

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**MONILIFORMINA EM MILHO: UM ESTUDO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA E DE INCIDÊNCIA**

Parecer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Luís Antônio Baffile
Leoni e aprovada pela Comissão Julgadora
em 01.06.94*

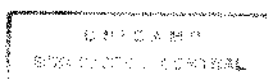
LUÍS ANTÔNIO BAFFILE LEONI *10/554*
Farmacêutico

Lucia Valente Soares

Profª. Dra. LUCIA MARIA VALENTE (SOARES)
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Ciência de
Alimentos.

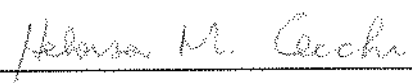
CAMPINAS, SP, 1994



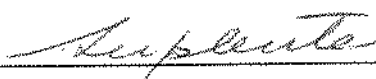
Membros da Banca Examinadora



Dra. Mirna Sabino



Dra. Heloisa Mascia Cecchi



Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo



Dra. Lucia M. Valente Soares

Orientadora

Campinas, 01 junho de 1994.

À
Antonio, Constance e Ângela
pelo imenso amor concedido.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, particularmente à Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade, pela infra-estrutura encontrada e pela contribuição no aprimoramento do conhecimento profissional.

À FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto.

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa recebida.

À Dra. Maria Fernanda P. P. M. de Castro do Instituto de Tecnologia de Alimentos pelo fornecimento de amostras e pela execução das análises quanto ao grau de infecção por *Fusarium sp* em amostras de milho.

Aos professores, funcionários e amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, pela convivência.

Aos amigos Regina, José Eduardo, Luciane e Ana pelo auxílio prestado na editoração final deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões que facilitaram a realização da forma final deste trabalho.

Agradecimento especial à Dra. Lúcia M. Valente Soares não só pela orientação, mas também pela incansada prontidão, dedicação e estímulo, que contribuíram grandemente na realização deste projeto.

ÍNDICE GERAL

PÁGINA

Índice de tabelas.....	IX
Índice de figuras.....	XI
Resumo.....	XII
Summary.....	XIV
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 Características Físicas e Químicas.....	4
2.3 Incidência e Microorganismos Produtores.....	7
2.4 Mecanismo de Ação e Toxicidade.....	10
2.5 Metodologia Analítica.....	13
2.5.1 Extração.....	14
2.5.2 Limpeza, Purificação e Desengorduramento.....	15
2.5.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	16
2.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	17
2.5.4.1 Cromatografia de Troca Iônica em CLAE.....	18
2.5.4.2 Cromatografia por Pares de Íons em CLAE.....	18

3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Reagentes e Equipamento.....	20
3.2 Amostras.....	21
3.3 Recepção e Armazenamento das Amostras.....	24
3.4 Padrão de Moniliformina.....	24
3.4.1 Preparo das Soluções Estoque.....	24
3.4.2 Preparo das Soluções de Trabalho.....	24
3.5 Contaminação Artificial das Amostras de Milho.....	24
3.6 Testes de derivação Química.....	25
3.6.1 Derivação com o Cloreto de Dansila.....	25
3.6.2 Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina.....	25
3.6.3 Derivação com o Trifluoreto de Boro.....	26
3.7 Desenvolvimento da metodologia analítica para extração e limpeza dos extratos de milho.....	26
3.7.1 Verificação do comportamento da moniliformina em adsorventes diversos.....	26
3.7.2 Procedimentos propostos para extração e limpeza dos extratos de milho.....	27
3.8 Otimização das condições de trabalho no cromatógrafo a líquido.....	36
3.8.1 Seleção de fases móveis para desenvolvimento em cromatografia líquida de alta eficiência.....	36
3.8.2 Testes preliminares para ajuste do procedimento P.....	40

3.8.2.1 Adequação da quantidade de amostra e do volume do solvente extrator.....	40
3.8.2.2 Adequação da etapa de limpeza e desengorduramento utilizando partição com hexano.....	40
3.8.2.3 Introdução da etapa de lavagem das paredes do balão.....	41
3.8.2.4 Adequação da etapa de ressuspensão do extrato.....	41
3.9 Metodologia proposta.....	42
3.10 Teste de rusticidade.....	43
3.11 Teste de recuperação.....	44
3.12 Teste de repetibilidade.....	44
3.13 Curva Padrão.....	44
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Testes de derivação química.....	45
4.1.1 Derivação com o cloreto de dansila.....	45
4.1.2 Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina.....	46
4.1.3 Metilação.....	46
4.2 Comportamento da moniliformina em adsorventes diversos.....	51
4.3 Procedimentos para extração e limpeza dos extratos de milho.....	52
4.4 Otimização das condições de trabalho em CLAE.....	52
4.4.1 Seleção de fases móveis para desenvolvimento.....	52
4.4.2 Otimização do procedimento Escolhido.....	62

4.4.2.1 Adequação da quantidade de amostra e do volume do solvente extrator.....	62
4.4.2.2 Limpeza e desengorduramento utilizando partição com hexano.....	63
4.4.2.3 Ressuspensão do extrato em água ultrafiltrada.....	63
4.5 Avaliação da metodologia desenvolvida.....	64
4.5.1 Teste de rusticidade.....	64
4.5.2 Teste de recuperação.....	66
4.5.2.1 Resultados.....	66
4.5.2.2 Tratamento estatístico.....	67
4.5.2.3 Limite de detecção.....	68
4.5.3 Teste de repetibilidade.....	68
4.5.4 Curva padrão.....	68
4.5.5 Análise de custo.....	70
4.6 Incidência de moniliformina em milho.....	70
4.6.1 Incidência de moniliformina em milho recém colhido, produzido no Estado de São Paulo.....	70
4.6.2 Incidência de moniliformina em amostras de fubá, milho de pipoca e milho canjica comercializadas na cidade de Campinas-SP.....	71
5.0 CONCLUSÕES.....	72
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

ÍNDICE DE TABELAS

PÁGINA

1. Estabilidade e solubilidade da moniliformina (1 mg/ml em vários solventes).....	6
2. Procedência das amostras de milho fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.....	21
3. Procedência e grau de infecção por <i>Fusarium</i> sp das amostras de milho comercial recém colhido.....	22
4. Milho e produtos derivados adquiridos em mercados na cidade de Campinas.....	23
5. Adsorventes avaliados para a eluição da moniliformina padrão.....	27
6. Fases móveis testadas com moniliformina em cromatografia líquida de alta eficiência: Verificação do efeito dos solventes puros e combinados.....	37
7. Fases móveis testadas com moniliformina em cromatografia líquida de alta eficiência: Verificação do efeito da água associada a diferentes sulfatos metálicos.....	38
8. Fases móveis testadas com moniliformina em cromatografia líquida de alta eficiência: Verificação do efeito do tampão e tensoativo associados à mistura água/metanol/sulfato de zinco.....	39
9. Condições básicas e alternativas no teste de rusticidade.....	43
10. Comportamento da moniliformina em adsorventes diversos utilizando metanol como fase móvel.....	51
11. Comportamento da moniliformina pura e no extrato de milho utilizando como fase móvel solventes puros e combinados em cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
12. Comportamento da moniliformina pura e no extrato utilizando como fase móvel água associada a diferentes sulfatos metálicos em cromatografia líquida de alta eficiência.....	54
13. Comportamento da moniliformina pura e no extrato sob o efeito de tampão e tensoativos associados à mistura água/metanol/sulfato de zinco.....	55

14. Adequação da quantidade de amostra e do volume de solvente extrator.....	62
15. Recuperações utilizando diferentes combinações de fatores.....	64
16. Individualização da influência das condições avaliadas.....	65
17. Níveis de contaminação utilizados para os testes de recuperação do método proposto.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

página

1. Estrutura básica da moniliformina (1-hidroxíciclobut-1-eno-3,4 diona).....	3
2. Espectro de absorção da moniliformina com máximos de absorção a 229 e 260 nm.....	5
3. Representação esquemática para o mecanismo de ação da moniliformina no metabolismo energético.....	12
4. Perfil cromatográfico da moniliformina padrão (tempo de retenção de 1,13 min).....	47
4. Perfil cromatográfico do derivado metilado da moniliformina (tempo de retenção de 1,78 min).....	48
6. Perfil cromatográfico da Co-cromatografia da moniliformina padrão (tempo de retenção de 1,10 min) e seu derivado metilado (1,80 min).....	49
7. Espectro de absorção da moniliformina pura.....	50
8. Espectro de absorção do derivado metilado da moniliformina.....	50
9. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho fortificado com moniliformina (tempo de retenção de 1,65 min).....	58
10. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho fortificado com moniliformina (tempo de retenção de 1,80min).....	59
11. Perfil cromatográfico da moniliformina pura empregando a fase móvel proposta (tempo de retenção de 10,89 min).....	60
12. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho fortificado com moniliformina empregando a fase móvel proposta.....	61
13. Dispersão e desvios individuais da recuperação da moniliformina.....	67
14. Curva padrão da moniliformina. CV médio = 4,14 (n=3).....	69

RESUMO

A moniliformina é uma toxina hidrossolúvel produzida por cepas de *Fusarium*, que age no metabolismo energético inibindo a produção de energia. Em animais de laboratório, a moniliformina demonstrou causar fraqueza muscular progressiva, aflição respiratória, cianose, coma e morte. A moniliformina tem sido encontrada em alguns países em cereais. Dentre estes, o milho tem sido o mais implicado em casos de contaminação por moniliformina, onde tem aparecido sozinha ou acompanhada de outras toxinas de *Fusarium*. No Brasil, não são conhecidos quaisquer dados sobre a incidência de moniliformina em alimentos. A inexistência de dados nacionais pode estar ligada ao fato dos métodos analíticos conhecidos para esta micotoxina serem complexos e de difícil aplicação em laboratórios nacionais. Adicionalmente, reações químicas para confirmação da identidade da toxina não são descritas na literatura.

No presente trabalho, desenvolveu-se e avaliou-se um método analítico para moniliformina em milho empregando cromatografia líquida de alta eficiência. Na extração foi utilizada uma mistura de metanol/água (95:5). Na etapa de limpeza foram realizadas duas partições com hexano, seguidas de secagem do extrato em evaporador rotatório a 40 °C, lavagem com acetona e re-suspensão do resíduo em água. Na etapa de cromatografia líquida foi utilizada como fase estacionária, uma coluna de fase reversa C₁₈ e como fase móvel água + citrimida (0,035%) + sulfato de zinco (0,05%) / tampão acetato de sódio (pH=3,5) / metanol, 42-10-48. A detecção teve como base a absorvância do composto a 263 nm. O limite de detecção do método foi de 0,33 µg/g e sua recuperação média de 83,9 %. Testes de repetibilidade apresentaram um coeficiente de variação médio de 4,7 %. Reações de derivação para a moniliformina foram testadas com a finalidade de confirmar sua identidade e dentre estas, obteve-se sucesso com a metilação, catalisada por trifluoreto de boro.

O método desenvolvido foi utilizado para analisar dezoito amostras representativas de milho recém colhido e estocado em silos e armazens localizados em diferentes regiões do Estado de São Paulo, cobrindo assim a produção comercial de 1992. Quatro amostras de milho provenientes de campos experimentais localizados em diferentes municípios do Estado foram também analisadas. Adicionalmente, em 1993, sessenta e oito amostras (19 de milho para canjica, 24 de milho para pipoca e 25 de

fubá) comercializados na cidade de Campinas, S.P., foram examinadas. Moniliformina não foi detectada em nenhuma amostra.

SUMMARY

Moniliformin is a water soluble toxin produced by *Fusarium* species. The toxin affects metabolism by inhibiting production of energy. In experimental animals moniliformin causes respiratory distress, progressive muscular weakness, cyanosis, coma and death. Moniliformin has been found in cereals in a few countries. Corn has been the cereal most implicated in cases of contamination by moniliformin. The toxin itself has been detected either alone or together with other *Fusarium* mycotoxins. In Brazil there is no data on the incidence of moniliformin in foods. The reason for that may rest on current analytical methods. They are found to be complex and of difficult application under the prevailing laboratory conditions in Brazil. Chemical reactions to confirm the toxin identity have not been reported so far in the literature.

In the present work, an analytical method has been developed and evaluated to determine moniliformin by high performance liquid chromatography in corn. Extraction utilized methanol/water (95+5). In the cleanup step, two partitions with hexane were conducted followed by evaporation of the extract to dryness in a rotary evaporator at 40 °C. The residue was suspended with acetone, dried and dissolved in water. The HPLC quantitation step employed a column C₁₈ as the stationary phase and water + citrimide (0,035 %) + zinc sulfate (0,05 %) / sodium acetate buffer (pH= 3,5) / methanol, (42+10+48) as the mobile phase. Detection was conducted by measuring of absorbance of the compound at 263 nm. The detection limit and average recovery were 0,33 µg/g and 83,9 %, respectively. Repeatability, in terms of relative standard deviation (RSD), was 4,7 %. Derivatization reactions were tested with the aim to confirm moniliformin identity during analysis. Methylation catalysed by boron trifluoride proved to be adequate.

The developed method was employed for the analysis of eighteen samples of corn stored in warehouses and silos located in different areas of the State of São Paulo and representative of the commercial harvest of 1992. Other four corn samples collected in experimental plots in different locations in the State of São Paulo were also analysed in 1992. Sixty eight samples of corn and a corn product (19 of "canjica" corn, 24 of popcorn and 25 of corn meal) acquired in Campinas markets were examined in 1993. Moniliformin was not detected in any of the samples.

1.0 Introdução

As micotoxinas, por motivo do risco que representam para a saúde humana e animal, têm sido alvo de estudos em diversos países. No Brasil, ainda são escassas as informações sobre a quais toxinas o homem está exposto e em quais alimentos as mesmas podem ocorrer, pois o número de micotoxinas examinadas até agora foi relativamente pequeno. De 1961 a 1991, a maioria das investigações envolvendo micotoxinas no Brasil foi relativa à incidência de aflatoxinas, principalmente no Estado de São Paulo. Em menor proporção, outras toxinas foram investigadas, tais como ocratoxina, zearalenona, deoxinivalenol e citrinina (SABINO & RODRIGUEZ-AMAYA, 1994).

O estudo de toxinas de *Fusarium* vem despertando interesse mundialmente a partir do surto de aleucia tóxica alimentar (ATA), ocorrido em 1972, devido à presença de toxina T-2 em pãoço e outros grãos (UENO, 1983). Espécies de *Fusarium* infestam as culturas no campo e durante o armazenamento, e também produtos alimentícios destinados ao consumo humano. A moniliformina é uma toxina produzida por cepas de várias espécies de *Fusarium* (THRANE, 1989). Trata-se de uma toxina altamente tóxica que age inibindo a produção de energia. A moniliformina causa, fraqueza muscular progressiva, aflição respiratória, cianose, coma e morte (KRIEK et alii, 1977). Esta toxina tem sido encontrada em outros países, em uma ampla variedade de cereais, isoladamente ou em conjunto com outras toxinas de *Fusarium* (FARBER et alii, 1988).

No Brasil, não existem dados sobre a incidência da moniliformina em alimentos, e os métodos até agora desenvolvidos para a determinação desta toxina, são complexos e de difícil aplicação em laboratórios nacionais. Tais métodos utilizam cromatografia líquida de alta eficiência com etapas de limpeza de alto custo e fases móveis que causam rápida degradação das partes do instrumento (bombas e colunas). Torna-se importante um enfoque analítico mais simples e menos agressivo com relação ao instrumento, de baixo custo e portanto de fácil aplicação.

O milho, *Zea mays* L., por sua vez, tem sido o cereal mais envolvido em casos de contaminação por *Fusarium*, principalmente *Fusarium moniliforme* (MARASAS et alii, 1979; 1981; MUÑOZ et alii, 1990).

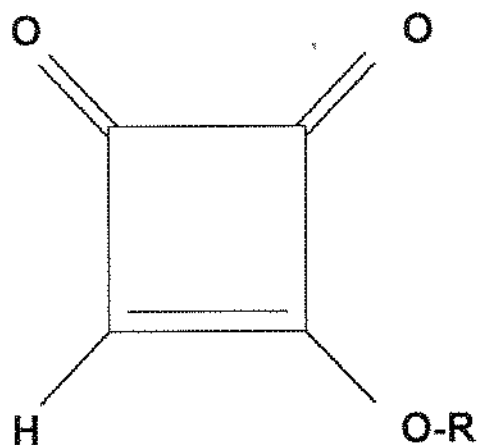
A partir deste quadro, os objetivos estabelecidos para o presente trabalho foram:

1. Desenvolvimento de uma metodologia analítica simples e de fácil aplicação em laboratórios nacionais para a detecção e quantificação da moniliformina .
2. Verificar a incidência desta micotoxina em milho recém-colhido produzido no Estado de São Paulo.
3. Verificar a incidência de moniliformina em amostras de fubá, milho de pipoca e milho canjica, comercializados na cidade de Campinas-SP.

2.0 Revisão Bibliográfica

2.1 Histórico

Em 1973, Cole et alii descobriram um isolado toxigênico de *Fusarium moniliforme* Sheldon durante triagem de rotina para detecção de cepas toxigênicas de *Helminthosporium maydis* em sementes de milho danificado e naturalmente infectado. A cepa isolada demonstrou produzir uma toxina solúvel em água capaz de causar a morte de frangos de um dia e de influir na regulação e crescimento de plantas, além de possuir efeitos fitotóxicos. A obtenção de dados físicos e químicos sobre essa toxina e comparações com as toxinas de *Fusarium* conhecidas na época, F-2 e T-2, sugeriram que o composto encontrado possuía efeitos tóxicos em plantas e animais, o qual foi designado com o nome de moniliformina (Figura 1)(COLE et alii, 1973).



R = H : Ácido livre PM = 98,0081

R = Na : Sal sódico PM = 119,9823

R = K : Sal potássico PM = 136,0945

Figura 1 - Estrutura básica da moniliformina (1- hidroxíciclobut-1-eno-3,4 diona).

2.2 Características Físicas e Químicas

Os primeiros estudos realizados por COLE et alii (1973) sobre as características físicas e químicas da moniliformina envolveram análise elementar, espectroscopia no ultravioleta e no infravermelho, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear.

