

Avaliação de colunas de extração em fase sólida: Os extratos, obtidos através dos quatro métodos sendo avaliados no presente trabalho, foram ainda submetidos a uma etapa de limpeza com colunas de extração em fase sólida. Foram testadas uma coluna de fase reversa tipo octadecilsilil (C<sub>18</sub>) (Tabela 1) e duas colunas de troca aniônica forte (Tabela 2).

A limpeza com coluna de fase reversa não foi eficiente, apresentando ainda vários interferentes no cromatograma. Durante a eluição das fumonisinas da coluna de C<sub>18</sub>, maiores recuperações foram obtidas quando o solvente de extração utilizado foi metanol/água (3+1), mas ainda assim insatisfatórias.

A limpeza com as colunas de troca aniônica forte (Tabela 2) apresentou melhores resultados do que com as colunas de octadecilsilil, mas ainda assim foi necessário introduzir modificações nos solventes de condicionamento e eluição com relação aos propostos no método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup>. A limpeza com coluna de troca aniônica forte (500 mg) não produziu bons resultados uma vez que retinha 60% de FB.

O condicionamento das colunas foi otimizado alterando-se os seguintes parâmetros: volume das soluções de lavagem, força iônica, volume da solução e vazão de eluição. O aumento da força iônica, ou seja, metanol/ácido acético glacial (99+1) para (95+5) aumentou a

Tabela 1. Solventes testados com coluna de fase reversa tipo octadecilsilil, para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.

Condicionamento da coluna	Aplicação da amostra	Lavagem da amostra	Eluição das toxinas
5 mL metanol	10 mL em metanol/ água (3+1)	6 mL metanol/água 3 mL metanol	Metanol/água (3+1)
5 mL metanol	10 mL em metanol/ água (3+1)	10 mL em metanol/ água (3+1)	Metanol/ácido acético (99,5 + 0,5)

Tabela 2. Solventes testados com colunas de troca aniônica forte para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.

Condicionamento da coluna	Aplicação da amostra	Lavagem da coluna	Eluição das toxinas	Referências
5 mL metanol	1 mL em metanol/ água (3+1)	6 mL metanol/ água (3+1) 3 mL metanol	10 mL metanol ácido acético (99,5 + 0,5)	UENO <i>et alii</i> <sup>32</sup>
5 mL metanol 5 mL metanol/ água (3+1)	10 mL em metanol/ água (3+1)	5 mL metanol/ água (3+1)	10 mL metanol/ ácido acético (99+1)	SYDENHAM <i>et alii</i> 26
3 mL metanol 8 mL metanol 8 mL metanol/ água (3+1)	5 — 15 mL em metanol/ água (3+1)	8 mL metanol/ água (3+1) 5 mL metanol	10 mL metanol/ ácido acético 10 mL metanol/ ácido acético (99+1)	ZOLLER <i>et alii</i> <sup>36</sup>

Em todas as misturas metanol/água recomenda-se manter o pH entre 5,8 e 6,5.

recuperação das fumonisinas. Além disso, o uso de solvente com maior força iônica não resultou na co-eluição de interferentes cromatográficos. Adicionalmente, com o aumento da quantidade de eluente para 20 mL conseguiu-se recuperações de 72 a 87% de FB<sub>1</sub> e de 51 a 78% de FB<sub>2</sub> em coluna Sep Pak QMA e de 93 a 96% de FB<sub>1</sub> e de 69 a 85% de FB<sub>2</sub> em colunas SAX nas duas primeiras utilizações (Tabela 3). Já foi relatado que a recuperação das fumonisinas é substancialmente menor quando a vazão de eluição nas colunas está entre 2,5 para 6,7 mL/minuto, recomendando-se <sup>25</sup> vazões iguais ou menores que 1 mL/min. A necessidade de manter estas condições de eluição foram constatadas no presente trabalho.

A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de HCl 0,1 M seguidos de 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM *et alii* <sup>26</sup>. Nenhuma diferença significativa foi observada na recuperação das fumonisinas após regeneração das colunas. O mesmo foi constatado no presente trabalho (Tabela 3). Estes resultados sugerem que, se necessário, as colunas podem ser regeneradas e reutilizadas mais uma vez sem queda significativa na recuperação das fumonisinas.

