

## METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DAS FUMONISINAS EM MILHO E ALIMENTOS À BASE DE MILHO

Celeste M. Lino\*, Liliana J. G. Silva e Angelina S. Pena

Centro de Estudos Farmacêuticos, Grupo de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 3000-295 Coimbra, Portugal

Recebido em 19/1/05; aceite em 7/7/05; publicado na web em 20/1/06

ANALYTICAL METHODOLOGIES FOR THE DETERMINATION OF FUMONISINS IN MAIZE AND MAIZE-BASED FOOD PRODUCTS. Fumonisin are mycotoxins occurring worldwide, mainly in maize and maize-based food products, which could affect animal and human health. This paper reviews analytical methodologies for the determination of these fungal toxins in foods. It includes extraction, cleanup, derivatization procedures, detection, quantification, and confirmation procedures. Initial attempts at gas chromatographic methods and thin layer chromatography were supplanted by liquid chromatographic methods, mainly performed with fluorometric detection, or mass spectrometry detection, enabling the analysis of polar and thermolabile chemicals without chemical derivatization, which results in lower limits of detection. Alternative methods, such as enzyme linked immunosorbent assay or zone capillary zone electrophoresis, are also described.

Keywords: fumonisins; analytical methodologies; maize.

## INTRODUÇÃO

As fumonisinas são produzidas por espécies do género *Fusarium*<sup>1</sup>. As espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas são o *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinónimo de *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella moniliformes*, sinónimo *Giberella fujikuroi*)<sup>2</sup> e o *Fusarium proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg. Ambas as espécies são isoladas no milho, sendo a primeira a mais prevalente<sup>3</sup>.

As fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) foram isoladas de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 por Gelderblom *et al.*, investigadores do "South African Medical Research Council", em 1988<sup>4</sup>. Vinte anos de investigação na possível causa para a elevada incidência de cancro esofágico (EC) na região de Transkei (África do Sul) culminaram com esta descoberta<sup>6</sup>.

A FB<sub>1</sub> é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2S-amino-12S,16R-dimetilo-3S,5R,10R,14S,15R-penta-hidroxi-coisano, em que os grupos hidroxilos em C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub> estão esterificados com um grupo carboxilo terminal do ácido tricarbóxico<sup>8,9</sup>. A FB<sub>2</sub> não possui o grupo hidroxilo em C<sub>10</sub>, enquanto que a FB<sub>3</sub> não apresenta o grupo hidroxilo em C<sub>5</sub> (Figura 1).

Existem diferentes séries de fumonisinas, estruturalmente relacionadas: A (A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>), B (B<sub>1</sub>-B<sub>4</sub>), C (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) e P<sup>10</sup>. No entanto, a que se encontra em maior abundância é a FB<sub>1</sub>, seguindo-se a FB<sub>2</sub> e a FB<sub>3</sub><sup>11</sup>, sendo também considerada a mais tóxica. A quantidade de fumonisinas hidrolisadas (HFBs) e parcialmente hidrolisadas (PHFBs) em milho naturalmente contaminado é bastante inferior relativamente à quantidade de fumonisinas intactas. Os métodos utilizados nos processos de fabrico de produtos derivados do milho podem converter fumonisinas intactas em fumonisinas hidrolisadas e parcialmente hidrolisadas<sup>12</sup>.

Estas micotoxinas contribuem para uma série de conseqüências a nível celular, como sejam a indução de apoptose e efeitos carcinogénicos<sup>13-16</sup>.

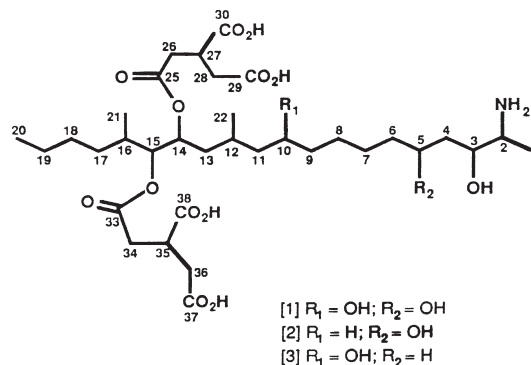


Figura 1. Estrutura das fumonisinas B<sub>1</sub> [1], B<sub>2</sub> [2] e B<sub>3</sub> [3]

A contaminação de alimentos e rações, com fumonisinas, tem sido associada a doenças várias que podem afectar a saúde em animais e em humanos. São hepatotóxicas e nefrotóxicas para a maioria das espécies animais testadas<sup>17</sup>. Nos cavalos conduzem ao aparecimento de leucoencefalomalacia (ELEM), em suínos provocam edema pulmonar (PPE). Em ovelhas, ratos e coelhos levam à toxicidade renal, sendo também hepatotóxicas para os segundos. Outras espécies também são atingidas por toxicoses provocadas por estas micotoxinas. Também têm sido epidemiologicamente relacionadas com o EC nos humanos, tendo sido declaradas pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como possíveis carcinogénicos para o homem (grupo 2B)<sup>16</sup>. Estas micotoxinas são citotóxicas e inibem a síntese proteica e do DNA, promovem stress oxidativo, induzem a fragmentação do DNA e interrompem o ciclo celular<sup>18</sup>. São análogas da esfinganina, inibindo a biossíntese dos esfingolípido<sup>13,19</sup>.

Os problemas e riscos associados à contaminação por fumonisinas de rações para animais e alimentos para humanos resultaram no desenvolvimento de métodos precisos, fidedignos e sensíveis para determinação das mesmas nas matrizes referenciadas<sup>20</sup>. Com a finalidade de avaliar a exposição às fumonisinas é essencial metodologia analítica sensível, exacta e

\*e-mail: cmlino@ci.uc.pt

reprodutível para sua detecção. Desde a descoberta destas micotoxinas e sua caracterização em 1988, houve um progresso significativo nos métodos analíticos usados para as detectar<sup>21</sup>. A grande maioria dos métodos referenciados envolve extração, recorrendo a misturas de solventes polares, seguido de um processo de purificação com extração em fase sólida (SPE) com colunas de fase reversa, cartuchas de troca iónica forte (SAX) ou colunas de imunoafinidade (IAC).