A análise elementar indicou a fórmula empírica $C_6 H_{3-6} O_{6-8}$, demonstrando a ausência de nitrogênio, fósforo, enxofre ou cloro, e que posteriormente foi confirmada ser $C_4 H_2 O_3$. O espectro obtido por espectroscopia no ultravioleta possui máximos de absorção a 229 e 260 nm em metanol (Figura 2) e sob condições ácidas não se observou deslocamento no espectro de absorção, indicando a ausência de grupos hidroxila fenólicos (COLE & COX, 1981). Os valores de absorvidade molar para a moniliformina de 19100 L/mol/cm ($\lambda(H_2O)_{max}$ 229 nm), 5600 L/mol/cm ($\lambda(H_2O)_{max}$ 260 nm) e 4700 L/mol/cm ($\lambda(MeOH)_{max}$ 260 nm) e pKa de 1,70 foram determinados por STEYN et alii (1978). A toxina apresentou absorção no infravermelho a 3570, 3370, 3300 e 3130 cm^{-1} , sugerindo diferentes grupos hidroxila e também a 1775, 1705, 1675, 1600, 1100 e 840 cm^{-1} . Em especial, a absorção a 1600 cm^{-1} indicou a presença de função carboxilato na molécula, mostrando que a molécula está na forma de sal. Na análise por espectrometria de massa com o uso de ionização de impacto eletrônico ou ionização química, os dados obtidos não foram satisfatórios devido à baixa volatilidade do composto e da sua instabilidade, sugerindo a forma de sal para a molécula. O espectro de ressonância magnética nuclear da toxina em solução de dimetilsulfóxido- d_6 mostrou um singlete agudo (inalterável com D_2O) a δ 8,23 (COLE & COX, 1981).

Nos estudos de SPRINGER et alii (1974), *Gibberella fujikuroi* produziu moniliformina na forma de sal de potássio e *Fusarium moniliforme* na forma de sal de sódio. Trabalhos de análise estrutural por raio X mostraram claramente que a moniliformina cristalina era composta pelo ânion do 1-hidroxiciclobut-1-eno-3,4 diona, pelo cátion potássio e duas moléculas de água de cristalização. O ácido livre, também encontrado como ácido semi-esquárico, havia sido anteriormente sintetizado por HOFFMAN et alii 1971(citado por SCOTT et alii, 1987a) e sua estrutura é incomum para um produto natural devido ao anel de quatro carbonos (Figura 1).

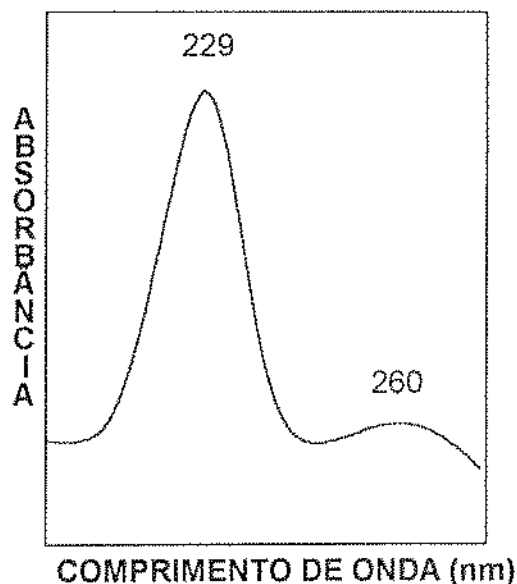


Figura 2 : Espectro de absorção da moniliformina com máximos de absorção a 229 e 260 nm.

Estudos sobre a estabilidade da moniliformina indicaram que o sal de potássio da moniliformina é moderadamente estável em grão de milho e trigo mantidos a temperatura ambiente. Após 6 dias, são detectadas apenas 68 -77% da toxina. Entretanto, aquecimento a 50 °C produz perda similar de moniliformina em 2 horas e a altas temperaturas (100 e 150° C) somente 38% permanecem no milho e 15-22% no trigo após 2 horas. O sal de potássio da toxina é instável quando aquecido a 150° C (SCOTT et alii, 1986;1987b).

Devido à instabilidade do ácido livre em água e metanol, o mesmo não deve ser utilizado como padrão (SCOTT et alii, 1987b). Na Tabela 1 são indicadas a solubilidade e a estabilidade da moniliformina em vários solventes.

Tabela 1 - Estabilidade e solubilidade da moniliformina (1 mg/mL em vários solventes).¹

SOLVENTE	ÁCIDO LIVRE	SAL DE SÓDIO
Metanol	Instável.	Solúvel. Estável 2 Meses a 22°C ou 1 hora a 65°C.
Etanol	Instável.	nd
Água	Instável.	Solúvel e estável
Acetona	Instável.	Não completamente solúvel; necessita da adição de água (30%). Estável.
Acetonitrilo	Estável (2 meses).	Não completamente solúvel.
Cloreto de metileno	Parcialmente solúvel.	nd

1 - SCOTT et alii (1986).

nd- Informação não disponível.

2.3 Incidência e Microorganismos Produtores

A moniliformina foi primeiramente encontrada na forma de sal sódico em isolados de sementes de milho danificado, naturalmente infectadas por cepas de *Fusarium moniliforme* Sheldon (COLE et alii, 1973). Estas cepas, no decorrer dos estudos de SPRINGER et alii (1974), pararam de produzir a toxina e foram substituídas pela *Gibberella fujikuroi* (estágio perfeito de *Fusarium moniliforme*) ATCC#12763, que produzia a toxina na forma de sal de potássio.

A moniliformina foi produzida a partir de uma cultura pura de *Fusarium moniliforme* Sheldon var *subglutinans*, encontrado em milho mofado proveniente de Transkei (África do Sul), com rendimentos de 9,7 , 11,3 e 6,1 gramas de toxina por quilograma de substrato inoculado crescido em milho (KRIEK et alii, 1977),

Foram obtidos de 3 isolados, *Fusarium moniliforme* ATCC 12763, MRC 515, e *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* MRC 115, rendimentos de moniliformina de 2 -16 g/kg de cultura de milho (STEYN et alii, 1978). RABIE et alii (1978), identificaram a moniliformina como um metabólito de *Fusarium fusarioides*, pois as cepas desta espécie obtidas de amendoim e peixe seco (Moçambique), solo (Paquistão) e painço (Sudoeste da África) produziram em culturas de laboratório de 200 a 840 mg de moniliformina por quilograma de substrato.

Entre 23 isolados tóxicos de *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*, 16 produziram moniliformina de 120 a 1170 mg/kg de cultura, enquanto que dos 14 isolados tóxicos de *Fusarium moniliforme* nenhum produziu a toxina (MARASAS et alii, 1979a). A moniliformina também foi produzida por cepas de *Fusarium avenaceum* e de *Fusarium oxysporum* com rendimentos variando de 2 a 760 mg/kg e 1,150 mg/kg, respectivamente (MARASAS et alii, 1979b). A cepa de *Fusarium moniliforme* NRRL 6322 (BURMEISTER et alii, 1980a; 1980b; ALLEN et alii, 1981) em cultura produziu 600 mg de moniliformina por quilograma de substrato (BURMEISTER et alii, 1979). A moniliformina foi produzida por 1 entre 4 isolados de *Fusarium avenaceum*.

Foram realizadas culturas em milho e arroz e os rendimentos de moniliformina obtidos foram de 240 e 1210 mg/kg, respectivamente. Um entre três

isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* produziu a toxina, apresentando níveis de moniliformina em culturas de milho e arroz de 3,65 e 5,45 mg/kg respectivamente (BOTTALICO et alii, 1982;1984). RABIE et alii. (1982), relataram que em culturas sobre milho autoclavado empregando diversas espécies de *Fusarium* (*Fusarium acuminatum*, *Fusarium avenacium*, *Fusarium condolor*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium fusarioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium semitectum*) foram encontrados rendimentos de 0,005 a 33,70 gramas de moniliformina por quilograma de cultura. A toxina também foi encontrada em espigas de milho inoculados no campo a níveis de 0,65 mg/g.

Foi registrada pela primeira vez a ocorrência natural da moniliformina somente em 1982. Em uma amostra de milho mofado, proveniente do Transkei, África do Sul, foi detectada numa concentração de 16 mg/kg. Dessa mesma amostra, foram selecionadas manualmente as sementes visivelmente infectadas por *Fusarium*, e a concentração de moniliformina foi de 25 mg/kg. As espécies de *Fusarium* encontradas foram *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (THIEL et alii, 1982).

A moniliformina foi também produzida em diferentes cereais (milho, arroz, centeio, aveia, cevada e trigo) inoculados com *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium avenaceum* em níveis que variaram de 0 a 0,4 mg/g de cultura (JANSEN & DOSE, 1984). Em estudos realizados por MARASAS et alii (1986), 149 isolados de *Fusarium* (58 de *F. moniliforme*, 8 de *F. proliferatum*, 59 de *F. subglutinans*, 8 de *F. anthophilum*, 1 de *F. succisae* e 15 isolados de uma espécie de *Fusarium* de identidade incerta) foram inoculados em milho autoclavado e as culturas foram analisadas quanto à produção de moniliformina. Noventa desses isolados produziram toxina em níveis que variaram de 5 a 19300 mg/kg :13 isolados de *F. moniliforme* (60 - 2100 mg/kg), 8 de *F. proliferatum* (10 - 293 mg/kg), 48 de *F. subglutinans* (5 - 11300 mg/kg), 6 de *F. anthophilum* (450 - 1100 mg/kg) e 15 isolados da espécie de *Fusarium* de identidade incerta (2300 - 19300 mg/kg).

Contaminação natural foi também descrita em 25 de 58 amostras de milho (24 amostras continham $\leq 0,65 \mu\text{g/g}$) na República Federal Alemã por THALMANN et alii (1985). THIEL et alii (1986) nos Estados Unidos (Pensilvânia), relataram, pela primeira vez, a ocorrência natural da moniliformina em conjunto com a Fusarina C em milho. A amostra de milho estava associada à uma epidemia no campo de

leucoencefalomalácia em cavalos e apresentou uma concentração de toxina de 2,82 mg/kg e o contaminante fúngico predominantemente encontrado foi o *Fusarium moniliforme*.

Os estudos de Lawprecht et alii (1986), introduziram à relação de fontes fúngicas de moniliformina, a espécie *Fusarium reticulatum*, que juntamente com *Fusarium avenaceum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium acuminatum* produziram moniliformina em culturas em níveis de 20 a 4800 mg/kg.

Isolados fúngicos provenientes de uma ração para suínos foram examinados quanto à capacidade de produzir micotoxinas. Oito isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* produziram somente a moniliformina (51-540 µg/g de cultura de milho) e oito isolados de *Fusarium moniliforme* não produziram quantidades detectáveis de nenhuma toxina pesquisada (moniliformina e zearalenona). Nas amostras da ração não foi detectada a moniliformina (VESONDER, 1986).

SCOTT et alii, (1987a) relataram duas novas espécies de *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides* e *Fusarium culmorum*) como produtoras de moniliformina em culturas de arroz em níveis de 2,7 a 182 µg/g de cultura.

Em um levantamento, realizado no Canadá com 24 amostras de trigo, 4 de centeio e 12 de milho, a moniliformina foi somente encontrada em 2 amostras de milho (0,06 e 0,2 µg/g). A moniliformina também foi detectada em uma amostra de milho artificialmente danificado (0,2 µg/g) e em sementes de milho selecionadas que foram inoculadas no campo com *Fusarium subglutinans* e *Fusarium moniliforme* (50 µg/g e 0,5 µg/g , respectivamente)(SCOTT et alii, 1987b).

Vinte e oito isolados canadenses de *Fusarium*, obtidos de cevada, milho e trigo, foram testados quanto à habilidade de produzir a moniliformina. Entre 7 isolados de *Fusarium moniliforme*, 2 produziram a moniliformina em níveis de 4,5 a 31,0 µg/g. Por sua vez, dos 15 isolados de *Fusarium subglutinans*, 11 produziram a toxina (1,4 a 165,2 µg/g) e nenhum dentre 7 isolados de *Fusarium graminearum* produziu a moniliformina. (FARBER et alii, 1988).

Em levantamento realizado por SHARMAN et alii (1991), a moniliformina foi detectada em 36 amostras de milho comercializados no Reino Unido em níveis de 0,05 a

0,25 mg/kg e em níveis de 0,05 a 3,16 mg/kg em 64 amostras de produtos de milho, provenientes de dez países diferentes .

2.4 Mecanismo de ação e toxicidade

A toxicidade da moniliformina em animais foi primeiramente demonstrada em frangos de 1 dia, através de ensaios biológicos por entubamento do papo, obtendo-se valores de dose letal média (DL₅₀) de 4,0 mg/kg de peso corpóreo. Os frangos expostos a 500 µg e 250 µg de moniliformina que sobreviveram duas horas após o ensaio, apresentaram lesões histológicas, ascite com edemas do mesentério, pequenas hemorragias no proventrículo, moela, intestino pequeno, intestino grande e pele. Já os frangos que morreram dentro de 2 horas após a exposição não apresentaram lesões (COLE et alii, 1973).

Estudos com plantas demonstraram que a moniliformina influi na regulação do crescimento e que possui efeitos fitotóxicos. Plantas de tabaco e milho foram testadas e apresentaram necrose e clorose internervural, sendo estas mais severas em milho (COLE et alii, 1973).

Frangos de um dia foram expostos à moniliformina através de entubação do papo, obtendo-se DL₅₀ de 5,4 mg/kg de peso corpóreo, um valor um pouco maior que os 4,0 mg/kg relatado por COLE et alii (1973). Os frangos de um dia sobreviventes não apresentaram sintomas adversos durante o período de observação (BURMEISTER et alii, 1979). Em adição a sua toxicidade a plantas e frangos de um dia, a moniliformina provou ser extremamente tóxica a patinhos com DL₅₀ oral de 3,68 mg/kg, a camundongos, com DL₅₀ oral = 50,0 e 41,57 mg/kg, para machos e fêmeas, respectivamente (KRIEK et alii, 1977), e para ratos com DL₅₀ = 24 mg/Kg, por via intraperitonal (FARB et alii, 1976). Ensaio de toxicidade foram executados em ratos, frangos, embriões de galinha e pele de rato. Os ratos foram dosados intraperitonealmente com soluções aquosas estéreis de moniliformina obtendo-se valor de DL₅₀ de 29,1 e 20,9 mg/kg de peso corpóreo para machos e fêmeas, respectivamente. Os ratos que sobreviveram à toxina não apresentaram sintomas de efeitos adversos. Os embriões de galinha foram inoculados através do saco de ar do ovo e apresentaram DL₅₀ de 2,8 µg/ovo, verificando-se também a ausência da

manifestação de efeitos teratogênicos em grandes quantidades nos embriões sobreviventes ao ensaio (BURMEISTER et alii, 1979).

KRIEK et alii (1977), observaram que os sinais clínicos da toxicidade da moniliformina em ratos e patinhos eram caracterizados por fraqueza muscular progressiva, aflição respiratória, cianose, coma e morte. Estes sintomas ocorreram dentro de uma hora, no caso dos patinhos, e três horas, nos ratos. Todos os animais que não morreram neste período recuperaram-se completamente dentro de 12 horas. Observações histopatológicas nos ratos que receberam moniliformina não revelaram mudanças características nos tecidos, e sim muitas variações degenerativas gerais e necrose no fígado, rins, miocárdio, glândula adrenal e pâncreas.

A ação biológica extremamente rápida da moniliformina, bem como sua alta toxicidade, motivou THIEL (1978), a elaborar estudos para localizar seu sítio e modo bioquímico de ação. O autor concluiu que o efeito tóxico da moniliformina é devido à inibição da incorporação do piruvato no ciclo do ácido tricarboxílico, bloqueando a conversão do piruvato à acetil coenzima A. Esta etapa do metabolismo utiliza oxigênio devido a oxidação do NADH formado na reação. Como a oxidação de todos os substratos precedentes do succinato na sequência normal do ciclo do ácido tricarboxílico foi diminuída 50 % com concentrações menores que 10 μ M de moniliformina, os substratos posteriores do succinato (fumarato e malato), necessitavam concentrações muito altas de moniliformina para atingir 50 % de inibição, obteve-se uma indicação que a moniliformina exerce uma inibição seletiva da oxidação do alfa-cetoglutarato. GATHERCOLE et alii (1986) investigaram o mecanismo da inibição do complexo piruvato desidrogenase de coração bovino pela moniliformina, através de monitoração do efeito da toxina sobre os componentes individuais do complexo piruvato desidrogenase e foi verificado que a moniliformina age somente sobre a enzima piruvato desidrogenase. (Figura 3).

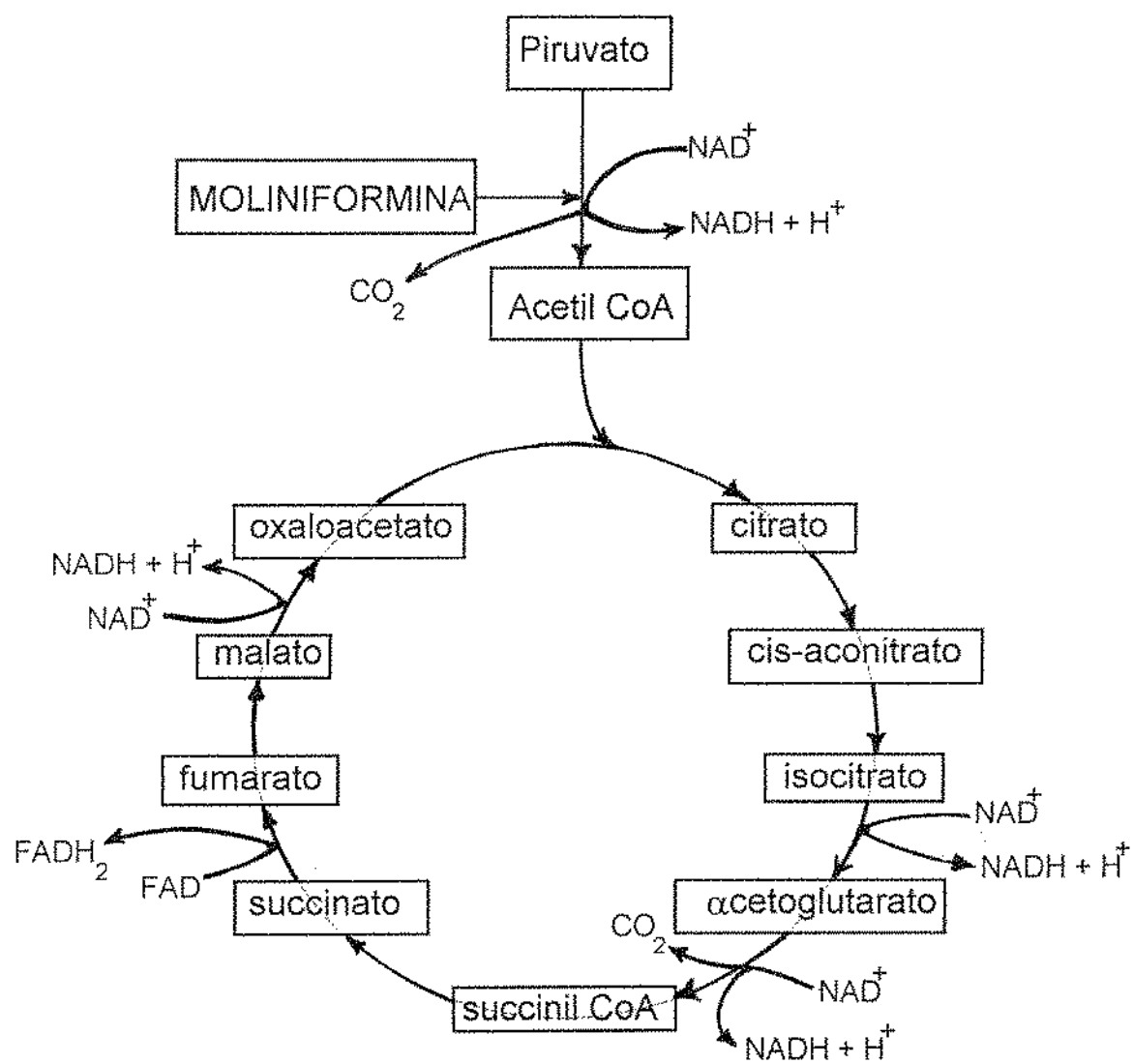


Figura 3 - Representação esquemática para o mecanismo de ação da moniliformina no metabolismo energético.