A limpeza com colunas de C<sub>18</sub> é mais rápida, entretanto, as colunas de troca aniônica forte produzem frações mais limpas e o limite de detecção é menor. Numa intercomparação de métodos realizada entre 31 laborató-

Tabela 3. Recuperação das fumonisinas adicionadas a milho quando são usadas colunas de extração em fase sólida de troca aniônica forte de diferentes marcas em mais de uma utilização por coluna.

Marca da Coluna	Fumonisina	Recuperação (%)				
		1º uso	2º uso	3º uso		
Sep Pak	FB <sub>1</sub>		87	82	39	
			86	73		
			80	73		
			77	75		
	FB <sub>2</sub>		78	59	22	
			78	51		
				62		
				60		
SAX	FB <sub>1</sub>		96	94	62	
			96	93		70
			95			
			96			
	FB <sub>2</sub>		70	84	56	
			69	85		62
			72			

Nível de adição por fumonisina = 2 g/g

Demais condições analíticas conforme descrito nas Conclusões.

rios europeus, aqueles que usaram limpeza com colunas de C<sub>18</sub> relataram também mais interferentes e limites de detecção piores que aqueles que usaram colunas de troca aniônica forte<sup>33</sup>.

Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: A recuperação do método otimizado foi de 93 a 96% para FB<sub>1</sub> e de 69 a 85% para FB<sub>2</sub>. No estudo colaborativo do método de SYDENHAM *et alii*<sup>26</sup> conduzido por AOAC-IUPAC, os 12 laboratórios envolvidos obtiveram recuperações de 81 a 84% para FB<sub>1</sub> e 76 a 82% para FB<sub>2</sub>. Já os resultados com laboratórios europeus, em estudo em que a metodologia era de livre escolha, as recuperações médias foram 70% para FB<sub>1</sub> e 69% para FB<sub>2</sub><sup>33</sup>. Segundo ALBERTS *et alii*<sup>1</sup> as recuperações mais baixas obtidas para FB<sub>2</sub> podem ser devido a diferença de polaridade em relação a FB<sub>1</sub> que resulta em uma perda de aproximadamente 20% durante a etapa de limpeza, em comparação com os 4% para FB<sub>1</sub>. As curvas padrão para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram lineares de 20 a 10000 ng/g e de

40 a 10000 ng/g, respectivamente, conforme apresentada nas Figura 3.

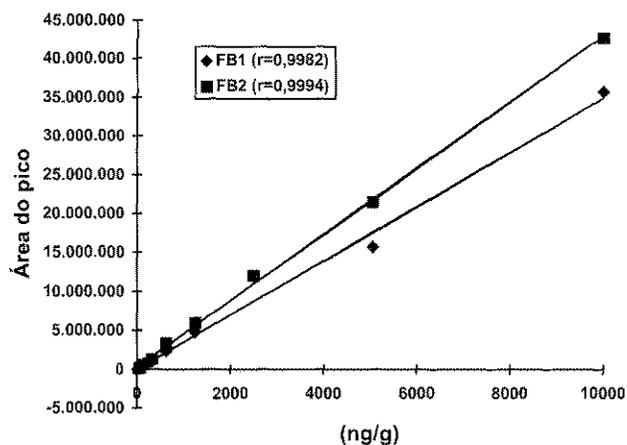


Figura 3 — Curvas padrão de FB1 e FB2.

Os limites de detecção do método foram de 20 e 40 ng/g para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente. SHEPHARD<sup>30</sup> revendo a literatura sobre o assunto dá como usual um limite de detecção da ordem de 50 ng/g para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 0,6 % para FB<sub>1</sub> e 2,2% para FB<sub>2</sub> para primeira ou segunda utilização das colunas de SAX. Resultados estes que comparam bem com os encontrados no estudo colaborativo AOAC — IUPAC onde os RSD internos dos laboratórios variaram entre 5,8 a 13,2% para FB<sub>1</sub> e entre 7,2 e 17,5% para FB<sub>2</sub><sup>35</sup>. No estudo europeu<sup>33</sup>, os valores médios de RSD foram de 10% para FB<sub>1</sub> e 11% para FB<sub>2</sub>.