A detecção e quantificação são efectuadas principalmente recorrendo a métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) com detecção fluorimétrica (HPLC-FD), a mais utilizada, ou com detecção por espectrometria de massa (LC-MS), a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia gasosa (GC) associada a diferentes detectores, como o de massa (GC-MS). O desenvolvimento de métodos imunológicos, como “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), permite análises mais rápidas. Métodos electroforéticos, como electroforese capilar de zona (CZE), podem constituir uma alternativa, embora menos usados.

Porém, algumas destas técnicas não respondem às necessidades actuais, dada a morosidade, requerem equipamento extremamente caro e não apresentam sensibilidade adequada<sup>21</sup>.

Neste artigo de revisão serão abordadas diferentes metodologias analíticas bem estabelecidas e validadas, aplicadas à extração, purificação, derivatização, detecção e quantificação e confirmação de fumonisinas em milho e em alimentos processados a partir do mesmo.

## METODOLOGIAS ANALÍTICAS

### Extração

A capacidade de extração das fumonisinas a partir de produtos à base de milho pode variar significativamente e ser influenciada por factores como a composição química da matriz, o tipo de solvente de extração e respectivo volume, o pH do solvente de extração e outras condições experimentais<sup>22</sup>.

Com o objectivo de garantir uma extração eficaz das fumonisinas presentes em matrizes alimentares, vários solventes têm sido preconizados. Em virtude de se tratar de moléculas fortemente polares, as fumonisinas são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos<sup>23</sup>.

A sua extração a partir de matrizes alimentares é conseguida usando água, acetonitrilo e metanol. Verificam-se, no entanto, variações no que diz respeito à mistura dos solventes, bem como no

que se refere às proporções relativas usadas. Encontram-se resumidos na Tabela 1 alguns processos de extração aplicados à determinação de fumonisinas. Observa-se, de igual modo, alguma disparidade na quantidade de amostra usada no processo extractivo, variando entre 5 g<sup>24</sup> e 50 g<sup>25</sup>.

A mistura metanol/água é amplamente utilizada. Porém, enquanto alguns utilizam rácios de 4:1<sup>26-28</sup>, outros adoptam rácios de 3:1. É o caso de Gelderblom *et al.*<sup>4</sup> que usaram esta mistura para extrair pela primeira vez FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> de culturas de milho contaminadas com *Fusarium moniliforme* MRC 826. Também Shephard *et al.*<sup>29</sup> ao desenvolverem o primeiro método com HPLC para determinação simultânea de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em milho naturalmente contaminado e em rações, usaram a mesma proporção. Este método foi adoptado pela AOAC International em 1996. Outros autores adoptaram também esta proporção, como por ex. Sydenham *et al.*<sup>30</sup>, Piñeiro *et al.*<sup>31</sup>, Castellá *et al.*<sup>32</sup>, Picco *et al.*<sup>33</sup> e Bankole e Mabekoje<sup>34</sup>.

Proporções metanol/água de 70:30 têm sido empregues<sup>5,35</sup>. Cirillo *et al.*<sup>19</sup> usaram apenas metanol na extração de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> de cereais e de outros alimentos.

A mistura acetonitrilo/água (1:1) é também muito usada. Em 1994, Chu e Li<sup>36</sup> utilizaram este solvente de extração quando associaram a ocorrência de FB<sub>1</sub> e de outras micotoxinas, presentes em milho com bolor, com a alta incidência de EC em algumas regiões da China. Plattner<sup>37</sup>, Voss *et al.*<sup>22</sup> e Bittencourt *et al.*<sup>38</sup> também adoptaram a referida mistura.

A eficácia de extração da mistura acetonitrilo/água é superior quando comparada com metanol/água, principalmente nos alimentos à base de milho<sup>17,39</sup>, devido à absorção, ligação ou às reacções químicas dos ingredientes dos referidos alimentos com as fumonisinas<sup>39</sup>.

Outra possibilidade consiste na utilização da mistura metanol/acetonitrilo/água (25:25:50)<sup>9,25,39,40</sup>.

Tem-se observado que, em alimentos que durante o seu processamento sofrem nixtamalização (por ex., *masa* e *tortillas*), o hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) usado neste tratamento interfere com a extração e purificação das fumonisinas. Para se ultrapassar este obstáculo e se conseguir uma extração completa das fumonisinas é necessário que o pH do solvente seja ajustado para neutralizar o Ca(OH)<sub>2</sub>, que produz extractos com valor de pH superior a 6. Assim, deve-se acidificar os extractos a pH 3 ou 4, adicionando ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ou ácido clorídrico (HCl). Preferencialmente deve-se substituir a água do solvente de extração por dihidrogenofosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1M a pH 3,0 para assegurar uma extração e uma retenção eficientes de todas as fumonisinas<sup>35,37,41,42</sup>.