A moniliformina não exerceu efeito inibitório sobre a síntese proteica de reticulócitos de coelho (UENO & SHIMADA, 1974) e não apresentou efeito tóxico sobre a formação ou função dos lisossomos em fígados e rins de camundongos (FARB et alii, 1976)

WEHNER et alii (1978) testaram a mutagenicidade de oito toxinas de *Fusarium*, inclusive a moniliformina, através do teste de Ames, com resultados negativos para a última.

Em 1980, BURMEISTER et alii executaram um estudo para determinar o efeito de altas concentrações da toxina na aceitação, ganho de peso e sobrevivência em ratos, por um período de 21 dias. Os resultados revelaram que ratos podem sobreviver sem aparente enfermidade, quando expostos a doses diárias de moniliformina próximas ou maiores que a respectiva DL 50.

2.5 Metodologia Analítica

As metodologias desenvolvidas para detecção e quantificação de moniliformina em cereais (especialmente milho) são constituídas por etapas básicas variando somente os solventes, adsorventes, colunas cromatográficas e fases móveis empregados (COLE et alii, 1973; RABIE et alii, 1978; 1982; THIEL et alii, 1982;1986; SHARMAN et alii, 1991).

Os métodos até agora propostos envolvem uma etapa de extração que emprega um único ou uma combinação de solventes extratores utilizando agitação (agitadores ou liquidificadores) ou extração por Soxhlet (COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; BURMEISTER et alii, 1979; FARBER et alii, 1988; THIEL et alii, 1982; 1986; SCOTT et alii, 1987b; FARBER alii, 1988).

Colunas cromatográficas de troca iônica (COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; RABIE et alii, 1978;1982; KAMIMURA et alii, 1981; THIEL et alii, 1982) ou de fase reversa (SHEPHERD & GILBERT, 1986; SCOTT et alii, 1987b; FARBER et alii, 1988; SHARMAN et alii, 1991) têm sido amplamente empregadas na purificação e limpeza dos extratos.

Numa etapa adicional, alguns métodos utilizam o desengorduramento do extrato com partição em solventes apolares, principalmente o hexano (RABIE et alii, 1978; 1982; SCOTT et alii, 1987b; FARBER et alii, 1988; SHARMAN et alii, 1991).

Nos métodos envolvendo cromatografia de camada delgada, o adsorvente de escolha é a sílica-gel 60 e os sistemas de solventes são constituídos de variadas combinações de solventes, tais como: metanol, clorofórmio, tolueno, acetona, ácido acético e ácido fórmico. Os agentes reveladores utilizados são a ninidrina, o 2,4 DNP (2,4 dinitrofenilhidrazina) e o MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona)(COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; RABIE et alii, 1978; BURMEISTER et alii, 1979; KAMIMURA et alii, 1981; ABBAS et alii, 1984; JANSEN & DOSE, 1984; VESONDER, 1986; FARBER et alii, 1988).

O emprego da cromatografia líquida de alta eficiência envolve cromatografia de troca iônica (THIEL et alii, 1982; 1986; RABIE et alii, 1982) ou cromatografia por pares de íons (THIEL et alii, 1982; 1986; SHEPHERD et alii, 1986; SCOTT et alii, 1987b; FARBER et alii, 1988; SHARMAN et alii, 1991), empregando fases móveis contendo sais.

2.5.1 Extração.

Os solventes mais utilizados nas etapas de extração propostas pelas metodologias existentes tem sido o metanol, o acetonitrilo e a água (COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; BURMEISTER et alii, 1979; FARBER et alii, 1988; THIEL et alii, 1982; 1986).

A extração com metanol puro (COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; BURMEISTER et alii, 1979) ou combinações de metanol e água em proporções variadas (95:5, 80:20, 50:50) têm sido empregadas por diversos autores (KAMIMURA et alii, 1981; RABIE et alii, 1978;1982; ABBAS et alii,1984). A execução de uma etapa anterior à extração com metanol empregando clorofórmio, foi utilizada por RABIE et alii (1978;1982) e VESONDER (1986). JANSEN & DOSE (1984), usaram, na etapa inicial, duas extrações com diclorometano seguida de uma extração com metanol.

THIEL et alii (1982; 1986) empregaram a água como solvente e SHEPHERD & GILBERT (1986) utilizaram água e TBAH (hidróxido de tetrabutilamônio). O TBAH é uma substância que age como par iônico e é aplicável na análise de compostos de caráter iônico. Algumas micotoxinas possuem tal caráter, como, por exemplo, ácido tenuazônico, ácido ciclopiazônico e ocratoxinas. O acetonitrilo tem sido empregado como solvente extrator na forma de solvente puro (FARBER et alii, 1988) ou de forma combinada com água (95:5) (SCOTT et alii, 1987b; BOSCH et alii, 1989; SHARMAN et alii, 1991).

2.5.2 Limpeza.

Colunas cromatográficas de troca iônica têm sido empregadas, em algumas metodologias, na etapa de purificação do extrato (COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; RABIE et alii, 1978; 1982; KAMIMURA et alii, 1981; THIEL et alii, 1982), devido ao fato da moniliformina ser uma toxina hidrossolúvel encontrada na forma iônica (SPRINGER et alii, 1974).

STEYN et alii (1978) evaporaram completamente o extrato em evaporador rotatório e o resíduo foi extraído duas vezes com água e centrifugado após cada extração. O extrato aquoso foi aplicado numa coluna de troca iônica (aniônica) Bio-Rad AG1-X2 (convertida na forma hidroxílica) e eluído com água, seguido de um gradiente de concentração de cloreto de sódio 0 a 2 M. Fase móvel semelhante foi empregada sobre uma coluna Dowex 1X8 (na forma de Cl⁻) na eluição do extrato (RABIE et alii, 1978). Purificação envolvendo eluição do extrato em coluna Amberlite XAD-4 com água, adição de etanol ao eluato, evaporação da solução, ressuspensão do resíduo em metanol-acetona (1:3) seguido de filtração, nova evaporação e dissolução do resíduo em metanol foi o procedimento utilizado por KAMIMURA et alii (1981).

BURMEISTER et alii (1979), re-suspenderam o extrato seco em metanol à quente e precipitaram as impurezas com acetona. THIEL et alii (1982), após extração centrifugaram o extrato e filtraram o sobrenadante em filtros de 0,45 µm de diâmetro de poro, obtendo um extrato aquoso para aplicação direta no cromatógrafo a líquido. Uma etapa alternativa foi realizada empregando a pré-purificação desse extrato com uma coluna cromatográfica DEAE-Sephadex A-50, utilizando como fase móvel acetato de amônia 0,1M. O eluato foi liofilizado e dissolvido em água para aplicação no cromatógrafo. O extrato pré-purificado teve baixa recuperação quando analisado por CLAE.

SHEPHERD & GILBERT (1986) trataram o extrato aquoso com celite, filtraram e submeteram à cromatografia em coluna de Amberlite IRC 50. Após descarte dos 50 primeiros mL do eluato, eluíram os 50 mL seguintes, juntamente com TBAH (tetrahidroxibutilamonio) através de uma coluna de fase reversa C₁₈. O eluato foi evaporado, ressuspenso em diclorometano, transferido e evaporado novamente para ser dissolvido em acetonitrilo e solução de cloreto de sódio e então aplicado no cromatógrafo à líquido.

COLE et alii (1973) empregaram uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20 e, através de eluições sucessivas com metanol, purificaram o extrato para posterior utilização em ensaios biológicos ou aplicação em camada delgada.

O emprego de coluna cromatográfica com fase estacionária de octadecilsilil (Baker SPE C₁₈) utilizando água como fase móvel foi introduzida por SCOTT et alii (1987b). O eluato do tratamento anterior, após evaporação foi passado por uma coluna de alumina. Procedimento semelhante foi empregado por FARBER et alii (1988). SHARMAN et alii (1991) utilizaram uma coluna de fase reversa conectada com uma coluna de troca iônica (C₁₈ e SAX) empregando como fase móvel metanol, água e ácido fosfórico na eluição da amostra.

Outros autores têm favorecido o desengorduramento com partição entre o extrato metanólico e hexano especialmente para amostras de milho (RABIE et alii, 1978; 1982; SCOTT et alii, 1987; FARBER et alii, 1988). SHARMAN et alii (1991) empregaram hexano para cereais, inclusive milho. JANSEN & DOSE (1984) usaram ciclohexano para o desengorduramento de milho, arroz, centeio, cevada, aveia e trigo.

2.5.3 Cromatografia de camada delgada (CCD).

As metodologias analíticas propostas para CCD utilizam como adsorvente a sílica-gel 60 e as fases móveis empregam combinações de : clorofórmio-ácido acético-metanol 3:3,5:0,5 (COLE et alii, 1973); acetona-água 92:8, metanol-clorofórmio 4:6 (STEYN et alii, 1978); 1-butanol-ácido acético-metanol 4:1:5 (RABIE et alii, 1978); tolueno-acetona-metanol 5:3:2 (BURMEISTER et alii, 1979); clorofórmio-metanol 93:7 (KAMIMURA et alii, 1981) e clorofórmio-metanol-ácido fórmico 70:30:0,16 (FARBER et alii, 1988).

A visualização das manchas correspondentes à moniliformina em CCD em fase normal foi possível devido à aplicação de agentes reveladores seguidos de aquecimento (COLE et alii, 1973; STEYN et alii, 1978; RABIE et alii, 1978; KAMIMURA et alii, 1981; ABBAS et alii, 1984; JANSEN & DOSE, 1984; VESONDER, 1986; FARBER et alii, 1988). A aplicação de ninidrina foi realizada por COLE et alii (1973) e STEYN et alii (1978), ambos utilizando 0,1% de uma solução metanólica seguida de aquecimento a 100° C por 15 a 20 minutos.

O revelador 2,4 DNP (2, 4 dinitrofenilhidrazina) foi empregado em concentrações variadas: 1% em ácido sulfúrico 6N (STEYN et alii, 1978); 0,32% em ácido clorídrico 2N (KAMIMURA et alii, 1981; ABBAS et alii, 1984). A utilização do MBTH (clorohidreto de N-metil-2-benzotiazolon-2-hidrazona) em metanol como agente revelador foi introduzida por JANSEN & DOSE (1984) que utilizaram solução a 1% em metanol. FARBER et alii (1988) aplicaram 0,5% MBTH em metanol para visualização da mancha referente a moniliformina em placas de sílica-gel 60.

Algumas metodologias empregam placas de sílica-gel com indicador de fluorescência (BURMEISTER et alii, 1979; KAMIMURA et alii, 1981) e a visualização das manchas é possível através de luz ultravioleta a 254 nm, sem necessidade de agentes reveladores.

KAMIMURA et alii (1981), após limpeza e purificação prévia da amostra, realizaram uma reação de derivação envolvendo dissolução do extrato evaporado em 2 mL de solução de 2,4 DNP, manutenção em banho a 50 °C por aproximadamente duas horas, até reação completa, seguida de adição de água e partição com clorofórmio. À fase clorofórmica juntou-se sulfato de sódio anidro, seguido de filtração, evaporação e re-suspensão em acetona para aplicação na placa cromatográfica, a qual foi quantificada por densitometria a 480 nm.

2.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A partir de 1982, CLAE passou a ser utilizada para detecção e quantificação de moniliformina (THIEL et alii, 1982; 1986; RABIE et alii, 1982; SHEPHERD & GILBERT, 1986; SCOTT et alii, 1987b; FARBER et alii, 1988; SHARMAN et alii, 1991). São empregadas colunas cromatográficas de fase reversa envolvendo mecanismos de troca

iônica (THIEL et alii, 1982; 1986; RABIE et alii, 1982) e por pares de íons (THIEL et alii, 1982; 1986; SHEPHERD & GILBERT, 1986; SCOTT et alii, 1987b; FARBER et alii, 1988; SHARMAN et alii, 1991).

2.5.4.1 Cromatografia de troca iônica em CLAE.

A utilização de uma coluna trocadora aniônica (Partisil 10 SAX) e fase móvel de 0,01 M de fosfato monobásico de sódio (pH=5,0) com fluxo de 1,0 mL/min permitiu a separação da moniliformina dos interferentes da amostra e sua confirmação foi realizada através de fortificação (THIEL et alii, 1982; 1986). RABIE et alii (1982) utilizaram o mesmo tipo de coluna com fase móvel de 0,01 M de fosfato monobásico de sódio (pH=5,0) com vazão de 1,0 mL/min e obtiveram um tempo de retenção de 9,7 min para a moniliformina. O limite de detecção da moniliformina pura foi de 1 ng e, na amostra, devido aos interferentes, foi de 1 mg/kg.

2.5.4.2 Cromatografia por pares de íons em CLAE.

A técnica de cromatografia de íons emparelhados utilizada por THIEL et alii (1982; 1986) sobre coluna de fase reversa (Nucleosil 10 C₁₈ ou μ Bondapack C₁₈) utilizou como fase móvel 0,1 M de tampão fosfato de sódio (pH=7,0; 0,005 M de sulfato monoácido de tetrabutilamônio; 8% metanol) ou o reagente PIC-A (Cromatografia por pares de íons - Waters Associates) em 8 ou 20% de metanol, sob vazão de 1,0 mL/min. Essa técnica mostrou um pico da moniliformina com uma melhor resolução que o obtido utilizando cromatografia de troca iônica.

RABIE et alii (1982) obtiveram um limite de detecção da moniliformina de 1 mg/kg, com tempo de retenção de 9,4 min utilizando uma coluna Bondapack C₁₈ e fase móvel semelhante a empregada por THIEL et alii (1982).

A moniliformina foi eluída em 7,7 min em uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS com detector ultravioleta a $\lambda = 260$ e 228 nm e fase móvel de acetonitrilo - 10 mM TBAHP (fosfato dihidrogênio de tetrabutilamônio) 25:75 à vazão de 1,0 mL/min (SHEPHERD & GILBERT, 1986). A toxina também foi detectada com tempo de retenção de 6,2 - 6,7 minutos numa coluna Ultra Techsphere utilizando 10% de acetonitrilo em 4 mM de

hidróxido de tetrabutílamônio e fosfato dihidrogênio de potássio 11 mM com detecção a 226 nm em metodologia proposta por FARBER et alii (1988).

SCOTT et alii (1987b) diluíram 10 mL de uma solução de pares iônicos (composta de 48 mL de uma solução aquosa a 40% de hidróxido de tetrabutílamônio misturada a 100 mL de fosfato dihidrogênio de potássio com pH=7,3) para um litro com uma solução aquosa de metanol 10-15%. Os mesmos autores utilizaram a solução final como fase móvel sobre uma coluna C₁₈ de fase reversa Ultra techsphere ODS na vazão de 0,8 ou 1,0 mL/min, obtendo tempo de retenção próximo de 10 minutos. Uma outra fase móvel foi elaborada utilizando soluções de acetonitrilo/água (10-15%). Neste caso, a sensibilidade do método e a separação dos interferentes foram melhores que com a fase móvel contendo metanol. Os limites de detecção foram de 0,01 µg/g para milho e 0,02 µg/g para trigo com detector a 229 nm e de 0,11 µg/g para milho e 0,12 µg/g para trigo com detector a 254 nm e acetonitrilo na fase móvel. Utilizando metanol na fase móvel, os limites foram para milho de 0,02 µg/g a 229 nm e 0,18 µg/g a 254 nm.

O emprego de uma fase móvel contendo 10 mL de uma solução composta por 50 mL de 40% de hidróxido de tetrabutílamônio em água misturada a 100 mL de fosfato dihidrogênio de potássio 1,1 M, diluído em um litro de acetonitrilo-água 15:85, em conjunto com detector a 229 nm e coluna Phenomenex ODS 30, deu origem a eluição da moniliformina com tempo de retenção de 14 -15 minutos (SHARMAN et alii, 1991).