### CONCLUSÕES

Método otimizado para determinação de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em milho: O método escolhido para determinação de fumonisinas em milho na etapa de avaliação foi o método de SYDENHAM *et alii*<sup>35</sup>. Modificações foram necessárias para aumentar a recuperação das toxinas e melhorar o limite de detecção. O método modificado está descrito a seguir:

Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 100 mL de metanol/água (3+1) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para 5,8-6,5 com hidróxido de sódio 1 M (somente 2 a 3 gotas).

A limpeza do extrato filtrado foi conduzida em colunas SAX com 500 mg de recheio. O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens com 10 mL de metanol, seguidos de 10 mL de metanol/água (3+1). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e lavados com 10 mL de metanol/água (3+1), seguidos por

6 mL de metanol. As fumonisinas foram então eluídas com 20 mL de metanol-ácido acético glacial (95+5). Todos os solventes foram passados pela coluna com uma vazão máxima de 1 mL/min a qual pode ser controlado com vácuo. O eluato foi evaporado a 60°C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo concentrado foi lavado com 1 mL de metanol e novamente evaporado para garantir que todo o ácido acético fosse evaporado. O resíduo seco foi mantido em freezer a -18°C até o momento da análise.

Os extratos das amostras de milho foram re-dissolvidos em 500 µL de acetonitrila/água (1+1) e filtrados em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro. Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA. Foi agitado em ultra-som, entre 5-15°C, durante 30 segundos e injetados 20 µL no cromatógrafo após 60 segundos do início da reação.

As fumonisinas foram separadas e quantificadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência usando uma fase móvel composta por acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5) durante 15 minutos e em seguida por acetonitrila pura. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Após a corrida foram necessários 30 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel composta por acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5), antes da próxima injeção.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo — FAPESP pelo suporte financeiro à realização de trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES, pela concessão das bolsas de estudo aos dois primeiros autores.

RIALA 06/868

CAMARGOS, S.M. et al. Evaluation of analytical methods and optimization of conditions for the determination of fumonisins B1 and B2 in corn.

**ABSTRACT:** Extraction and clean up systems were evaluated for the determination of fumonisins in corn. The best clean up was found in the method described by Sydenham *et alii* (1992). Recovery, nonetheless, was found to be below 50% for fumonisins B1 and B2 (FB1 and FB2). The method was modified and methanol/water (3+1) was kept as the extraction solvent, the volumes of the anionic exchange column conditioning and washing solvents were increased to 10 mL and both the volume and the composition of the eluting solvent were altered to 20 mL methanol/acetic acid (95+5). After these modifications were introduced the method recovery was 95 to 96% for FB1 and 69 to 72% for FB2. The elution solvent for the HPLC with fluorescence detection step was also modified to acetonitrile/water/acetic acid (50+50+0,5) during the first 15 minutes followed by pure acetonitrile for the rest of the run. The conditions employed during the derivatization reaction of fumonisins with o-phthalaldehyde (OPA) were also optimized to utilize 100 L sample extract and 200 L OPA solution at 5 — 15 °C during 60 seconds. The new conditions improved the detection limits to 20 and 40 ng/g for FB1 and FB2, respectively, and to an average standard deviation between duplicates of 0,6% for FB1 and for FB2.