**Tabela 1.** Processos de extração e purificação aplicados à análise de fumonisinas em alimentos

Amostra	Extração	Purificação	Ref.
Ração	MeOH + H <sub>2</sub> O(4:1)	IAC	26-28
Milho	ACN + H <sub>2</sub> O(1:1)		22, 37
Cereais infantis	MeOH + ACN + H <sub>2</sub> O (1:1:2)		9, 25, 39, 40
Cereais infantis	MeOH + ACN + H <sub>2</sub> O (1:1:2)	C18	9
Tortilla	ACN 50 mL + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M, 50 mL a pH 3,0		41
Tortilla	ACN + H <sub>2</sub> O (1:1)		37, 42
Milho	ACN + H <sub>2</sub> O (1:1) a pH 4,5		22, 36
Tortilla	EDTA 19 a 79,4 mM+ MeOH (1:1)		42
Milho, ração e outros derivados do milho	MeOH + H <sub>2</sub> O (3:1)	SAX	29-32, 34
Milho e derivados	MeOH + H <sub>2</sub> O (70:30)		5, 35
Tortilla	ACN + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1:1) a pH 3,0		42
Derivados do milho	ACN + H <sub>2</sub> O (1:1)		38
Milho e derivados	MeOH + H <sub>2</sub> O (3:1)	Resinas XAD	43
Milho; Cereais e outros alimentos	MeOH + H <sub>2</sub> O (70:30); MeOH	—	5, 19

Outra opção, com o objectivo de melhorar a extracção de fumonisinas a partir de alimentos tratados com cálcio, consiste em recorrer à mistura EDTA (19 a 79,4 mM de acordo com a concentração de cálcio nas amostras)/metanol (1:1)<sup>42</sup>.

### Purificação

A purificação permite remover impurezas da matriz e concentrar as fumonisinas<sup>43</sup>. Esta etapa pode ser conseguida recorrendo à extracção em fase sólida (SPE) em fase reversa, usando sílica octadecilgida ( $C_{18}$ )<sup>9,36,41</sup> ou troca aniónica (SAX)<sup>5,29,32,34,38</sup>. Podem também usar-se colunas de imunoafinidade (IAC)<sup>9,25,27,28</sup> e resinas Amberlite XAD<sup>43</sup>. Na Tabela 2 encontram-se explicitados alguns processos de purificação aplicados à análise de fumonisinas.

A selecção do procedimento de purificação dos extractos das amostras depende do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) que se pretende atingir. As colunas SAX permitem melhores resultados que as  $C_{18}$  para as fumonisinas intactas, no entanto, requerem uma monitorização do pH do extracto da amostra - acima de 5,8 para uma retenção adequada na coluna SAX - e um controlo cuidadoso do fluxo de eluição - que não pode ser superior a 1mL/min para ser possível a obtenção de recuperações reprodutíveis<sup>20</sup>.

Não obstante, com este protocolo de purificação, as fumonisinas hidrolisadas eluem no volume vazio da coluna, uma vez que não possuem cadeias laterais acídicas, sendo, deste modo, previamente eluídas. As fumonisinas parcialmente hidrolisadas, apenas com uma cadeia lateral acídica, têm um tempo de retenção menor, sendo previamente eluídas. Assim, para quantificar as séries de fumonisinas hidrolisadas e parcialmente hidrolisadas, deve-se analisar o extracto sem proceder à sua purificação, usar um processo de purificação com SAX modificado ou usar um protocolo com  $C_{18}$ <sup>37</sup>.

Relativamente à purificação com colunas  $C_{18}$ , têm-se observado variações importantes na percentagem de recuperação obtida. Pensa-se que tal facto se deve à interacção das fumonisinas com os locais activos do adsorvente<sup>20</sup>.

As colunas IAC possuem anticorpos que reagem especificamente com as fumonisinas, permitindo uma purificação mais selectiva<sup>20</sup>. Os problemas analíticos, em termos de baixas recuperações e purificação insuficiente, que advêm da utilização do método oficial da AOAC Internacional, adoptado em 1996, originalmente desenvolvido por Shephard *et al.*<sup>29</sup> e que implicava a aplicação de colunas SAX, podem ser ultrapassados com a utilização de colunas IAC<sup>21,40</sup>. Deve-se, contudo, assegurar que todos os compostos que se pretendem quantificar reagem com os anticorpos e são retidos na coluna<sup>37</sup>. Actualmente são amplamente usadas<sup>9,22,25,28,37,39,40</sup>.

### Derivatização

Como as fumonisinas não possuem nenhum cromóforo e, portanto, não absorvem luz UV, nem visível, nem apresentam fluorescência nativa para se conseguir uma detecção com sensibilidade a baixos níveis, necessários para a análise de alimentos contaminados, a derivatização dos extractos das amostras é imprescindível. A reacção de derivatização dá-se entre o reagente derivatizante e a amina primária das fumonisinas. Na maioria dos casos é feita uma derivatização pré-coluna<sup>20,37,44</sup>.

O primeiro método com HPLC publicado foi desenvolvido por Gelderblom *et al.*<sup>4</sup> para quantificação de fumonisinas presentes em extractos de culturas de *Fusarium moniforme*, tendo sido obtido, após derivatização com anidrido maleico, um derivado maleilo.

Um LOD de 10µg/g não permitiu, todavia, a sua aplicação na análise de milho naturalmente contaminado, sendo necessária a implementação de técnicas mais sensíveis<sup>20,44</sup>.

Assim, Shephard *et al.*<sup>29</sup> utilizaram ortoftaldeído (OPA), na determinação quantitativa de  $FB_1$  e  $FB_2$  em amostras de milho naturalmente contaminado. A tentativa de derivatização com fluorescamina (FLA) não produziu resultados satisfatórios, uma vez que se obtiveram dois picos cromatográficos, devido à formação de dois produtos de reacção. A FLA foi também usada por Ross *et al.*<sup>45</sup>.

O ortoftaldeído é o reagente mais usado na derivatização das fumonisinas, entrando sempre na sua preparação o 2-mercaptoetanol (MCE), usado como agente redutor<sup>9,22,25,34-36,38</sup>. A reacção de derivatização com OPA e MCE é rápida e reprodutível à temperatura ambiente e em tampão borato (pH 9-10), sendo o método aceite pela AOAC Internacional. No entanto, o facto de os produtos da reacção de derivatização serem pouco estáveis conduz a que a intensidade de fluorescência do derivado OPA- $FB_1$  decresça rapidamente após a derivatização, o que constitui uma desvantagem<sup>20,46</sup>. Este problema de estabilidade pode ser solucionado colocando o derivado a 4 °C, possibilitando resultados mais consistentes e reprodutíveis, uma vez que as amostras podem ser reanalisadas durante 24 h, sem perdas significativas na intensidade de fluorescência<sup>46</sup>. Williams *et al.*<sup>46</sup> concluíram que a instabilidade do complexo OPA- $FB_1$ , OPA-H $FB_1$  ou de qualquer outra fumonisina poderá ser devida à ausência do grupo hidroxilo no carbono 1, que eventualmente estabilizará a reacção entre o MCE e a OPA no derivado fluorecente.

O naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) usado com cianeto de potássio forma um derivado fluorecente mais intenso e estável durante 24 h<sup>20</sup>. Este reagente de derivatização foi utilizado por diversos investigadores<sup>3,25,42</sup>.

Em 1994, Chu e Li<sup>36</sup> compararam as percentagens de recuperação ao utilizar OPA e NDA na derivatização de amostras de milho com bolor em regiões da China com alta incidência de EC. Concluíram que com OPA se obtêm percentagens superiores para níveis de toxinas mais elevados e que com NDA se obtêm valores superiores para níveis de toxinas mais baixos.

Outro reagente de derivatização, que também apresenta uma estabilidade limitada, é o 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F)<sup>47</sup>.

Scott e Lawrence<sup>3</sup> utilizaram na derivatização de fumonisinas, presentes na cerveja, OPA/MCE, NBD-F e NDA/KCN, tendo concluído que OPA/MCE é o melhor reagente de derivatização na análise daquela matriz.

Outro reagente usado na derivatização de fumonisinas é o 6-amino-quinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ.Fluor). O sucesso da utilização deste reagente depende da acidez da fase móvel, devendo ser o metanol o solvente de eleição. Neste caso, os derivados são estáveis, pelo menos durante 48 h, permitindo uma boa resposta a nível de fluorescência<sup>48</sup>.

### Detecção e quantificação

#### Métodos cromatográficos

#### Cromatografia líquida (HPLC ou LC)

A cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) é a técnica analítica de separação mais usada. A razão desta popularidade, além de residir na sua elevada sensibilidade, na sua capacidade para efectuar determinações precisas e de separar espécies não voláteis, deve-se sobretudo ao facto de possuir uma grande aplicabilidade a substâncias com interesse primordial para a indústria e na investigação científica<sup>49</sup>.

As fumonisinas são moléculas polares, solúveis em água e em solventes polares. Assim, são ideais para detecção e quantificação por HPLC em fase reversa.

Shephard *et al.*<sup>43</sup> efectuaram uma pesquisa a nível mundial sobre a quantidade de fumonisinas encontradas em milho e em alimentos à base de milho e referiram que mais de 90% dos laboratórios envolvidos neste estudo realizaram uma derivatização pré-coluna e usaram HPLC para quantificar as fumonisinas.

No que diz respeito ao volume de eluído injectado no sistema cromatográfico, observam-se variações de investigador para investigador. A maioria prefere usar volumes de 10  $\mu\text{L}$ <sup>9,30,50-54</sup>. Outros investigadores injectam 20  $\mu\text{L}$ <sup>31,33,38,55</sup>. Outros optam por 25  $\mu\text{L}$ <sup>3,25</sup> e alguns por 50  $\mu\text{L}$ <sup>3,41</sup>. Um volume de injeção mais elevado proporciona um valor de LOD mais baixo.

No que concerne às colunas analíticas, a maioria dos procedimentos para HPLC utiliza as de fase reversa  $C_{18}$  para separar as fumonisinas<sup>9,25,29,38</sup>. Sydenham *et al.*<sup>30</sup> utilizaram uma coluna analítica de fase reversa, de sílica octaligada ( $C_8$ ). Em relação à escolha das dimensões da coluna observa-se igualmente uma grande disparidade. O comprimento da coluna oscila entre 300 mm<sup>55</sup> e 100 mm<sup>25,31</sup>, passando por 125, 150 e 250 mm<sup>9,25,30</sup>.

O diâmetro interno (d. i.) da coluna é, na maioria dos casos, de 4,6 mm<sup>9,25</sup>. Alguns autores adoptam colunas com 3,2, 3,9 e 4 mm de d. i.<sup>25,50,53</sup>

No que respeita ao tamanho da partícula da fase estacionária, observa-se também alguma variabilidade. A escolha recai preferencialmente para colunas com 5  $\mu\text{m}$  de tamanho da partícula<sup>9,35,38</sup>. Contudo, alguns optam por 10  $\mu\text{m}$ <sup>56</sup>, 7  $\mu\text{m}$ <sup>54</sup>, 4  $\mu\text{m}$ <sup>25</sup>, 3  $\mu\text{m}$ <sup>25,41</sup> ou 2,5  $\mu\text{m}$ <sup>53</sup>.

Dois tipos de eluição são usados, isocrática<sup>35,38</sup> e gradiente<sup>25,26</sup>. Uma vez que na maioria dos procedimentos se utiliza cromatografia de fase reversa para separar as fumonisinas, a fase estacionária é apolar e a fase móvel usada é polar<sup>49</sup>. Assim, em ambas as eluições os solventes mais utilizados são metanol, acetonitrilo, água, ácido acético e dihidrogenofosfato de sódio. Verificam-se variações nas misturas utilizadas no que se refere às proporções dos diferentes solventes. O pH das soluções, nalguns casos, é ajustado com ácido ortofosfórico a 3,3 ou 3,35 (Tabela 2).

Os fluxos adoptados variam também de procedimento para procedimento (Tabela 3). Porém o fluxo mais utilizado é de 1 mL/min.

Como as fumonisinas apresentam um comportamento iónico em solução, as separações em colunas de fase reversa são baseadas numa mistura de mecanismos de fase reversa e de troca iónica. Observa-se uma grande variação de selectividade entre as diferentes colunas. As fumonisinas não eluem convenientemente da maior parte das colunas de fase reversa quando são injectadas com sistemas de solventes neutros e não tamponizados. Para se conseguirem melhores resultados a fase móvel deve ser acídica, o que se consegue através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil como o acetato de amónio ou o formato de amónio<sup>37</sup>.