3.0 Material e Métodos

3.1 Reagentes e Equipamento

- Moniliformina, sal sódico, obtida da CSIR, África do Sul
- Alumina Neutra, 70-230 mesh, marca Merck
- Banho-maria, marca Fanem, modelo 100
- Carvão ativo 14-60 mesh, marca Sigma
- Centrífuga Marca Fanem - Modelo Excelsa II
- Coluna Cromatográfica Fase Normal de Sílica, 5 μ m, 150 x 4,6 mm, Marca Altech
- Coluna Cromatográfica Fase Reversa C₁₈, 5 μ m, 150 x 4,6 mm, Spherisorb ODS-1, marca Altech
- Colunas de vidro de 10 cm de altura e diâmetro interno de 1,0 cm
- Cromatógrafo a Líquido modelo 9010 com detector ultravioleta por conjunto de diodos modelo Polichrom 9065 acoplado a integrador modelo 4400, marca Varian
- Espectrofotômetro ultravioleta/visível, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 6
- Estufa de laboratório marca Olidef cz
- Evaporador Rotatório com termostato, modelo TE 120 marca Tecnal
- Filtros para Fase Móvel Orgânica marca Millipore
- Filtros para Amostra Aquosa HATF 01300 marca Millipore
- Florisil 100-200 mesh, marca Merck
- Frascos de vidro cor âmbar, diâmetro interno 2,0 cm, 5,0 cm de altura com tampa plástica e batoque
- Liquidificador com copo plástico, marca Arno
- Mufla marca Forlab
- Micropipetador digital, com volume regulável 100-1000 μ L, marca Nichiryo, modelo Justor 1100 DG
- Microseringa de 100 μ L, marca Hamilton
- Reagentes grau para análise e equipamento de uso comum em laboratório
- Reagentes grau Lichrosolv
- Seringa para filtração de amostras marca Multfit
- Solução de trifluoreto de boro a 20% em metanol, marca Merck
- Ultra-som, SX20 marca Microsonic
- Ultra purificador de água para uso em CLAE, marca Milli Q

3.2 Amostras

Foram utilizadas para o desenvolvimento do método analítico amostras de milho aparentemente sadio, adquiridas em estabelecimentos comerciais. Para avaliação da incidência de moniliformina foram empregados três tipos de amostras de milho:

- 4 amostras de milho recém-colhido em campos experimentais fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (I.A.C.) provenientes de três diferentes municípios do Estado de São Paulo (Tabela 2).
- 18 amostras de milho comercial recém-colhido, estocados em silos e armazens em 18 localidades diferentes do Estado de São Paulo e coletados por técnicos da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)(Tabela 3).
- 68 amostras de milho e derivados de milho, sendo 25 amostras de fubá, 24 de milho de pipoca e 19 de milho canjica, adquiridas em mercados na cidade de Campinas-SP (Tabela 4).

TABELA 2 - Procedência das amostras de milho fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

QUANTIDADE DE AMOSTRAS	VARIEDADE	ORIGEM
1	Cateto	Jundiaí
1	Moroti	Monte Alegre do Sul
1	Taioba	Campinas
1	Cateto	Campinas

TABELA 3 - Procedência e grau de infecção por *Fusarium sp* das amostras de milho comercial recém-colhido.

CIDADE	INFECÇÃO POR <i>FUSARIUM SP</i> (%)	
	DRBC ^a	DG 18 ^a
Valentim Gentil	14	-
Bariri	-	33
Reginópolis	-	56
São Manuel	36	-
Votuporanga	34	-
Cafelândia	64	-
Olímpia	64	-
Cunha	78	-
Analândia	-	76
Casa Branca	-	38
Lutécia	36	-
Salto de Pirapora	-	66
São Sebastião da Gramma	-	50
Santópolis do Aguapeí	56	56
Jales	64	-
Lorena I ^b	-	48
Lorena II ^c	-	46
Taubaté	-	56

a - Meio de cultura utilizado para detecção de *Fusarium sp*: - DRBC (Dichloran-Rose Bengal Medium) - DG 18 (Dichloran-Glycerol Medium)

b - Amostra a granel

c - Amostra na espiga

Tabela 4 - Milho e produtos derivados adquiridos em mercados na cidade de Campinas.

MARCA	NÚMERO DE AMOSTRAS		
	FUBÁ	MILHO DE PIPOCA	MILHO CANJICA
A	3	3	3
B	3	3	2
C	3	3	3
D	1	0	0
E	1	2	0
F	3	3	1
G	3	3	3
H	0	0	1
I	2	0	0
J	0	1	0
K	3	3	3
Granel	3	3	3
TOTAL	25	24	19

3.3 Recepção e armazenamento das amostras.

As amostras de milho fornecidas pelo I.A.C. e as amostras de milho comercial foram armazenadas em sacos plásticos e estocadas a -10°C . As amostras de milho e derivados de milho foram analisadas a medida que eram adquiridas ou recebidas.

Todas as amostras, com exceção das amostras de fubá, foram trituradas ou moídas até a granulação de farinha.

3.4 Padrão de Moniliformina

3.4.1 Preparo das soluções estoque.

A Moniliformina na forma de sal de sódio foi dissolvida em metanol grau Lichrosolv. A concentração foi determinada espectrofotometricamente conforme recomendações da A.O.A.C. (1990) para micotoxinas, utilizando a absorbância nos comprimentos de onda de absorção máxima e calculada a partir da absorvidade molar do composto, $E = 4700$ em metanol no comprimento de onda de 260 nm (STEYN et alii, 1978).

3.4.2 Preparo das soluções de trabalho

A partir das soluções estoque, foram retiradas alíquotas e feitas as diluições adequadas, utilizando metanol grau para cromatografia líquida. Para utilização da toxina como padrão externo na análise por CLAE, as soluções metanólicas foram evaporadas até secura total sob fluxo de nitrogênio e ressuspendidas em água ultrafiltrada. Todas as soluções de toxina foram armazenadas em frascos âmbar sob temperatura de -10°C .

3.5 Contaminação artificial das amostras de milho

Às amostras de milho foram adicionadas quantidades definidas do padrão, descrito em 3.4.2, com um pipetador automático. As amostras contaminadas foram deixadas em repouso por 10 minutos antes da etapa de extração.

3.6 Testes de derivação química

Foram testados reagentes de derivação para a moniliformina objetivando a obtenção de um derivado que permitisse a confirmação da moniliformina em CLAE.

3.6.1 Derivação com o cloreto de dansila

Foram utilizados dois métodos de dansilação propostos na literatura. O primeiro procedimento testado foi o método de dansilação direta de hidroxibifenóis, bifenis ou clorofenóis relatado por LAWRENCE & FREI (1976) onde são adicionados 0,2 mL de 0,1 % de cloreto de dansila em acetona e 30 µL de carbonato de sódio 0,1 M sobre 2,0 mL da solução do composto a ser tratado (moniliformina a 13,2 µg/mL). A mistura é mantida a 45°C por 20 minutos, em seguida adicionam-se duas gotas de hidróxido de sódio 1N. Os produtos de reação em solução de hexano foram analisados em CLAE utilizando como fase estacionária coluna de sílica, e hexano - isopropanol (92:8) como fase móvel, com vazão de 1mL/min. O comprimento de onda de leitura foi de 226 nm.

O segundo procedimento testado foi o método de dansilação utilizado por ZANETTA et alii (1970), que empregou reação do composto (200 µl de moniliformina a 29,7 µg/mL) com 300 µL de cloreto de dansila (solução 0,1 % em acetona) em meio contendo 300 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH = 8,85) por duas horas, seguido de precipitação do excesso de reagente com tampão formato de amônia 0,1 M, centrifugação e extração com éter. Os produtos de reação foram monitorados e observados em espectrofotômetro UV/Visível numa faixa de comprimento de onda de 190 a 550 nm.

3.6.2 Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina

O 2,4 dinitrofenilhidrazina é um reagente utilizado na derivação de compostos esteróides. Foi utilizado o procedimento proposto por HENRI et alii (1971), que envolve reação de 0,1 mL do 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,2 % em metanol com o composto

a ser reagido (2,0 mL de moniliformina a 24,5 µg/mL dissolvido em metanol acidificado por ácido clorídrico) seguido de manutenção a temperatura de 50°C por cinco minutos. Os produtos de reação são monitorados em espectrofotômetro UV/Visível com uma faixa de comprimento de onda de 190 a 550 nm.

3.6.3 Derivação com o trifluoreto de boro

O trifluoreto de boro (BF₃) é um catalizador utilizado na metilação de uma ampla variedade de compostos. Foram adicionados 400 µL da solução metanólica de BF₃ a 20 % foram adicionados ao padrão de moniliformina (2,0 mL de solução metanólica de 15,23 µg/mL) e mantidos por uma hora a temperatura de 45°C. Os produtos de reação foram analisados por CLAE em coluna fase reversa C₁₈, utilizando-se como fase móvel metanol a uma vazão de 1mL/ min e selecionando-se o comprimento de onda de 263 nm.

3.7 Desenvolvimento da metodologia analítica para extração e limpeza dos extratos de milho

3.7.1 Verificação do comportamento da moniliformina em adsorventes diversos

Diferentes adsorventes foram testados quanto à capacidade de eluição ou retenção da moniliformina, com metanol como fase móvel (Tabela 5). Foram empregadas colunas de vidro de 10,0 cm de altura e diâmetro interno de 1,0 cm.

Na montagem das colunas, foi empregada uma camada inferior de lã de vidro seguida de uma camada de sulfato anidro de sódio de 1,0 cm de espessura, o adsorvente em teste e finalmente mais 1,0 cm de espessura de sulfato anidro de sódio. A fase móvel escolhida foi o metanol. Aplicou-se a solução de moniliformina no topo da coluna e a eluição ocorreu por gravidade. Foram coletados 30 mL de metanol distribuídos em frações de 5,0 mL, e nestas frações foram obtidos os espectros de absorção em espectrofotômetro ultravioleta/visível.

Tabela 5 - Adsorventes avaliados para a eluição da moniliformina padrão.

Adsorvente	Massa (g)	Volume Eluído de Metanol (mL)
Alumina Neutra	5	30
Florisil	3	30
Celite	3	30
Carvão Ativo	2	30
Sílica Gel	3	30

3.7.2 Procedimentos propostos para extração e limpeza dos extratos de milho

Na tentativa de encontrar um procedimento de extração e limpeza para milho foram propostos e executados dezesseis procedimentos visando encontrar um protótipo de metodologia que pudesse ser aperfeiçoado. A seguir são apresentados de forma esquematizada e simplificada os dezesseis procedimentos testados.

Procedimento A

Pesar 10 g de milho moído



Extrair com 100 mL metanol



Filtrar



Partição com 150 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o extrato em 2,5 mL de metanol



Adicionar 1 mL de Ácido Sulfúrico 5% + 2,0 mL de Sulfato de Amônia 30 %



Filtrar



Aplicar o filtrado em uma coluna de Florisil utilizando como Fase Móvel Metanol



Coletar o Eluato e monitorar cada 2,0 mL no espectrofotômetro

Procedimento B

Pesar 10 g de milho moído



Extrair com 100 mL metanol



Filtrar



Partição com 150 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o extrato em 2,5 mL de metanol



Aplicar o extrato em coluna de Alumina utilizando como Fase Móvel Metanol



Coletar o Eluato e monitorar cada 2,0 mL no espectrofotômetro

Procedimento C

Pesar 10 g de milho moído



Extrair com 100 mL metanol



Filtrar



Partição com 150 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o extrato em 2,5 mL de metanol



Acidificar o extrato com 1,0 mL de Ácido Sulfúrico 5%



Aplicar na coluna de Florisil utilizando como fase móvel metanol



Coletar o Eluato e monitorar cada 2,0 mL no espectrofotômetro

Procedimento D

Pesar 10 g de milho moído



Extrair com 100 mL metanol



Filtrar



Partição com 150 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e adicionar 50 mL de Sulfato de Amônia 30 %



Filtrar



Recolher o filtrado e precipitar o sal com metanol à quente



Filtrar



Evaporar o filtrado até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o extrato em 2,5 mL de metanol



Monitorar o extrato no espectrofotômetro

Procedimento E

Pesar 10 g de milho moído



Extrair com 100 mL de éter de petróleo



Filtrar



Re-extrair o resíduo com metanol



Filtrar



Partição com 150 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e evaporar até secura total em rotavapor a 40°C



Redissolver o extrato em 2,5 mL de metanol



Monitorar o extrato no espectrofotômetro

Procedimento F

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 100 mL de éter de petróleo



Filtrar



Re-extrair o resíduo com metanol



Filtrar



Coletar a fração metanólica e evaporar até secura total em rotavapor a 40°C



Redissolver o extrato em 2,5 mL de metanol



Aplicar o extrato em coluna de florisil utilizando como Fase Móvel Metanol



Coletar frações, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol

Vazão : 0,5 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento G

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extraír com 100 mL de metanol -água (9:1)



Filtrar e proceder partição com 150 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e particionar com 50 mL de éter de petróleo



Coletar a fração metanólica e aplicar em coluna de florisil utilizando como fase móvel metanol



Concentrar o eluato até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL de metanol



Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol

Vazão : 0,5 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento H

Pesar 25 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extraír com 150 mL de metanol -água (9:1)



Filtrar



Partição com 75 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e particionar com 50 mL de éter de petróleo



Coletar a fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL de água ultrafiltrada



Aplicar em coluna de florisil utilizando água como fase móvel



Coletar frações, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol

Vazão: 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento I

Pesar 25 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 150 mL de metanol



Filtrar



Partição com 75 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL de metanol



Aplicar em coluna de alumina neutra utilizando metanol como fase móvel até limpar a coluna. Após limpeza aparente da coluna eluir com água



Coletar frações, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol

Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento J

Pesar 25 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 150 mL de metanol



Filtrar



Partição com 75 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL de metanol



Aplicar em coluna de alumina neutra utilizando metanol como fase móvel até limpar a coluna. Após limpeza aparente da coluna eluir com água seguida de acetona



Coletar frações, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol

Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento K

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 100 mL de metanol



Filtrar



Partição com 50 mL de hexano



Coletar a fração metanólica e adicionar 100 mL de Sulfato de Amônia 8%



Concentrar até secura total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL de metanol



Aplicar em coluna de alumina neutra utilizando metanol como fase móvel até limpar a coluna. Após limpeza aparente da coluna eluir com água



Coletar frações, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento L

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 100 mL de metanol



Filtrar e particionar com 150 mL de hexano



Coletar 50 mL da fração metanólica e evaporar até secura total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL de metanol



Aplicar em coluna de alumina neutra utilizando metanol como fase móvel até limpar a coluna. Após limpeza aparente da coluna eluir com água seguida de solução de cloreto de potássio 4%



Coletar frações, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento M

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 100 mL de metanol



Filtrar e adicionar 50 mL de água



Partição com 150 mL de hexano



Coletar 50 mL da fração metanólica e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL do sistema solvente clorofórmio - metanol-ácido fórmico (70:30:0,16)



Aplicar em coluna de sílica gel utilizando 20 mL da fase móvel clorofórmio-metanol-ácido fórmico (70:30:0,16) seguido de 20 mL de metanol



Evaporar as frações até secar total em rotavapor a 40°C



Ressuspender as frações em metanol, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento N

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 100 mL de metanol



Filtrar e coletar 50 mL e evaporar até secar total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL do sistema solvente clorofórmio- metanol -ácido fórmico (70:30:0,16)



Aplicar em coluna de sílica gel utilizando 20 mL da fase móvel clorofórmio-metanol-ácido fórmico (70:30:0,16) seguido de 20 mL de metanol



Evaporar as frações até secar total em rotavapor a 40°C



Ressuspender as frações em água ultrafiltrada, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol - Água (80:20) Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento O

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 150 mL de metanol



Filtrar e coletar alíquota de 100 mL e particionar com 100 mL de éter de petróleo-água (95:5)



Coletar a fração metanólica e proceder partição com 150 mL de hexano



Recolher 50 mL da porção metanólica e evaporar até secura total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 2,5 mL do sistema solvente clorofórmio- metanol-ácido fórmico (70:30:0,16)



Aplicar em coluna de sílica gel utilizando 20 mL da fase móvel clorofórmio-metanol-ácido fórmico (70:30:0,16) seguido de 20 mL de metanol



Evaporar a fração metanólica até secura total em rotavapor a 40°C



Ressuspender em metanol, Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol - Água (80:20) Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Procedimento P

Pesar 10 g de milho moído



Adicionar quantidade conhecida de moniliformina



Extrair com 150 mL de metanol - água (9:1)



Filtrar



Coletar alíquota de 100 mL e proceder partição com 150 mL de hexano



Recolher 50 mL da porção metanólica e evaporar até secura total em rotavapor a 40°C



Redissolver o concentrado em 3,0 mL de água ultrafiltrada



Filtrar e Injetar no Cromatógrafo com as seguintes condições:

Fase Estacionária: Coluna Fase Reversa C18 5 µm

Fase Móvel: Metanol - Água (90:10)

Vazão : 1,0 mL/ min

Comprimento de onda do detector: 263 nm

Os procedimentos descritos foram executados e a partir dos resultados obtidos, selecionou-se o procedimento P para executar-se a etapa de otimização das condições de trabalho em CLAE.

3.8 Otimização das condições de trabalho no Cromatógrafo a Líquido

3.8.1 Seleção de fases móveis para desenvolvimento em cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizando-se como procedimento básico de extração e limpeza dos extratos de milho o procedimento P, foram testados os seguintes sistemas solventes listados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Fases móveis testadas com moniliformina em cromatografia líquida de alta eficiência: Verificação do efeito dos solventes puros e combinados.

SOLVENTES	PROPORÇÃO (%)	FLUXO (mL/min)
acetonitrilo	100	1,0
acetonitrilo / metanol	90 : 10	1,0
acetonitrilo / metanol	80 : 20	1,0
acetonitrilo / metanol	50 : 50	1,0
acetonitrilo / metanol	10 : 90	1,0
Água	100	1,0
Água / metanol / Tetrahidrofurano	90 : 9 : 1	1,0
metanol	100	1,0
metanol / água	10 - 90	1,0
metanol / água	90 - 10	1,0

Tabela 7 - Fases móveis testadas com moniliformina em cromatografia líquida de alta eficiência: Verificação do efeito da água associada a diferentes sulfatos metálicos.

SOLVENTES	PROPORÇÃO (%)	VAZÃO (mL/mín)
Água + Sulfato de Zinco (1 mM)	100	1,0
Água + Sulfato de Zinco (1 mM)/ metanol	93 : 7	1,0
Água + Sulfato de Magnésio (1 mM)	100	1,0
Água + Sulfato de Cobre (1 mM)	100	1,0
Água + Sulfato de Cálcio (1 mM)	100	1,0

Tabela 8 - Fases móveis testadas com moniliformina em cromatografia líquida de alta eficiência: Verificação do efeito de tampão e tensoativo associados à mistura água/metanol/sulfato de zinco.