**KEY WORDS:** Mycotoxins, fumonisins, corn, high performance liquid chromatography.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16ª Edição, 3ª Revisão, Gaithersburg, M.D., 1997.
3. ASEVEDO, I.G. *Estudo da microbiota fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por Aspergillus flavus Link, 1809 em amostras de milho provenientes de silos*. São Paulo, Dissertação de Mestrado — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1988.
4. BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G. & VLEGGARR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 11: 743-745, 1988.
5. BUCCI, T.; HANSEN, D.K. & LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin *Fumonisin B<sub>1</sub>*. *Nat. Tox.*, 4: 51-52, 1996.
6. BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: *Fumonisins in Food*, New York, Jackson, L.S.; DeVries, J.W.; Bullerman, L.B. (eds.), 1995, p. 27 — 38.
7. BURGESS, L.W. & TRIMBOLI, D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. *Mycologia*, 78: 223-229, 1986.
8. CHU, F.S. & LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 847 — 852, 1994.
9. COLVIN, B.M. & HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathol.*, 117: 79-82, 1992.
10. CORREA, B.; POZZI, C.R.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. & CHACON-RECHE, N.O. Postharvest and stored corn in Brazil. Mycoflora, interation abiotic factors, and mycotoxins occurrence. *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, Mexico City, Livro de Resumos, 1992, p. 123.
11. 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.
12. GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O.; VLEGGARR, R.; THIEL, P.G. & CAWOOD, M.E. — Fumonisins: isolation, chemical, characterization and biological effects. *Mycopathol.*, 117: 11-16, 1992.
13. HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y. & UENO, Y. — The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Add. Contam.*, 13: 173-183, 1996.
14. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Anuário Estatístico do Brasil*, Rio de Janeiro, 1996.
15. NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. & MARASAS, W.F.O., *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. State College, Pa., 1983, 203 p.
16. PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M. & GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Add. Contam.* 14: 187 — 191, 1997.
17. PRADO, G.; LEITE, M.P.M.B. & NICÁCIO, M.A.S. Estudo comparativo de métodos analíticos para quantificação de aflatoxinas em ração animal. *Bol. SBCTA*, 27: 9-13, 1993.
18. 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. Diag. Investig.*, 5: 69-74, 1993.
19. SALGADO, J.M. & CARVALHO, P.C.T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I — Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. *Rev. Microbiol.*, 11: 60-63, 1980.
20. SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J. Chromatogr.* 815: 31-39, 1998.
21. SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S. & SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contaminated of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.*, 79: 671-687, 1996.
22. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods, utilizing a multi-toxin thin layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 22-26, 1989.
23. SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. & HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected

- animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 994-997, 1992.
24. SYDENHAM, E.W. & SHEPHARD, G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. London, Gilbert, J. (ed), *Progress in Food Contaminat Analysis*, 1996, p.65 — 146.
25. SYDENHAM, E.C.; SHEPHARD, G.S. & THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> in foods and feeds. *J. AOAC Int.*, 75: 313-318, 1992.
26. SYDENHAM, E.C.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W. & VAN SCHALKWYK, D.J. — Liquid Chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, 79: 688-696, 1996.
27. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; VAN 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: 1900 — 1903, 1990.
28. THAKUR, R.A. & SMITH, J. S. Determination of fumonisins B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 44:1047-1052, 1996.
29. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. ; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. & GELDERBLUM, W.C.A. — The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathol.*, 117: 3-9, 1992.
30. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. & NIEUWENHUIS, J.J. Survey of fumonisin production by Fusarium species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1089-1093, 1991.
31. THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.C.; SHEPHARD, G.S. & Van SCHALKWYK, D.J. — Study of the reproducibility characteristics of a Liquid Chromatographic method for the determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn: IUPAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, 76: 361-366, 1993.
32. UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D.S.; LEE, U.S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G. & YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.*, 9:, 27-34, 1993.
33. VISCONTI, A. ; BOENKE, A. ; SOLFRIZO, M.; PASCALE, M.& DOKO, M.B. European intercomparison study for the determination of the fumonisins content in two maize materials. *Food Add. Contam.* 13: 909 — 927, 1996.
34. VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B. & BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. *Food Add. Contam.*, 11: 427-431, 1994.
35. WARE, G.M.; FRANCIS, O. ; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN, A. & CARTER, L. Determination of fumonisin B1 in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Lett.*, 26: 1751 — 1770, 1993.
36. WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SOBESTIANSKY, J.; SANTOS, C.R.M. & REES, U. Fusariotoxicoses e estrogenismo em suínos. *Comunicação Técnica CNPSA/EMBRAPA*, 24: 1-3, 1981.
46. ZOLLER, O.; SAGER, F. & ZIMMERLI, B. Vorkommern von fumonisin in Lebensmitteln. *Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg.*, 85.: 81-99, 1994.

Recebido para publicação em 16.03.1999