A cromatografia líquida com detecção de fluorescência é amplamente usada na análise de fumonisinas em alimentos para consumo humano e animal<sup>59</sup>. Numerosos investigadores recorrem ao detector de fluorescência<sup>9,34,35,38,57</sup>, enquanto outros usam o espectrofluorímetro<sup>45,46,52,53</sup>. Todavia, a determinação de fumonisinas por HPLC não dispensa a utilização de reagentes de derivatização, uma vez que, como referenciado anteriormente, se trata de moléculas sem fluorescência nativa. No entanto, a derivatização pode introduzir variabilidade nos resultados, implicar perdas de amostra e também aumentar o tempo do procedimento analítico<sup>60</sup>. Por outro lado, como a derivatização das

**Tabela 2.** Solventes utilizados na fase móvel

Solventes	Ref.
<b>Eluição isocrática</b>	
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (68:32) ajustado a pH 3,35 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (80:20) ajustado a pH 3,3 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	54,56
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (80:20) ajustado a pH 3,35 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	51,57
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (77:23) ajustado a pH 3,3	31
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (77:23) ajustado a pH 3,35 e com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	35
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (75:25) ajustado a pH 3,3 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	9
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (76:24) ajustado a pH 3,3	58
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (75:25) ajustado a pH 3,35 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	33,52
MeOH: tampão acetato de sódio ajustado a pH 3,6	34
ACN + H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> COOH (50:50:1)	38,41,50
ACN + H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> COOH (55:45:1)	36
ACN:H <sub>2</sub> O (99:1) + H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (99:1) [65+35]	42
ACN + PBS 0,05M, pH 3,3 [39+61]	55
<b>Eluição em gradiente</b>	
H <sub>2</sub> O/MeOH; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05M ajustado a pH 3,35 (78:22)	26
MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (77:23:1)/ MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (100:1)/H <sub>2</sub> O	25
ACN:H <sub>2</sub> O (8:2)/MeOH: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05M (55:45) ajustado a pH 3,5 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3
ACN/H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> COOH	36
MeOH:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ajustado a pH 5 com NaOH 2M (1:1)/ACN: H <sub>2</sub> O (8:2) para NBD-F	3
ACN:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (55:45:1)/ACN:H <sub>2</sub> O (8:2) para NDA/KCN	3
MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (77:23:1)/ MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (100:1)/H <sub>2</sub> O	25

**Tabela 3.** Fluxos utilizados no sistema de HPLC

Fluxo (mL/min)	Ref.
0,5	25,58
0,7	42
0,9	57
1	9,30,35,38,41
1,5	33,52
1→2	55

fumonisinas ocorre no grupo amina, este método não permite a detecção das amidas da série P<sup>61</sup>.

Os comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) e de emissão ( $\lambda_{em}$ ) usados variam de acordo com o reagente de derivatização empregue, tal como se pode observar na Tabela 4. Dado que o reagente derivatizante mais aplicado é o OPA, os comprimentos de onda mais comuns são 335 para a excitação e 440 nm para a emissão.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) permite a análise directa e a confirmação das fumonisinas<sup>59</sup>. Existem vários métodos para a sua determinação por MS, baseados em diferentes tipos de interfaces: “fast atom bombardment” (FAB), “ion spray” (IS), “thermospray” (TS), “liquid



**Tabela 4.** Reagentes derivatizantes/Comprimentos de onda usados (nm)

Agente de derivatização	$\lambda$ (nm)	Ref.
OPA	exc = 335 em = 440	9,29,34-36,38,57
	exc = 232 em = 425	31
NDA	exc = 420 em = 500	3
	exc = 280 em = 470	25,42
	exc = 246 em = 418	36
	exc = 460 em = 500	3
FLA	exc = 390 em = 475	45

secondary ion” (LSI), “electrospray” (ESI), “atmospheric pressure chemical ionization” (APCI) e “tandem mass-spectrometry” (MS-MS)<sup>20,60</sup>.

Em 1997, Xie *et al.*<sup>59</sup> reportaram a detecção de 2 isómeros estruturais da fumonisina B<sub>1</sub> parcialmente hidrolisada (PHFB<sub>1</sub>) no milho usando uma técnica de HPLC-FAB-MS, obtendo um LOD de 0,1 µg/g. A LC-IS-MS e a LC-ES-MS são métodos aplicados à análise de fumonisinas em culturas de fungos e em amostras naturalmente contaminadas.

Segundo Plattner<sup>37</sup>, a HPLC-ESI-MS é uma técnica ideal para detectar e quantificar fumonisinas. Estas moléculas tendem a ser iónicas e produzem sinais abundantes tanto no modo iónico positivo como no modo iónico negativo. Esta técnica tem, aliás, sido utilizada por diferentes autores na quantificação destas micotoxinas<sup>19,37,61</sup>.

Ao comparar a interface TS com a interface ESI, conclui-se que a última permite quantificar fumonisinas na ordem dos nanogramas, providenciando um sinal forte para a molécula iónica e uma pequena fragmentação. Ao contrário, a TS-MS conduz a múltiplos fragmentos iónicos e não apresenta sensibilidade a níveis inferiores ao micrograma<sup>20</sup>. Contudo, recentemente foi descrito um método para determinação da fumonisinas no milho, por LC-TS-MS, no modo do ião negativo, apresentando um LOD da ordem dos 2 ng. Outros autores aplicaram a interface “particle beam” (PB), para confirmação das fumonisinas. A vantagem que esta técnica apresenta é a capacidade de proporcionar espectros de electrões e de ionização química, os quais permitem obter uma maior informação estrutural relativamente às técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como “electrospray”<sup>60</sup>.

A quantificação e respectiva confirmação por LC-ESI-MS ou LC-ESI-MS/MS em diferentes matrizes têm apresentado LODs que variam entre 0,8 a 100 µg/kg. No caso do milho, o LOD obtido, para a FB<sub>1</sub>, foi de 20 µg/kg, quando a LC-APCI-MS foi aplicada<sup>60</sup>.