SOLVENTES	PROPORÇÃO (%)	VAZÃO (mL/min)
Água + Citrimida (0,025%)/Água + Sulfato de Zinco (1 mM)/ Metanol	10 : 15 : 75	0,7
Água + Citrimida (0,025%) + Sulfato de Zinco (1 mM) / Água + Acetato de Amônia (1%) / Metanol	70 - 10 - 20	0,7
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) / Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) / Metanol	50 : 10 : 40	0,7
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) / Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) / Metanol	40 : 10 : 50	0,7
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) - Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) - Metanol	42 : 10 : 48	0,8
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) / Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) / Metanol	42 : 10 : 48	0,7

Para cada fase móvel citada nas tabelas 6, 7 e 8 foram realizadas injeções de padrão de moniliformina e de extratos de milho limpos, visando verificar o melhor sistema solvente no cromatógrafo a líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, a seguir especificadas:

- Fase Estacionária: Coluna Fase-Reversa C₁₈ Spherisorb ODS-1 5µm.
- Comprimento de onda de leitura do detector: 263 nm
- Tempo de corrida cromatográfica: 20 minutos

3.8.2 Testes preliminares para ajuste do procedimento P

3.8.2.1 Adequação da quantidade de amostra e do volume do solvente extrator

Foram executados testes preliminares objetivando adequar a melhor quantidade de amostra de milho a ser utilizada no procedimento de extração. Foram testados métodos de extração utilizando-se 5, 10 e 25 gramas de milho moído e 50, 100 e 150 mililitros de solvente extrator metanol-água, respectivamente.

3.8.2.2 Adequação da etapa de limpeza e desengorduramento utilizando partição com hexano

A etapa de partição em hexano foi avaliada quanto à capacidade de limpeza do extrato, utilizando-se como procedimento fixo uma única partição com 100 mL de hexano combinada com um dos seguintes procedimentos:

- Antes da partição com hexano, adicionar à alíquota de 35 mL do filtrado, 15 mL de água ultrafiltrada.
- Antes da partição com hexano, adicionar celite ao extrato metanólico, homogeneizar, filtrar em papel de filtro frizado e realizar a partição.

- Após a partição com hexano, manter o extrato metanólico sob temperatura de -10°C por 30 minutos. Em seguida realizar a filtração em papel de filtro frizado.

- Após a partição com hexano, adicionar ao extrato metanólico 5 g de celite. Em seguida realizar a filtração em papel de filtro frizado.

- Após a partição com hexano, adicionar ao extrato metanólico 5 g de celite preparada da seguinte maneira: Remoção de material orgânico com incineração a 600°C em mufla, seguida de lavagem com ácido clorídrico 3 M e posteriormente com água ultrapurificada. Numa última etapa, a celite é lavada com metanol, filtrada e seca em estufa. Após a adição da celite, o extrato é filtrado em papel de filtro frizado.

- Após a partição com hexano, realizar uma segunda partição com 50 mL de hexano.

3.8.2.3 Introdução da etapa de lavagem das paredes do balão.

Após a etapa de secagem do extrato metanólico em evaporador rotatório, ficam agregadas partículas às paredes do balão, tornando-se necessário uma etapa adicional para remoção destas partículas. Foi introduzida uma lavagem com 10 mL de acetona grau CLAE para remoção das partículas agregadas à parede seguida de secagem em evaporador rotatório a 40°C .

3.8.2.4 Adequação da etapa de ressuspensão do extrato.

Foram testadas duas maneiras diferentes de ressuspensão do extrato:

- Ressuspender o extrato em 2,0 mL de água ultrapurificada, levar ao ultrassom para melhor dissolução do extrato, adicionar mais 1,0 mL de água ultrapurificada e levar novamente ao ultrassom.

- Ressuspender o extrato em 1,0 mL de água ultrapurificada, levar ao ultrassom para melhor dissolução do extrato, adicionar mais 1,0 mL de água ultrapurificada e levar novamente ao ultrassom.

3.9 Metodologia Proposta

- Extração e limpeza

5 g de amostra + 50 mL de metanol-água (95:5)

Homogeneizar em liquidificador
Velocidade média/ 5min

↓
Filtrar o homogeneizado em filtro de papel

↓
Coletar uma alíquota de 35 mL do filtrado

↓
Realizar a primeira partição com 100 mL de hexano

↓
Realizar a segunda partição com 50 mL de hexano

↓
Coletar 35 mL da fração metanólica

↓
Secagem em evaporador rotatório a temperatura de 40 °C

↓
Lavagem das paredes do balão com acetona grau CLAE até remoção total das partículas agregadas às paredes do vidro.

↓
Secagem em evaporador rotatório a temperatura de 40°C

↓
Ressuspender o extrato em 1,0 +1,0 mL de água para CLAE

↓
Filtrar o extrato em filtros HATF 01300

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Condições:

Fase Estacionária : Coluna Fase Reversa C18 Spherisorb ODS-1 5 µm

Fase Móvel : Água + 350 mg Citrimida + 500mg Sulfato de Zinco Heptahidratado/L (42%)

Tampão acetato de sódio (pH = 3,5) (10%)

Metanol (48%)

Vazão da Fase Móvel: 0,7 a 0,8 mL/min.

Comprimento de onda de absorção do Detector UV/Visível : 263 nm.

Quantidade de amostra injetada : 20 µL

3.10 Teste de rusticidade

Este teste foi realizado objetivando verificar a sensibilidade do método proposto a pequenas modificações nas condições de trabalho e nos reagentes, utilizando-se o modelo sugerido por Youden (WERNIMONT, 1985). Para tal, foram selecionados sete fatores, considerando-se para cada um, uma condição básica e uma condição alternativa, listadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições básicas e alternativas avaliadas no teste de rusticidade

CONDIÇÕES AVALIADAS	CONDIÇÃO BÁSICA	CONDIÇÃO ALTERNATIVA
A - Qualidade (marca) do solvente de extração	Grupo Química	Merck
B - Volume do solvente de extração	50 mL	100 mL
C - Volume de hexano da segunda partição	50 mL	25 mL
D - Qualidade (marca) do hexano utilizado nas partições	Merck	Synth
E - Tempo de espera após extração e limpeza e antes da injeção no cromatógrafo	0 h	24 h
F - Temperatura de Secagem do extrato	40 °C	55 °C
G - Volumes sucessivos para suspensão do extrato a ser aplicado no cromatógrafo.	1+ 1	1 + 1 + 1

Combinou-se as variáveis de oito maneiras diferentes, sendo que em um teste todas as condições básicas foram mantidas e nos sete demais utilizou-se quatro condições alternativas e três condições básicas para cada teste, conforme se pode verificar no esquema abaixo:

- 1- Todas as condições básicas
- 2- C E F G
- 3- B D F G
- 4- B C D E
- 5- A D E G
- 6- A C D F
- 7- A B E F
- 8- A B C G

Neste procedimento utilizou-se oito amostras de milho artificialmente contaminado com quantidades iguais de moniliformina.

3.11 Teste de Recuperação

Amostras de milho, em duplicata, foram contaminadas artificialmente com sete níveis de moniliformina, procedendo-se a extração, limpeza e quantificação da toxina pelo método proposto.

3.12 Teste de Repetibilidade

Nesta etapa foram utilizadas amostras artificialmente contaminadas com moniliformina e analisadas em triplicata. Os coeficientes de variação obtidos serviram para avaliar a repetibilidade da metodologia proposta.

3.13 Curva Padrão

A curva de calibração foi elaborada segundo WERNIMONT (1985), utilizando-se sete soluções aquosas de moniliformina de concentrações variadas. Foram realizadas três injeções de cada um dos sete níveis e calculados os seus coeficientes de variação.

4.0 Resultados e Discussão

4.1 Testes de derivação química.

A confirmação da identidade do composto tóxico é muitas vezes negligenciada em trabalhos publicados. Tal negligência, porém, invalida os dados obtidos. Sem uma prova da identidade, seja por espectrometria de massa, seja por derivação química, nada se pode afirmar com segurança. No presente trabalho houve a preocupação de se encontrar uma reação química que pudesse ser empregada em quaisquer condições laboratoriais, uma vez que a grande maioria dos laboratórios, mesmo a nível internacional, não dispõe de acesso fácil a um espectro de massa.

Não há na literatura, até o presente momento, descrição de uma derivação química para a moniliformina com a finalidade de confirmar sua identidade em CLAE.

4.1.1 Derivação com o cloreto de dansila.

O procedimento de dansilação direta citado por LAWRENCE & FREI (1976) foi realizado e os produtos de reação obtidos utilizando a moniliformina como composto a ser reagido foram analisados por CLAE empregando coluna de sílica fase normal e fase móvel contendo hexano. Através da comparação de cromatogramas dos produtos de reação, do cloreto de dansila, do carbonato de sódio e do metanol, verificou-se que não houve formação de um derivado dansilado da moniliformina.

Resultado semelhante foi encontrado na utilização do procedimento de dansilação proposto por ZANETTA et alii (1970), onde a observação dos produtos de reação em espectrofotômetro na faixa de 190 a 550 nm não indicou a formação de um derivado dansilado da moniliformina.

4.1.2 Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina.

O procedimento de HENRI et alii (1971) para derivação de esteróides foi empregado com a moniliformina e esta, embora, possua dois grupos carbonila disponíveis, não deu indicações de reação com o 2,4 DNP. Este reagente tem sido empregado na literatura como agente revelador para CCD (STEYN et alii, 1978; RABIE et alii, 1978; KAMIMURA et alii, 1981; ABBAS et alii, 1984; VESONDER, 1986). KAMIMURA et alii (1981) obtiveram um derivado da moniliformina com 2,4 DNP para quantificação por densitometria em camada delgada, demonstrando que a formação do derivado é possível de ocorrer.

4.1.3 Metilação

A metilação, tendo trifluoreto de boro como catalizador, mostrou-se adequada para confirmar a identidade da moniliformina. A formação de um derivado foi comprovada por CLAE em coluna de fase reversa C₁₈, com metanol como fase móvel à vazão de 1,0 mL/min e detecção por absorção a 263 nm. Nestas condições, a moniliformina pura apresentou um tempo de retenção de 1,3 minutos e espectro característico (Figura 7). O derivado metilado apresentou um tempo de retenção de 1,6 - 1,8 minutos e o comprimento de absorção máximo sofreu modificação de 229 para 202 nm (Figura 8). A co-cromatografia foi realizada adicionando-se a toxina pura ao produto de reação e dois picos distintos foram obtidos com os tempos de retenção acima citados. A metilação não foi completa, não podendo, portanto, ser utilizada em análises quantitativas. Os cromatogramas da moniliformina pura, do derivado metilado e da co-cromatografia são apresentados nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

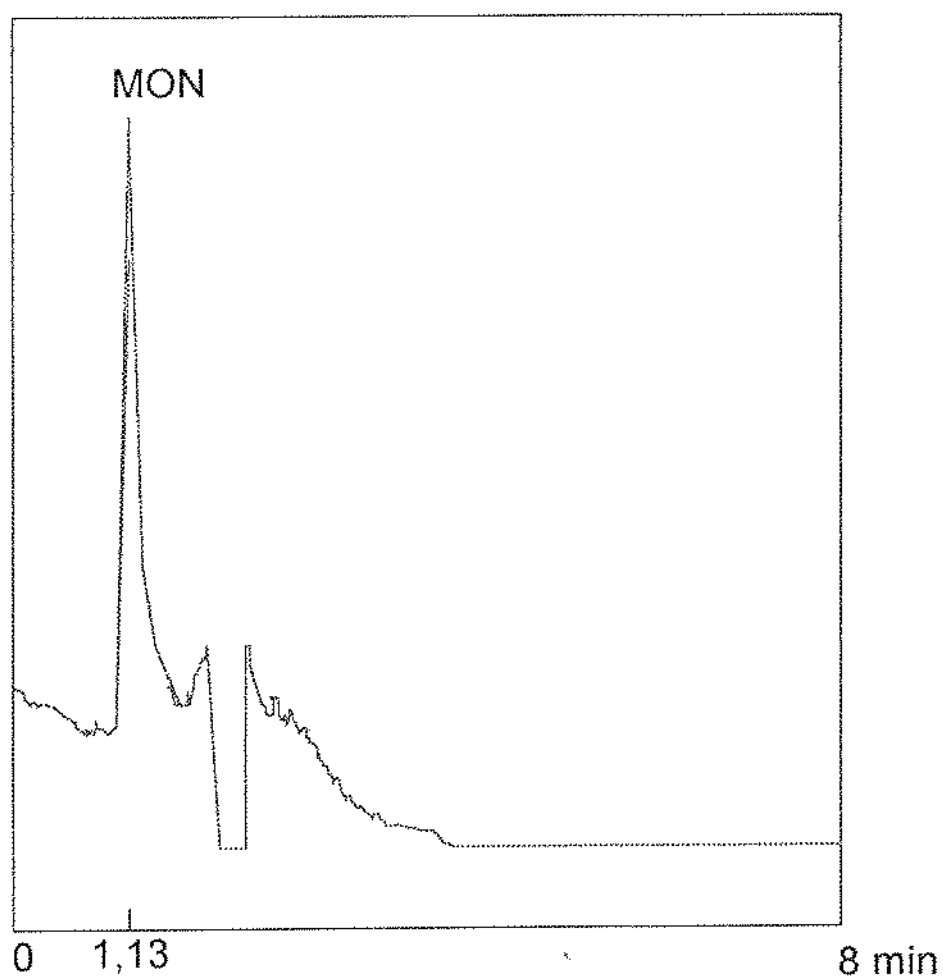


Figura 4 - Perfil Cromatográfico da moniliformina padrão (tempo de retenção de 1,13 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 µm

Fase Móvel: Metanol Vazão: 1,0 mL/min

Detector : Ultravioleta por conjunto de díodos $\lambda = 263$ nm

Velocidade do papel : 10 mm/min

Quantidade injetada de amostra: 20 µL

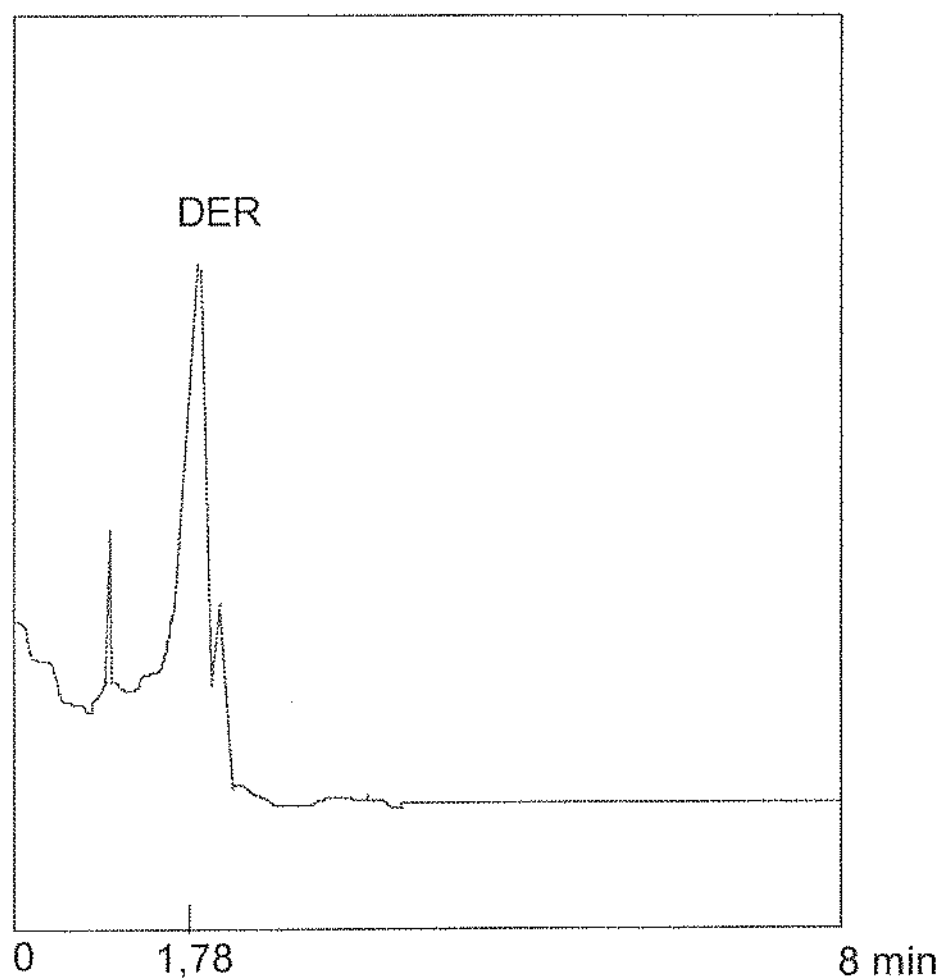


Figura 5 - Perfil Cromatográfico do derivado metilado da moniliformina (tempo de retenção de 1,78 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 μ m

Fase Móvel: Metanol Vazão: 1,0 mL/min

Detector : Ultravioleta por conjunto de díodos $\lambda = 263$ nm

Quantidade injetada de amostra: 20 μ L

Velocidade do papel : 10 mm/min

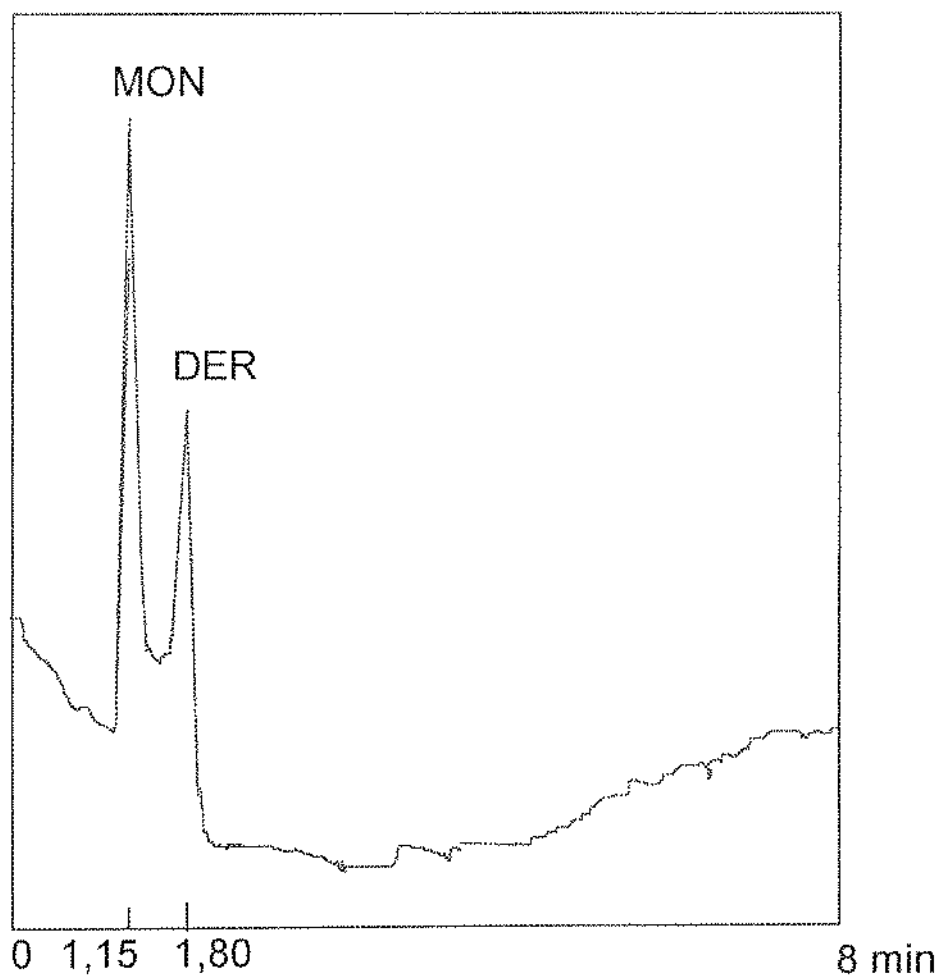


Figura 6 - Perfil Cromatográfico da Co-cromatografia da moniliformina padrão (tempo de retenção de 1,15 min) e seu derivado metilado (1,80 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 μ m

Fase Móvel: Metanol Vazão: 1,0 mL/min

Detector : Ultravioleta por conjunto de diodos $\lambda = 263$ nm

Quantidade injetada de amostra: 20 μ L

Velocidade do papel : 10 mm/min

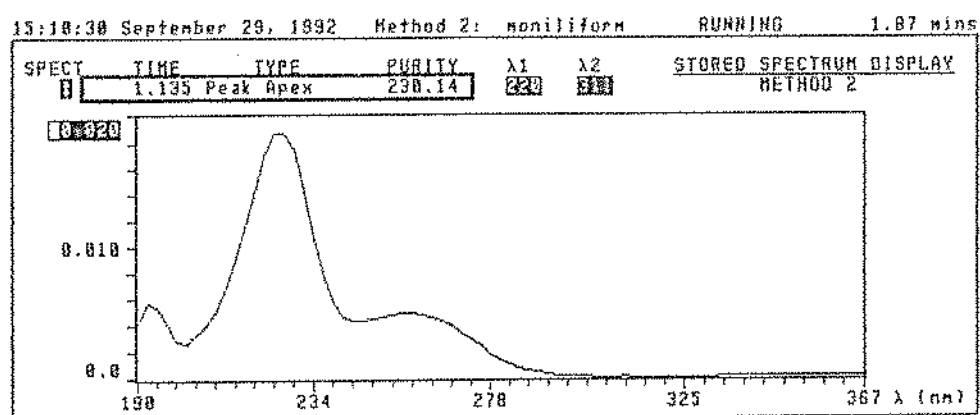


Figura 7 - Espectro de absorção da moniliformina pura.