#### Cromatografia em camada fina (TLC)

O primeiro método que aplicou a cromatografia em camada fina (TLC) para determinação de fumonisinas foi desenvolvido durante o isolamento destas micotoxinas a partir de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 em milho, com o objectivo de monitorizar os eluídos das colunas. O método envolvia TLC em fase reversa em placas com sílica C<sub>18</sub> modificada, usando como solvente metanol-água (3:1), e também TLC em fase normal em placas de sílica, usando como solvente uma mistura de clorofór-

mio-metanol-água-ácido acético. Finalmente, as fumonisinas eram visualizadas através da pulverização com soluções de ninhidrina ou  $\rho$ -analisaldeído<sup>4</sup>. Esta técnica foi também utilizada por Cawood *et al.*<sup>62</sup>, Sydenham *et al.*<sup>63</sup>, Ross *et al.*<sup>45</sup>, Plattner *et al.*<sup>64</sup> e Tseng e Liu<sup>56</sup>.

Apesar de útil para monitorizar os efluentes das colunas e analisar culturas de fungos, o LOD do método, na ordem de 0,5 mg/g, não permite a sua aplicação, com sucesso, na determinação de fumonisinas em milho naturalmente contaminado<sup>63</sup>.

O LOD do método foi reduzido a 0,1 mg/g com a utilização de um processo de desenvolvimento sequencial em duas fases da placa de sílica, em que a secção inferior da placa era removida entre as duas fases e as fumonisinas eram quantificadas através de um espectrofotodensitómetro, após pulverização com solução de  $\rho$ -analisaldeído<sup>20</sup>.

A utilização de fluorescamina como reagente revelador para visualizar as fumonisinas com luz UV melhorou a sensibilidade, obtendo um LOD de 0,1 µg/g, e a selectividade do método e possibilitou o seu uso na análise de milho naturalmente contaminado<sup>20</sup>.

#### Cromatografia gasosa (GC)

O desenvolvimento inicial de metodologias analíticas aplicadas à análise de fumonisinas recorreu a técnicas de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama GC-FID<sup>63</sup>. Em 1990, Sydenham *et al.*<sup>63</sup> mostraram a evidência da ocorrência natural de fumonisinas B<sub>1</sub> no milho usando diferentes técnicas, entre as quais, GC capilar. A técnica envolveu a hidrólise ácida das fumonisinas, de modo a quebrar as ligações éster e subsequentemente detectar os grupos de ácidos tricarbóxicos (TCA) resultantes, após a sua esterificação com isobutanol. A confirmação dos TCA nas amostras hidrolisadas foi conseguida por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS). Os procedimentos que utilizam GC têm a vantagem de se poderem combinar com MS para confirmação de resultados.

Plattner *et al.*<sup>65</sup> referiram um método mais direto para determinação de fumonisinas em que o esqueleto aminopoliol das fumonisinas, produzido por hidrólise alcalina, foi isolado através de uma resina de troca iónica e depois convertido em um derivado trimetilsililado para análise por GC. Este método, usando MS com ionização química (CI) ou ionização eléctrica (EI), foi aplicado para determinar quantitativamente a presença de FB<sub>1</sub> em amostras de milho altamente contaminado e associado a casos de ELEM.

Em 1991, Ross *et al.*<sup>45</sup> também analisaram algumas amostras, por GC-MS, para determinar a concentração de FB<sub>1</sub> em rações associadas a doenças em animais.

A metodologia GC-MS é mais demorada e requer instrumentação dispendiosa, e por esta razão não é apropriada nem prática para se efectuar a análise de um grande número de amostras<sup>30</sup>. Por outro lado, o procedimento de GC-MS de Plattner *et al.*<sup>65</sup> não apresenta a sensibilidade necessária. Este método pode, contudo, ser aplicado para quantificar níveis elevados de fumonisinas que ocorrem, por ex., em amostras de rações associadas a ELEM<sup>44</sup>.

#### Outros métodos

##### Imunológicos

As fumonisinas, como anteriormente foi referido, são detectáveis por TLC, HPLC-FD, GC-FID, GC-MS e LC-MS. No entanto, ocorrem, por vezes, problemas quando, dada a sua complexidade, se analisam matrizes alimentares e tecidos. As interferências encontradas podem ultrapassar-se recorrendo a métodos de purificação. Contudo, o resultado final implica um procedimento

mais moroso e dispendioso que pode, ocasionalmente, limitar o número de amostras a analisar diariamente. Para obviar este problema, a indústria alimentar usa ensaios imunológicos em virtude da sua relativa simplicidade, boa reprodutibilidade, e elevada sensibilidade, devido à especificidade das reacções antigénio-anticorpo, associada a custos menos onerosos e ao uso de equipamentos não sofisticados, como o método ELISA, para fazer o “screening” de micotoxinas. Este procedimento apresenta, contudo, a desvantagem de não distinguir e quantificar resíduos múltiplos, sendo necessárias muitas análises individuais para determinar diferentes micotoxinas<sup>66</sup>.

Ensaio imunológico mostram-se ferramentas úteis, complementares dos métodos físico-químicos, para analisar micotoxinas em alimentos. Anticorpos mono e policlonais têm sido produzidos para reagir contra as fumonisinas<sup>67</sup>.

Azcona-Oliveira *et al.*<sup>68</sup> reportaram a produção de anticorpos monoclonais para as fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub>, procedendo depois a um “screening” com ELISA para quantificar as referidas moléculas em rações, tecidos e amostras biológicas. O LOD para a FB<sub>1</sub> foi de 50 ng/mL.

#### Electroforéticos

Apesar da sua aplicação não ser muito difundida, pode-se recorrer à electroforese capilar de zona (CZE) para determinação de fumonisinas. A natureza aniónica das fumonisinas poderá implicar a migração electroforética através do ânodo. No entanto, com capilares de sílica fundida, o fluxo electro-osmótico do tampão através do cátodo é suficiente para transportar as fumonisinas na reacção<sup>69</sup>. A primeira aplicação da CZE na análise de fumonisinas foi feita por Maragos<sup>69</sup>, em 1995. Pelo facto de possuírem dois grupos de ácidos tricarbóxicos que podem adquirir carga negativa<sup>70</sup>, as fumonisinas têm potencial para a separação através desta técnica e detecção por fluorescência induzida por laser (CZE-LIF). Maragos<sup>69</sup> defendeu que a sensibilidade do método é mais elevada que a conseguida com HPLC. Os LODs encontrados para a FB<sub>1</sub> foram de 0,025 pg para a CZE e 0,8 ng por HPLC. Advogou ainda que a CZE permite a utilização de um volume mais pequeno de amostra e produz volumes de solventes perigosos consideravelmente inferiores<sup>69</sup>.

Um dos grandes inconvenientes desta técnica reside no facto de que qualquer ligeira alteração na composição do tampão tem efeitos dramáticos na separação e migração das fumonisinas<sup>69</sup>.

#### **Confirmação**

A confirmação das amostras positivas é essencial para assegurar a qualidade da análise<sup>71</sup>.

Em 1991, Thiel *et al.*<sup>54</sup> confirmaram a produção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> por culturas de diferentes espécies de *Fusarium* em milho, utilizando HPLC-FD com derivatização por OPA e GC-MS com derivatização por trifluoroacetilimidazole.

Ross *et al.*<sup>45</sup> e Shephard *et al.*<sup>43</sup> confirmaram a presença de fumonisinas em rações associadas a problemas animais e em milho, usando TLC e GC-MS. A GC-MS foi também a técnica escolhida por Plattner *et al.*<sup>64</sup> para confirmar a presença de fumonisinas em culturas de *Fusarium moniliforme*.

Pittet *et al.*<sup>72</sup> procederam à confirmação de FB<sub>1</sub> em produtos à base de milho do mercado suíço aplicando uma técnica de “high performance thin layer chromatography” (HPTLC).

A LC-MS com ionização “electrospray” é a técnica hoje em dia mais usada na confirmação de amostras positivas<sup>22,32</sup>, embora muitas outras interfaces possam ser utilizadas, com a sensibilidade adequada, permitindo simultaneamente a determinação e confir-

mação de fumonisinas em distintas matrizes alimentares, como anteriormente referenciado.

#### **CONCLUSÕES**

Métodos sensíveis e confiáveis para determinação de fumonisinas em diferentes matrizes, com finalidade de avaliar o grau de exposição humana e animal, são de absoluta necessidade.

O desenvolvimento de métodos analíticos, especialmente no que concerne à purificação e à derivatização, e o progresso a nível de equipamentos, nomeadamente os cromatográficos, permitiram a redução dos limites de detecção.

De entre os vários métodos abordados neste artigo, a HPLC com derivatização pré-coluna e detecção fluorimétrica é mais amplamente utilizada na determinação e quantificação de fumonisinas.

Espera-se que, com o desenvolvimento científico, a LC-MS se torne numa técnica menos onerosa e, em consequência, mais disponível para efectuar estes estudos, já que permite a análise directa de extractos, sem recurso à derivatização, e a respectiva confirmação.

#### **AGRADECIMENTOS**

À FCT e POCTI (FEDER) pela bolsa de doutoramento concedida a L. J. G. Silva.

#### **REFERÊNCIAS**

- Charmley, L. L.; Rosenberg, A.; Trenholm, H. L. Em *Mycotoxins in Grains*; Miller, J. D.; Trenholm, H. L., eds.; MN: Eagan Press, St. Paul, 1994, p. 471.
- Woloshuk, C. P.; Shim, W.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1607.
- Scott, P. M.; Lawrence, G. A.; *J. Food Protection* **1995**, *58*, 1379.
- Gelderblom, W. C. A.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Horak, R. M.; Vleggaar, R.; Kriek, P. J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1806.
- Shephard, G. S.; Marasas, W. F. O.; Leggott, N. L.; Yasdanpanah, H.; Rahimian, H.; Safavi, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1860.
- Nelson, P. E.; Plattner, R. D.; Desjardin, A. E.; *Annu. Rev. Phytopathol.* **1993**, *31*, 233.
- Fumonisin Page: <http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1997term/Park>, acessada em Setembro 2003.
- Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Shephard, G. S.; Koch, K. R.; Hutton, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2400.
- Kim, E. -K.; Scott, P. M.; Lau, B. P. -Y.; *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 161.
- Seo, J. -A.; Lee, Y. -W.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1331.
- Labuda, R.; Tancinova, D.; Hudec, K.; *Ann. Agric. Environ. Med.* **2003**, *10*, 61.
- Poling, S. M.; Plattner, R. D.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2344.
- Turner, P. C.; Nikiema, P.; Wild, C. P.; *Mutat. Res.* **1999**, *443*, 81.
- Momany, F. A.; Dombink-Kurtzman, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1056.
- Desai, K.; Sullards, M. C.; Allegood, J.; Wang, E.; Schmelz, E. M.; Hartl, M.; Humpf, H. -U.; Liotta, D. C.; Peng, Q.; Merrill, Jr A.H.; *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585*, 188.
- Meyer, K.; Mohr, K.; Bauer, J.; Horn, P.; Kovács, M.; *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 639.
- Girolamo, A.; Solfrizzo, M.; Holst, C.; Visconti, A.; *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 59.
- Creppy, E. E.; Chiarappa, P.; Baudrimont, I.; Borraconi, P.; Moukha, S.; Carratí, M.R.; *Toxicology* **2004**, *201*, 115.
- Cirillo, T.; Ritieni, A.; Galvano, F.; Cocchieri, R. A.; *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 566.
- Shephard, G. S.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *815*, 31.
- Duncan, K.; Kruger, S.; Zabe, N.; Kohn, B.; Prioli, R.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *815*, 41.
- Voss, K. A.; Riley, R. T.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Meredith, F. I.; Howard, P. C.; Plattner, R. D.; Collins, T. F. X.; Hansen, D. K.; Porter, J. K.; *Environ. Health Perspectives* **2001**, *109* (suppl. 2), 259.
- Pozzi, C. R.; Arcaro, J. R. P.; Júnior, I. A.; Fagundes, H.; Corrêa, B.; *Ciência Rural* **2002**, *32*, 901.