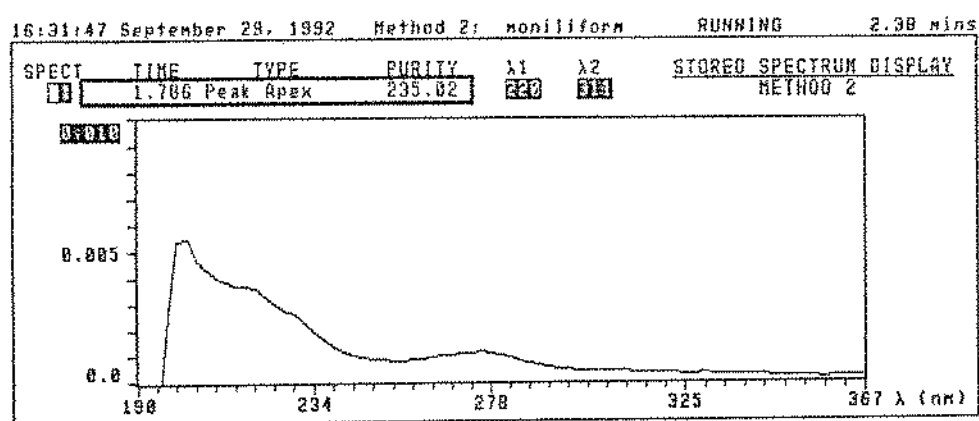


Figura 8 - Espectro de absorção do derivado metilado da moniliformina.

4.2 Comportamento da moniliformina em adsorventes diversos.

O comportamento da toxina foi avaliado através de análise por varredura em espectrofotômetro UV das frações eluídas das colunas cromatográficas (Tabela 10). Dos adsorventes avaliados, a alumina neutra (óxido de alumínio neutro) e o carvão ativo apresentaram forte adsorção da toxina quando metanol era empregado como fase móvel. O florisil (silicato de magnésio), a celite (óxido de silício) e a sílica gel (ácido silícico) apresentaram pouca adsorção da toxina. Na literatura não são fornecidos dados sobre o comportamento da toxina nesses adsorventes, mas SCOTT et alii (1987b) utilizaram uma coluna contendo 0,15 g de alumina neutra para limpeza do extrato. A fase móvel continha o par iônico tetrahidroxibutilamonio e fosfato dihidrogênio de potássio. Nessas condições, obteve-se a eluição total da toxina.

Tabela 10 - Comportamento da moniliformina em adsorventes diversos utilizando metanol como fase móvel.

ADSORVENTE	COMPORTAMENTO
Alumina Neutra	forte adsorção
Florisil	eluição rápida
Celite	eluição rápida
Carvão Ativo	forte adsorção
Sílica Gel	eluição rápida

4.3 Procedimentos para extração e limpeza dos extratos de milho.

Os procedimentos descritos em 3.7.2 foram testados e com exceção do procedimento P, todos apresentaram-se ineficientes na limpeza dos extratos de milho. O emprego de colunas de florisil, alumina e sílica-gel combinado a diversas fases móveis mostrou-se inadequado para remoção dos interferentes. A moniliformina adicionada ao milho não foi detectada na fração final analisada, na maioria das vezes. O mesmo ocorreu com os procedimentos que empregaram sulfato de amônia ou éter de petróleo na etapa de limpeza.

O procedimento P, onde foi empregada extração com metanol/água (9:1) seguida de partição com hexano, evaporação do extrato e dissolução do resíduo em água ultrafiltrada apresentou-se eficiente na extração e limpeza do extrato de milho. No cromatograma obtido após este procedimento, o pico referente à moniliformina eluiu separadamente dos interferentes, apresentando um pico bem resolvido com tempo de retenção de 1,54 min.

4.4 Otimização das condições de trabalho em CLAE.

4.4.1 Seleção de fases móveis para desenvolvimento.

O comportamento da moniliformina, tanto a presente no extrato obtido utilizando-se o procedimento P, como a toxina pura (padrão), observados após cromatografia líquida utilizando-se coluna de fase reversa Spherisorb ODS-1 (5µm) e detecção a 263 nm é apresentado nas Tabelas 11, 12 e 13.

Acetonitrilo puro ou em combinações com metanol mostrou-se ineficiente na separação da moniliformina dos interferentes, apresentando esta última picos partidos e eluição muito próxima ao pico do solvente (Tabela 11). Já com metanol e combinações de metanol-água, a moniliformina eluiu próxima ao pico do solvente, sendo que no extrato, a separação dos interferentes foi maior que quando utilizando acetonitrilo, mas insuficiente para ser quantificada. O uso de água como único solvente mostrou-se mais eficiente na separação da toxina dos interferentes de polaridade próxima à moniliformina.

Tabela 11-Comportamento da moniliformina pura e no extrato de milho utilizando como fase móvel solventes puros e combinados em cromatografia líquida de alta eficiência.

SOLVENTES	PROPORÇÃO (%)	TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	COMPORTAMENTO MONILIFORMINA	
			PURA	EXTRATO
acetonitrilo	100	1,7	pico partido	si
acetonitrilo / metanol	90 : 10	1,10	pico partido que elui próximo ao pico do solvente	si
acetonitrilo / metanol	80 : 20	1,10	elui próximo ao pico do solvente	si
acetonitrilo / metanol	50 : 50	1,15	elui próximo ao pico do solvente	si
acetonitrilo / metanol	10 : 90	1,14	elui próximo ao pico do solvente	si
Água	100	1,24	pico bem resolvido	elui anterior e separado dos interferentes
Água / metanol / Tetrahidrofurano	90 : 9 : 1	1,47	pico partido e próximo ao pico do solvente	si
metanol	100	1,26	pico próximo ao pico do solvente	pico próximo aos interferentes
metanol / água	10 : 90	1,22	pico com pequena cauda	elui anterior e menos separado dos interferentes
metanol / água	90 : 10	1,20	pico próximo ao pico do solvente	pico próximo aos interferentes

si - Separação inadequada da toxina com relação aos interferentes

Tabela 12 - Comportamento da moniliformina pura e no extrato utilizando como fase móvel água associada a diferentes sulfatos metálicos em cromatografia líquida de alta eficiência.

SOLVENTES	TEMPO DE RETENÇÃO ^a (minutos)	COMPORTAMENTO MONILIFORMINA	
		PURA	EXTRATO
Água + Sulfato de Zinco (1 mM)	1,65	pico com cauda	pico com cauda próximo aos interferentes
Água + Sulfato de Zinco (1 mM) / metanol 93:7	1,67	pico com cauda	pico com cauda próximo aos interferentes
Água + Sulfato de Magnésio (1 mM)	1,64	pico com cauda	pico interferente muito próximo
Água + Sulfato de Cobre (1 mM)	1,73	pico com cauda	pico interferente muito próximo
Água + Sulfato de Cálcio (1 mM)	1,78	pico com cauda	pico interferente muito próximo

a - Vazão da fase móvel de 1,0 mL/min

Tabela 13 - Comportamento da moniliformina pura e no extrato sob o efeito de tampão e tensoativo associados à mistura água/metanol/sulfato de zinco.

SOLVENTES	TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	COMPORTAMENTO MONILIFORMINA	
		PURA	EXTRATO
Água + Citrimida (0,025%)/ + Sulfato de Zinco (1 mM)/ Metanol (10:15:5)	1,80	pico com cauda	segundo pico a eluir. Próximo aos interferentes
Água + Citrimida (0,025%) + Sulfato de Zinco (1 mM) / Água + Acetato de Amônia (1%) / Metanol (70:10:20)	10,25	pico com cauda	pico com cauda bem separado
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) / Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) / Metanol (50:10:40)	7,04	pico com cauda	pico com cauda bem separado
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) / Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) / Metanol 40:10:50	8,54	pico bem resolvido	pico bem resolvido separado dos interferentes
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) - Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) - Metanol (42:10:48) Vazão = 0,8 mL/min	10,2	pico bem resolvido	pico bem resolvido separado dos interferentes
Água + Citrimida (0,035%) + Sulfato de Zinco (0,05 %) - Tampão Acetato de Sódio (pH=3,5) - Metanol 42:10:48 Vazão = 0,7 mL/min	12,3	pico bem resolvido	pico bem resolvido separado dos interferentes

Fases móveis contendo combinações de água e solventes orgânicos isentos de sais ou tampões mostraram, em alguns casos, capacidade de separação, mas o tempo de retenção nestas fases móveis simples não ultrapassou 2,0 minutos.

Em CLAE, a utilização de metais de transição nas fases móveis para complexação com substâncias iônicas ou ionizáveis tem tido um papel importante no aumento da seletividade desta técnica (COOKE et alii, 1978). Nos métodos para micotoxinas, o sulfato de zinco tem sido empregado na determinação de ácido tenuazônico, alternariol, alternariol metil éter (STACK et alii, 1985) e ácido ciclopiazônico (URANO et alii, 1992).

No presente estudo, diferentes sulfatos metálicos foram utilizados nas fases móveis, em concentrações molares iguais, para verificar o comportamento da moniliformina e sua separação dos interferentes. Os metais selecionados para o teste foram o zinco, magnésio, cobre e cálcio. A fase móvel empregando sulfato de cálcio 1 mM contida no reservatório, após 24 horas de preparo, apresentou ligeira turvação enquanto as outras permaneceram estáveis. O pico referente à moniliformina pura apresentou assimetria e cauda nos cromatogramas dos quatro sulfatos metálicos. Os picos referentes à toxina na amostra, quando utilizados os sulfatos de magnésio, cobre e cálcio na fase móvel, eluíram juntamente com interferentes e quando empregou-se o sulfato de zinco os interferentes eluíram segundos após a toxina (Tabela 12). Os tempos de retenção da moniliformina nestas fases móveis não variaram significativamente (1,64 a 1,78 min). Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o emprego dos sulfatos metálicos unicamente não modificou marcadamente o comportamento da moniliformina, tornando-se necessário um novo componente na fase móvel que contribuísse para o aumento do tempo de retenção da toxina assim como na melhoria da resolução do cromatograma.

Em CLAE, substâncias ionizadas ou ionizáveis, como a moniliformina, apresentam comportamento indesejável tal como assimetria, cauda, divisão em dois picos, na maioria dos tipos de coluna. Nas colunas de troca iônica isto não ocorre. A cromatografia de pares iônicos, por sua vez, também torna possível a separação eficiente desses compostos (POOLE et alii, 1984). Optou-se, então, por conduzir testes empregando um tensoativo.

A citrimida (brometo de hexadeciltrimetilamônio) é um tensoativo catiônico de cadeia longa que forma par iônico com grupos sulfonatos e tem sido utilizada em cromatografia de pares iônicos (KNOX & LAIRD, 1976). O emprego da citrimida na separação de compostos iônicos ou ionizáveis em CLAE tem obtido sucesso (MACRAE, 1982; SCOTT & KUCERA, 1979) . Mostrou-se também adequada na separação de catecolaminas exibindo uma separação eficiente, boa resolução dos picos e alta sensibilidade de detecção (KNOX & JURAND (1976). A adição de citrimida à fase móvel na separação de isômeros do ácido naftilaminosulfônico produziu igualmente bons resultados(KNOX & LAIRD).

O efeito do emprego do tensoativo citrimida em adição à mistura água/metanol/sulfato de zinco e aos tampões acetato de amônia e acetato de sódio está apresentado na Tabela 13.

A moniliformina não apresentou mudança significativa no seu tempo de retenção (1,80 min) com adição de citrimida, mas em combinação com os tampões o aumento foi significativo. Com a utilização do acetato de amônia o tempo de retenção obtido foi de 10,25 min e com acetato de sódio 12,3 min para vazão de fase móvel de 0,7 mL/min. Foram testadas sete concentrações de citrimida (100 mg/L; 200 mg/L; 250 mg/L; 300 mg/L; 350 mg/L; 400 mg/L e 500 mg/L) na fase móvel. Para esses testes, uma amostra de milho fortificada com moniliformina foi empregada. Os cromatogramas obtidos foram avaliados e a concentração de citrimida de 350 mg/L foi escolhida devido à melhor separação da toxina com relação aos interferentes provenientes da matriz milho. Diversas proporções dos componentes da fase móvel foram avaliadas e a combinação de água + citrimida (0,035%) + sulfato de zinco (0,05 %) / tampão acetato de sódio / metanol (42:10:48) propiciou uma melhor separação da moniliformina em relação aos interferentes.

Os cromatogramas obtidos com a injeção da uma amostra de milho fortificado e da moniliformina pura empregando diferentes fases móveis podem ser observados nas figuras 9, 10, 11 e 12.

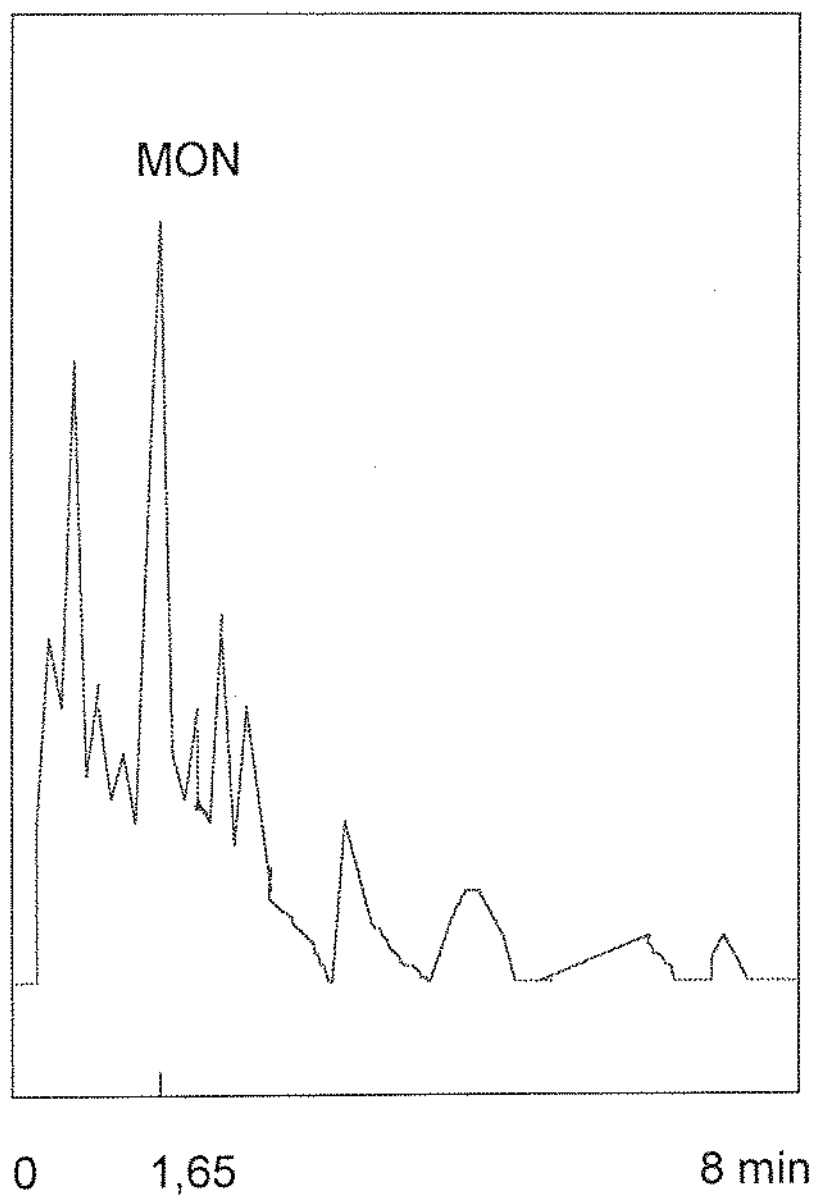


Figura 9 - Perfil cromatográfico de uma amostra de milho fortificado com moniliformina (tempo de retenção de 1,65 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 µm
Fase Móvel: água + sulfato de zinco (1 mM) Vazão: 1mL/min
Detector : Ultravioleta por conjunto de diodos λ= 263 nm
Quantidade injetada de amostra: 20 µL