24. Kedera, C. J.; Plattner, R. D.; Desjardin, A. E.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 41.
25. Lombaert, G. A.; Pellaers, P.; Roscoe, V.; Mankotia, M.; Neil, R.; Scott, P. M.; *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 494.
26. Scudamore, K. A.; Nawaz, S.; Hetmanski, M. T.; *Food Addit. Contam.* **1997**, *14*, 175.
27. Scudamore, K. A.; Nawaz, S.; Hetmanski, M. T.; *Food Chem.* **2005**, *92*, 391.
28. Cortez-Rocha, M. O.; Ramírez-Astudillo, W. R.; Sánchez-Mariñez, R. I.; Rosas-Burgos, E. C.; Wong-Corral, F. J.; Borboa-Flores, J.; Castellón-Campaña, L. G.; Tequida-Meneses, M.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *70*, 668.
29. Shephard, G. S.; Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1990**, *13*, 2077.
30. Sydenham, E. W.; Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 313.
31. Piñeiro, M. S.; Silva, G. E.; Scott, P. M.; Lawrence, G. A.; Stack, M. E.; *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 825.
32. Castellá, G.; Bragulat, M. R.; Cabañes, F. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4707.
33. Picco, M.; Nesci, A.; Barros, G.; Cavaglieri, L.; Etcheverry, M.; *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 331.
34. Bankole, S. A.; Mabekoje, O. O.; *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 251.
35. Castro, M. F. P. M.; Shephard, G. S.; Sewram, V.; Vicente, E.; Mendonça, T. A.; Jordan, A. C.; *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 693.
36. Chu, F. S.; Li, G. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 847.
37. Plattner, R. D.; *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 365.
38. Bittencourt, A. B. F.; Oliveira, C. A. F.; Dilkin, P.; Corrêa, B.; *Food Control* **2005**, *16*, 117.
39. Solfrizzo, M.; Girolamo, A.; Visconti, A.; *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 227.
40. Visconti, A.; Solfrizzo, M.; Girolamo, A.; *Food Chem. Contam.* **2001**, *84*, 1828.
41. Stack, M. E.; *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 737.
42. Dombink-Kurtzman, M. A.; Dvorak, T. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 622.
43. Shephard, G. S.; Thiel, P. G.; Stockenström, S.; Sydenham, E. W.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 671.
44. Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O.; Sydenham, E. W.; Shephard, G. S.; Gelderblom, W. C. A.; *Mycopathologia* **1992**, *117*, 3.
45. Ross, P. F.; Wilson, T. M.; Owens, D. L.; Nelson, H. A.; Richard, J. L.; *Mycopathologia* **1991**, *114*, 129.
46. Williams, L. D.; Meredith, F. I.; Riley, R. T.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2004**, *806*, 311.
47. Scott, P. M.; Lawrence, G. A.; *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 829.
48. Velázquez, C.; Llovera, M.; Plana, J.; Canela, R.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *870*, 469.
49. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Em *Principles of Instrumental Analysis*; 5<sup>th</sup> ed.; Brace College Publishers; Hartcourt, Philadelphia, 1998, p. 725.
50. Fazekas, B.; Tar, A. K.; Hajdu, E. T.; Kovács, M. Z.; *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 259.
51. Jindal, N.; Mahipal, S. K.; Rottinghans, G. E.; *Mycopathologia* **1999**, *148*, 37.
52. Doko, M. B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Schjøth, J. E.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 429.
53. Visconti, A.; Doko, M. B.; *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 546.
54. Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O.; Sydenham, E. W.; Shephard, G. S.; Gelderblom, W. C. A.; Nieuwenhuis, J. J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 1089.
55. Hopmans, E. C.; Murphy, P. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1655.
56. Tseng, T. -C.; Liu, C. -Y.; *Mycopathologia* **1997**, *137*, 57.
57. Molinić, A.; Faucet, V.; Castegnaro, M.; Pfohl-Leskowicz, A.; *Food Chem.* **2004**.
58. Yoshizawa, T.; Yamashita, A.; Luo, Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 1626.
59. Xie, W.; Mirocha, C. J.; Chen, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1251.
60. Royer, D.; Humpf, H. -U.; Guy, P. A.; *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 678.
61. Musser, S. M.; Plattner, R. D.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1169.
62. Cawood, M. E.; Gelderblom, W. C. A.; Vleggaar, R.; Behrend, Y.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *39*, 1958.
63. Sydenham, E. W.; Gelderblom, W. C. A.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 285.
64. Plattner, R. D.; Weisleder, D.; Shackelford, D. D.; Peterson, R.; Powell, R. G.; *Mycopathologia* **1992**, *117*, 23.
65. Plattner, R. D.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Voss, K. A.; Peterson, R.; Shackelford, D. D.; Weisleder, D.; *Mycologia* **1990**, *82*, 698.
66. Abouzied, M. M.; Pestka, J. J.; *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 495.
67. Schneider, E.; Usleber, E.; Märtlbauer, E.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2548.
68. Azcona-Oliveira, J. I.; Abouzied, M. M.; Plattner, R. D.; Pestka, J. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 531.
69. Maragos, C. M.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 390.
70. Maragos, C. M.; Bennett, G. A.; Richard, J. L.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *392*, 10.
71. Valenta, H.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *815*, 75.
72. Pittet, A.; Parisod, V.; Schellenberg, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1352.