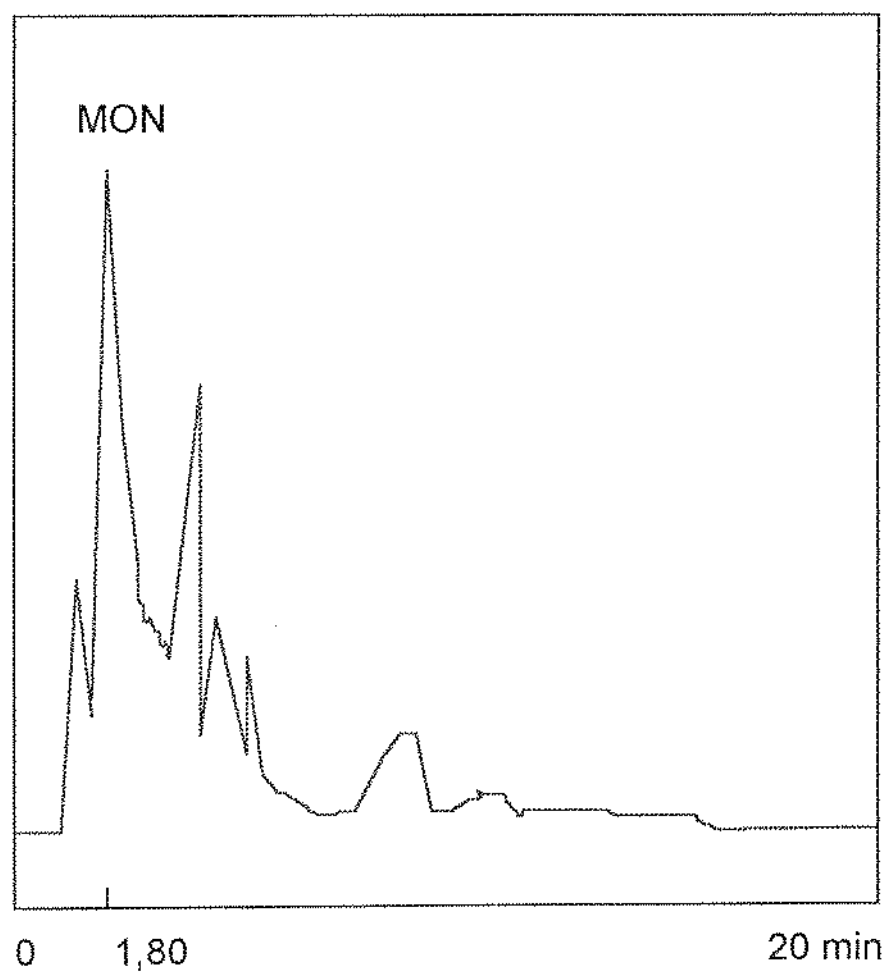


Figura 10 - Perfil cromatográfico de uma amostra de milho fortificado com moniliformina (tempo de retenção de 1,80 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 µm

Fase Móvel: água + citrimida (0,025 %)/ água + sulfato de zinco (1 mM)/ metanol (10:15:75).

Vazão: 1mL/min

Detector : Ultravioleta por conjunto de diodos $\lambda = 263$ nm

Quantidade injetada de amostra: 20 µL

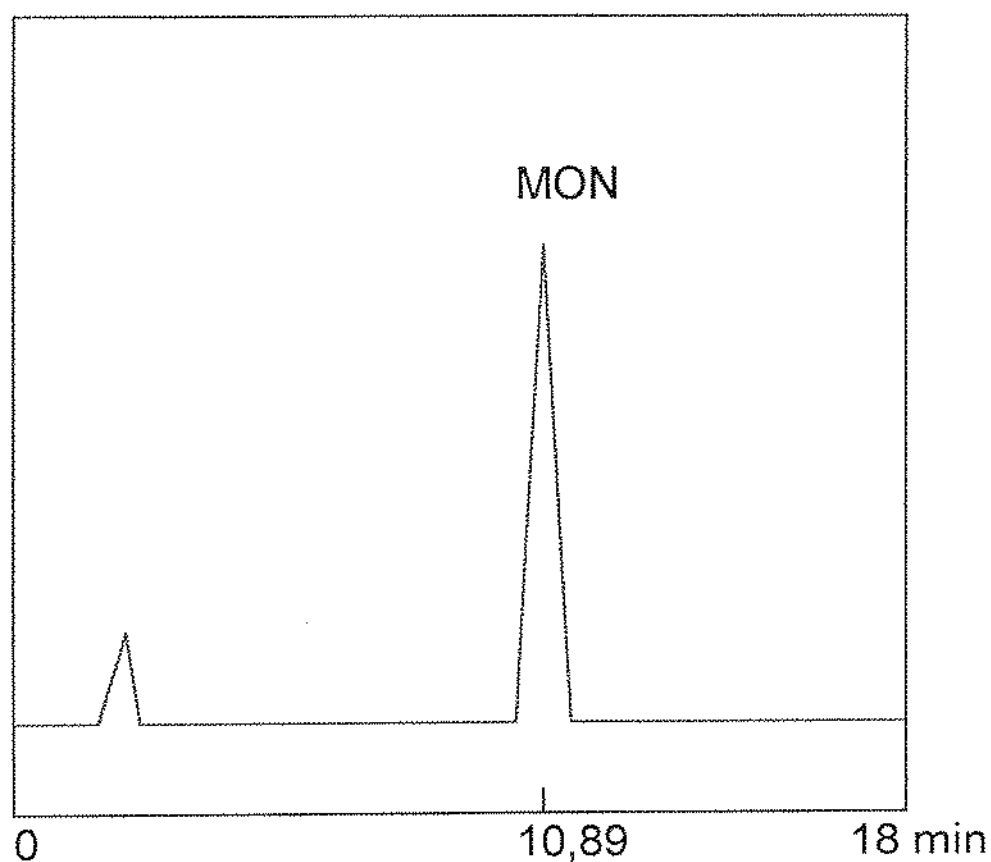


Figura 11 - Perfil cromatográfico da moniliformina pura empregando a fase móvel proposta..(tempo de retenção de 10,89 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 µm

Fase Móvel:

-água + 350 mg citrimida + 500 mg sulfato de zinco/L (42 %)

-tampão acetato de sódio (pH=3,5) (10 %)

-metanol (48 %)

Vazão = 0,8 mL/min

Detector : Ultravioleta por conjunto de diodos λ= 263 nm

Quantidade injetada de amostra: 20 µL

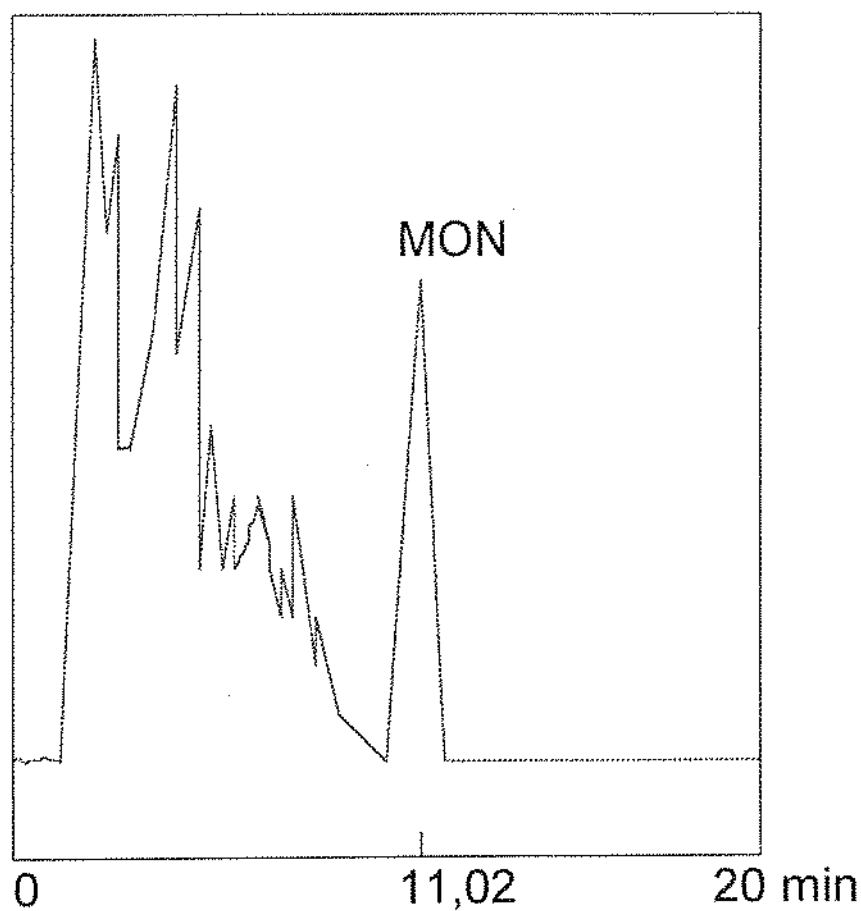


Figura 12 - Perfil cromatográfico de uma amostra de milho fortificado com moniliformina empregando a fase móvel proposta.(tempo de retenção de 11,02 min).

Condições: Coluna: C₁₈ Spherisorb ODS-1 150 x 4,6 mm, 5 µm

Fase Móvel:

-água + 350 mg citrimida + 500 mg sulfato de zinco/L (42 %)

-tampão acetato de sódio (pH=3,5) (10 %)

-metanol (48 %)

Vazão = 0,8 mL/min

Detector : Ultravioleta por conjunto de diodos $\lambda = 263$ nm

Quantidade injetada de amostra: 20 µL

4.4.2 Otimização do procedimento Escolhido.

4.4.2.1 Adequação da quantidade de amostra e do volume do solvente extrator

Os testes de adequação da quantidade de amostra e volume de solvente extrator foram conduzidos utilizando-se o procedimento P (Tabela 14). Ao empregar-se 25 g de milho e 150 mL de metanol-água (135:15), o volume de extrato evaporado foi de 100 mL, correspondente a 16,6 g de amostra. Com 10 g e 100 mL, o volume a ser concentrado foi de 50 mL (referente a 5 g de amostra). Para 5 g de milho e 50 mL de solvente, o volume a ser evaporado foi de 35 mL (correspondente a 3,5 g da amostra inicial). No primeiro caso, os 3,0 mL não foram capazes de dissolver a amostra, deixando resíduos na parede do balão. Uma diluição utilizando 10 mL de água foi suficiente, mas diminuiu a sensibilidade do método. No segundo caso, 3,0 mL foram suficientes para ressuspender todo extrato, mas quando se utilizou 5 g de amostra, 2,0 mL de água ultrafiltrada foram suficientes e como consequência um aumento na sensibilidade do método.

A quantidade de amostra a ser empregada na metodologia proposta é de 5 g e o volume de solvente metanol-água (9:1) é de 50 mL, devido à contribuição ao aumento de sensibilidade do método.

Tabela 14 - Adequação da quantidade de amostra e do volume de solvente extrator.

QUANTIDADE DE AMOSTRA (g)	VOLUME DE SOLVENTE (mL)	VOLUME A SER EVAPORADO (mL)	DISSOLUÇÃO DO RESÍDUO	
			3 mL	2 mL
5	50	35	suficiente	suficiente
10	100	50	suficiente	insuficiente
25	150	100	insuficiente	insuficiente

4.4.2.2 Limpeza e desengorduramento utilizando partição com hexano

A capacidade de limpeza do extrato pela partição em hexano foi testada. Utilizou-se como procedimento fixo uma única partição com 100 mL de hexano combinada com os procedimentos descritos a seguir :

A adição de 15 mL de água a uma alíquota de 35 mL do filtrado foi excluída do método devido ao aumento do tempo de evaporação do extrato, pois na temperatura de 40°C, o extrato contendo maior quantidade de água necessita de maior tempo no evaporador até secar total.

A utilização de celite antes da partição com hexano removeu eficientemente os interferentes, mas a recuperação do método ficou marcadamente reduzida.

O resfriamento do extrato metanólico à - 10°C por 30 minutos resultou em melhoria da limpeza, porém, provocou a formação de grumos, contribuindo para a redução da recuperação do método.

A adição de celite após a partição com hexano removeu interferentes, mas os cromatogramas apresentaram ainda um interferente que eluiu com o mesmo tempo de retenção da moniliformina. O mesmo ocorreu quando a celite tratada era utilizada.

O emprego de uma segunda partição com 50 mL de hexano mostrou-se eficiente na remoção dos interferentes. Uma segunda partição foi capaz de remover compostos que a primeira partição não removeu.

4.4.2.3 Ressuspensão do extrato em água ultrafiltrada.

A ressuspensão do resíduo em 2,0 e 3,0 mL de água foi testada. Dois mililitros de água foram suficientes para remover todo o resíduo evaporado do balão de vidro. Considerando-se que a diluição em 3,0 mL diminuiria a sensibilidade do método, o volume para diluição selecionado foi de 2,0 mL em duas alíquotas de 1,0 mL seguidas de agitação no ultrassom.

4.5. Avaliação da metodologia desenvolvida.

4.5.1 Teste de rusticidade

A sensibilidade do método proposto a pequenas variações nas condições e nos reagentes foi verificada empregando combinações de condições básicas e alternativas apresentadas em 3.10. A rusticidade do método está expressa nas recuperações obtidas nas oito condições elaboradas (Tabela 15) e na individualização da influência dos fatores isolados (Tabela 16).

Tabela 15 - Recuperações e coeficientes de variação da moniliformina no teste de rusticidade utilizando diferentes combinações de fatores.

CONDIÇÃO	RECUPERAÇÃO (%)	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO (%)
Básica	86,3	5,12
CEFG	71,5	6,37
BDFG	68,7	3,40
BCDE	84,0	2,90
ADEG	72,5	4,22
ACDF	69,3	3,30
ABEF	70,5	6,20
ABCG	81,0	5,70

Tabela 16 - Individualização da influência das condições avaliadas no teste de rusticidade.

CONDIÇÃO ALTERNATIVA	MÉDIA X ^a	MÉDIA Y ^b	DIFERENÇA CALCULADA ^c
A	73,33	74,73	-1,40
B	76,05	71,10	4,95
C	76,45	70,57	5,88
D	73,63	75,33	-1,70
E	74,63	73,00	1,63
F	70,00	79,17	-9,17
G	73,43	74,60	-1,17

a - Média das recuperações relativas a ensaios que possuem condição alternativa em comum.

b - Média dos resultados não incluídos na média X.

c - Subtração da Média Y da Média X

Agrupando as variáveis em ordem decrescente de influência, podemos verificar que $F > C > B > D > E > A > G$. Portanto, o emprego de temperatura de 55°C na secagem do extrato influi significativamente na recuperação do método. Nesta condição, ocorre provavelmente degradação da toxina, concordando com o relato de que o aquecimento da toxina a 50 °C produz perdas de 23 a 32 % (SCOTT et alii, 1987b). O volume de hexano empregado na segunda partição foi o segundo maior fator em importância, indicando a necessidade de estipular a quantidade exata de hexano a ser utilizado. Situação semelhante temos com relação ao volume de solvente extrator.

O emprego de hexano com características menos apolares (Synth) evidenciou a necessidade de padronização do solvente a ser utilizado, ou seja, a pouca tolerância do método a solventes de qualidade variável. Os demais fatores influenciaram menos na recuperação do método. Atenção especial deve ser dada ao fator tempo de espera após extração e limpeza antes da injeção no cromatógrafo, pois a espera de 24 horas pouco influenciou, indicando que, caso necessário, o extrato seco pode aguardar injeção no cromatógrafo sem significativa perda de toxina.

4.5.2 Teste de Recuperação

4.5.2.1 Resultados

Os valores de recuperação obtidos para moniliformina em amostras fortificadas em sete níveis diferentes empregando o método proposto são apresentados na Tabela 17.

A recuperação média obtida na faixa de 4,50 a 0,57 $\mu\text{g/g}$ foi de 83,9 %, sendo a menor recuperação de 74,5 % a 0,98 $\mu\text{g/g}$ e a maior de 89,2 % a 1,40 $\mu\text{g/g}$. Comparando a média da recuperação obtida (83,9 %) com as médias apresentadas na literatura, verificou-se que o método proposto demonstrou melhor recuperação média que a relatada por SCOTT et alii (1987b) que obteve uma média de 80,8 % e também melhor que a recuperação média de 70,5 % encontrada por SHEPHERD & GILBERT (1986). Por outro lado, o valor médio de 88,5 % relatado por SHARMAN et alii (1991) foi maior que o valor obtido no presente trabalho.

Tabela 17 - Níveis de contaminação utilizados para os testes de recuperação do método proposto

NÍVEIS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/g}$)	RECUPERAÇÃO (%)	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO (%)
1	4,50	84,0	4,30
2	3,38	86,1	3,20
3	2,52	80,7	4,80
4	1,97	85,4	4,10
5	1,40	89,2	6,12
6	0,98	87,4	4,20
7	0,57	74,5	6,78
8	0,0	nd ^a	

a - Não detectado

4.5.2.2 Tratamento estatístico

A partir dos resultados obtidos na recuperação da moniliformina em sete níveis diferentes, foram calculados a dispersão e os desvios individuais conforme o procedimento proposto por WERNIMONT (1985). A dispersão e os desvios individuais dos resultados foram pequenos, conforme o que se pode verificar na Figura 13.

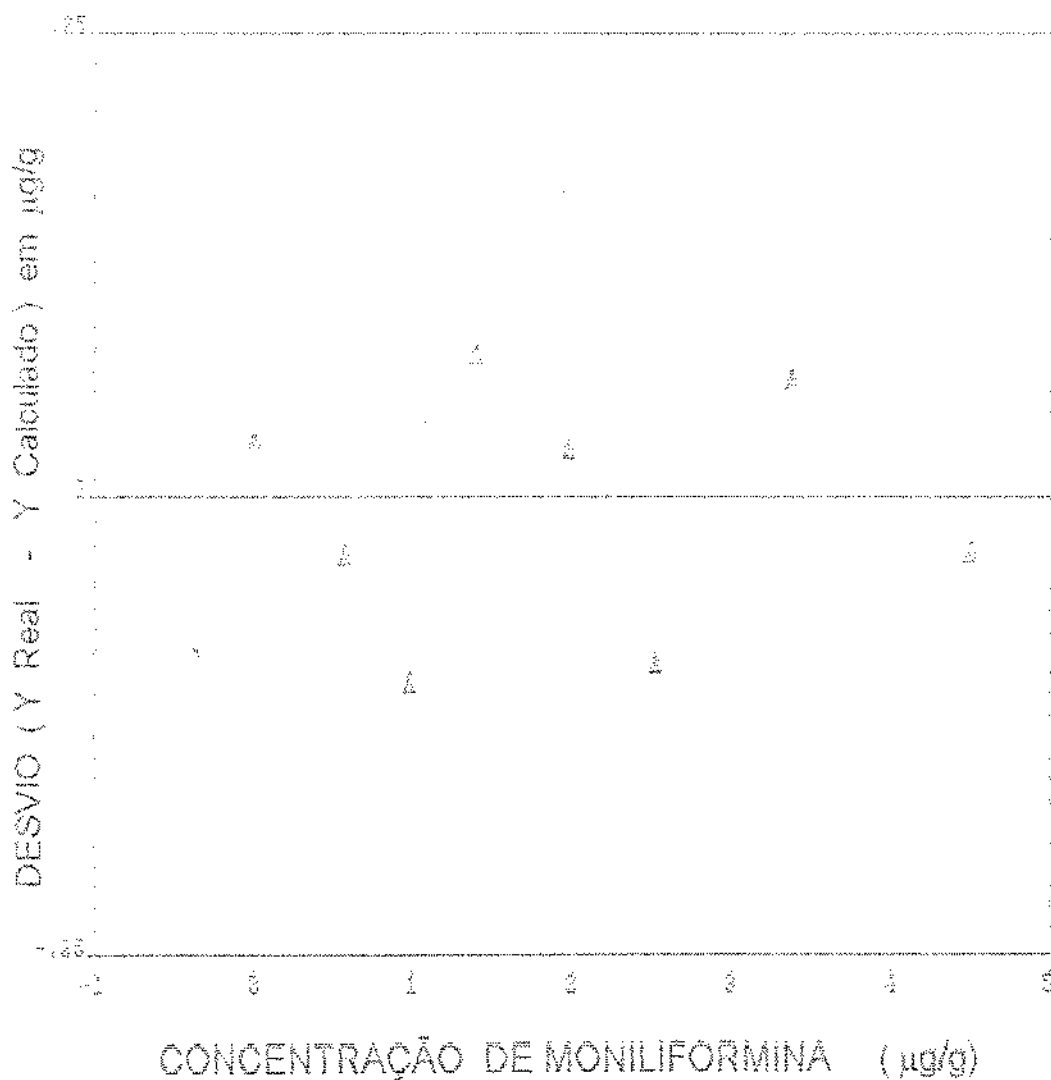


Figura 13 - Dispersão e desvios individuais da recuperação da moniliformina.

4.5.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção da moniliformina pelo método proposto foi encontrado pela redução sucessiva da quantidade de toxina adicionada ao milho até a concentração de 0,33 $\mu\text{g/g}$. Comparando-se o valor obtido com os valores encontrados na literatura verifica-se que de sete metodologias para CLAE, quatro (SCOTT et alii, 1987b; SHEPHERD & GILBERT, 1986; SHARMAN et alii, 1991) são mais sensíveis que o método proposto e três (THIEL et alii, 1982; RABIE et alii, 1982; FARBER et alii, 1988) são menos sensíveis. O limite de 0,33 $\mu\text{g/g}$ é três vezes menos sensível que o método desenvolvido por SCOTT et alii (1987b) que apresentou valor de 0,11 $\mu\text{g/g}$ com fase móvel contendo acetonitrilo e com detector a 254 nm; 1,83 vezes menor que o valor obtido de 0,18 $\mu\text{g/g}$, por SCOTT et alii (1987b) empregando metanol na fase móvel; e 3,3 vezes menor que o limite obtido por SHEPHERD & GILBERT, 1986. O método mais sensível (SHARMAN et alii, 1991), possui limite de detecção de 0,05 $\mu\text{g/g}$,

4.5.3 Teste de repetibilidade

Uma amostra fortificada com 1,97 $\mu\text{g/g}$ foi analisada em triplicata. Os valores obtidos para verificação da repetibilidade, expressos como coeficientes de variação para o método desenvolvido são: CV= 3,7 %, CV= 4,3 % e CV= 6,1 %. O coeficiente de variação médio de 4,7 % é melhor que o valor relatado por SHARMAN et alii (1991) que foi de 7,6 e 8,7 %, indicando uma boa precisão intralaboratorial.

4.5.4 Curva Padrão

A curva de calibração foi elaborada segundo WERNIMONT (1985), utilizando-se sete soluções aquosas de moniliformina de concentrações variadas. Foram realizadas três injeções de cada um dos sete níveis e calculados os seus coeficientes de variação. A figura 14 mostra a curva de calibração onde os valores de área são resultados médios de três injeções de cada um dos níveis. O coeficiente de variação médio obtido das injeções foi de 4,14 %, com extremos de 2,39 e 5,41%.

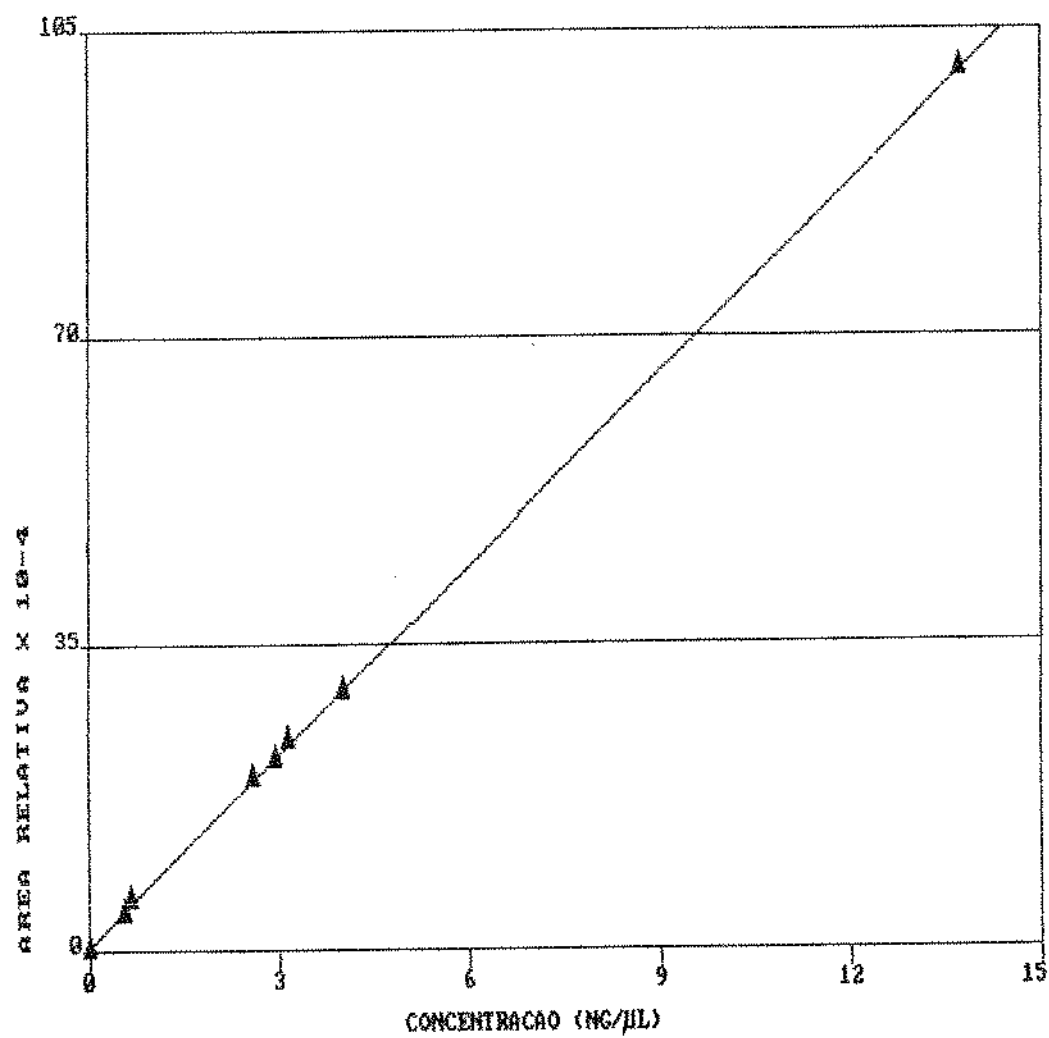


Figura 14 - Curva padrão da moniliformina. $CV_{\text{médio}} = 4,14\%$ ($n=3$)

4.5.5 Análise de custo

O custo médio do método proposto foi comparado com o custo médio da análise de uma amostra de milho pelo método desenvolvido por SCOTT et alii (1987b). O custo médio da metodologia proposta por análise foi de CR\$ 550,00 (US\$ 1,13) por amostra. O custo médio por amostra de uma análise pelo método de SCOTT et alii (1987b) foi de CR\$ 4.781,00 (US\$ 9,81). O método desenvolvido mostrou um custo menor, que pode ser explicado pelo fato do método de SCOTT et alii (1987b) empregar colunas Sep-Pak na limpeza do extrato.

4.6 Incidência de moniliformina em milho

O milho tem sido o cereal mais implicado em contaminação por espécies de *Fusarium*. Análises microbiológicas em amostras de milho de diversos países têm indicado a presença de *Fusarium moniliforme* em grande número de amostras (MARASAS et alii, 1979; 1981; BLANEY et alii, 1986; MUÑOZ et alii, 1990; HUSSEIN et alii, 1991).

No Brasil, a ocorrência de espécies de *Fusarium* em grãos foi relatada por vários pesquisadores (RIET-CORREA et alii, 1982; LASCA et alii, 1983; MENDEZ et alii, 1989; HIROOKA et alii, 1988; FURLONG, 1992). De especial interesse é a ocorrência de espécies de *Fusarium* e principalmente de *Fusarium moniliforme* em amostras de milho suspeitas de causar leucoencefalomalacia em equinos no Estado do Paraná relatada por HIROOKA et alii (1989). Uma incidência de 0 - 16 % de *Fusarium moniliforme* foi encontrada em vinte amostras de trigo recém colhido no Estado de São Paulo (FURLONG, 1992). A ocorrência desses microorganismos em grãos, e inclusive milho, indicaram a necessidade de investigar a possível presença de moniliformina em nossos cereais, mais especificamente no milho.

4.6.1 Incidência de moniliformina em milho recém colhido, produzido no Estado de São Paulo.

Nesta etapa, dois grupos de amostras foram analisadas: (a) quatro amostras de milho recém colhido em campos experimentais, fornecidas pelo Instituto

Agrônomo de Campinas (Tabela 2), (b) dezoito amostras de milho comercial recém colhido, provenientes de diferentes localidades do Estado de São Paulo (Tabela 3).

As amostras do segundo grupo foram analisadas quanto ao grau de infecção por *Fusarium* na Seção de Armazenamento do Instituto de Tecnologia de Alimentos, empregando-se dois meios de cultura diferentes: DRBC (KING et alii, 1979) e DG18 (HOCKING & PITT, 1980). O grau de infecção das amostras por *Fusarium* sp variou entre 14 e 78 % (Tabela 3).

A análise das amostras dos dois grupos foi conduzida por cromatografia líquida utilizando-se o método proposto. Não foi detectada moniliformina nas 22 amostras analisadas. A ausência de moniliformina nas amostras naturalmente contaminadas por espécies de *Fusarium* pode ocorrer, pois é possível isolados fúngicos produzirem a toxina em cultura, mas não no grão (MARASAS et alii, 1979; RABIE et alii, 1982; VESONDER, 1986). Além disso as cepas presentes podem não ser necessariamente toxigênicas. As vinte e duas amostras foram examinadas em nosso laboratório quanto à presença de aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina e esterigmatocistina, pelo método de SOARES-AMAYA (1989), não tendo sido detectada a presença dessas toxinas nas amostras.

4.6.2 Incidência de moniliformina em amostras de fubá, milho de pipoca e milho canjica comercializados na cidade de Campinas-SP.

A distribuição das amostras de milho e produtos derivados em relação às marcas estão apresentadas na Tabela 4. As 68 amostras adquiridas em mercados na cidade de Campinas-SP foram pesquisadas para moniliformina, empregando-se o método proposto, por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados obtidos foram negativos.

5.0 Conclusões

Foi desenvolvida uma metodologia para determinação de moniliformina em milho, por CLAE, de baixo custo e de fácil aplicação em laboratórios nacionais. O seu baixo custo pode ser atribuído à substituição de etapas de limpeza do extrato, que em vez das colunas de fase reversa C_{18} encontradas em outros métodos, utiliza partições do extrato com hexano e ressuspensão do resíduo evaporado com água. A recuperação média obtida (83,9 %), assim como o coeficiente de variação médio (4,7 %) e o limite de detecção (0,33 $\mu\text{g/g}$) fornecem indicadores da aplicabilidade do método.

Foram investigadas reações de derivação com a finalidade de confirmar a identidade da toxina. A reação de metilação catalizada por trifluoreto de boro mostrou-se adequada e de fácil execução a nível de bancada. A reação proposta preenche uma lacuna a nível internacional, onde confirmação da moniliformina diretamente em CLAE não é realizada em cromatógrafos que não disponham de detectores com arranjo de diodos.

Foi constatada a ausência de moniliformina em 18 amostras de milho recém colhido em uma amostragem realizada em todo o Estado de São Paulo em 1992. Em outro levantamento, em amostras de fubá, milho de pipoca e milho canjica comercializados na cidade de Campinas-SP em 1993, não foi detectada moniliformina em nenhuma das 68 amostras analisadas. Quatro amostras de milho provenientes de campos experimentais foram também examinadas com resultados negativos. O volume dos dados coletados forneceu uma segura indicação de que a moniliformina não é um problema para o milho plantado ou comercializado no Estado de São Paulo.

6.0 Referências Bibliográficas

1. A.O.A.C. **Official Methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. cap. 49 (970.44) 15 ed. Arlington, 1990. v.2 p. 1184-1223.
2. ALLEN, N.K.; BURMEISTER, H.R.; WEAVER, G. A.; MIROCHA, C.J. Toxicity of dietary and intravenously administered moniliformin to broiler chickens. **Poultry Science**, 60:1416-1417 , 1981.
3. ABBAS, H. K. ; MIROCHA, C. J.; SHIER, W. T. Mycotoxins produced from fungi isolated from foodstuffs and soil: comparison of toxicity in fibroblasts and rat feeding tests. **Applied and Environmental Microbiology** . 48(3) 654-661, 1984.
4. BOSCH, U.; MIROCHA, C.J.; ABBAS, H.K.; MENNA, M. Toxicity and toxin production by *Fusarium* isolates from New Zealand. **Mycopathologia**. 108 : 73-79 , 1989.
5. BOTTALICO, A.; VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; Production of moniliformin by *Fusarium* species, in Italy. **Phytopathol. Mediterr.** 21: 105-106 , 1982.
6. BOTTALICO, A.; LERARIO, P.; VISCONTI, A., Production of zearealone, trichothecenes and moniliformin by *Fusarium* species from cereals, in Italy. **Dev. Food Sci.** 7: 199-208 , 1984.
7. BLANEY, B.J.; RAMSEY, A.; TYLER, A. L . Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested durin 1983 in far North Queensland. **Aust. J. Agric. Res** 37: 235-244 , 1986.
8. BURMEISTER, H. R.; CIEGLER, A., VESONDER, R. F. Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL 6322: Purification and toxicity. **Appl. Env. Micr.** 37(1) 11-13, 1979.
9. BURMEISTER, H. R.; VESONDE, R. F. ; KWOLEK, W.F. Mouse bioassay for *Fusarium* metabolites: Rejection or acceptance when dissolved in drinking water. **App. Env. Micr.** 39(5): 957-961, 1980a.

10. BURMEISTER, H.R.; GROVE, M.D.; KWOLEK, W.F. Moniliformin and butenolide: Effect on mice of high-level long-term oral intake. **Appl. Env. Micr.** 40 (12): 1142-1144, 1980b.
11. COLE, R. J.; COX, R. H. Fusarium toxins in **Hand book of toxic fungal metabolites** 20, 893-910, 1981.
12. COLE, R. J.; KIRKSEY, I. W.; CUTLER, H. G. ; DOUPNIK, B. L.; PECKHAM, J. C. Toxin from *Fusarium moniliforme* : Effects on plants and animals. **Science** 179: 1324-1326, 1973.
13. COOKE, N. H. C.; VIAVATTENE, R. L., EKSTEEN, R.; WONG, W. S.; DAVIES, G.; KARGER, B. L. Use of metal ions for seletive separations in high-performance liquid chromatography . **J. Chromatography**, 149 : 391-415, 1978.
14. FARBER J. M.; SANDERS, G. W.; LAWRENCE, G. A.; SCOTT, P. M. Production of moniliformin by Canadian isolates of *Fusarium*. **Mycopatologia** 101 : 187-190 1988.
15. FURLONG, E.B. Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo. **Tese de doutorado** 139p, 1992.
16. GATHERCOLE, P. S.; THIEL, P. G.; HOFMEYER, J. H. S. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex by moniliformin. **Biochem J.** 233: 719-723, 1986.
17. HENRY, A.R.; SCHMIT, J.A.; DIECKMAN, J.F. The analysis of steroids and derivatized steroids by high speed liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, 9: 513-520, 1971.
18. HIROOKA, E. Y.; VIOTTI, N. M. A.; SOARES, L. M. V.; ALFIERI, A. A. Intoxicação em equinos por micotoxinas produzidas por *Fusarium moniliforme* no Norte do Paraná. **Semina**. 9(3): 128-135, 1988.

19. HOCKING, A. D.; PITT, J. I., Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Appl. Env. Micr.** 39(3): 488-492 , 1980.
20. HUSSEIN, M. H.; BAXTER, M.; ANDREW, I. G.; FRANICH, R. A. Mycotoxin production by *Fusarium* species from New Zealand maize fields. **Mycopathologia.** 111: 35-40 , 1991.
21. JANSEN, C.; DOSE, K., Quantitative determination of moniliformin in vegetable foods and feeds. **Fresenius Z. Anal. Chem.** 319: 60-62 , 1984.
22. KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; YASUDA, K.; SAITO, K.; IBE, A.; NAGAYAMA, T.; USHIYAMA, H.; NAOI, Y. Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs **J.Assoc. Off. Anal. Chem** 64(5): 1067-1073, 1981.
23. KING, A. D. J.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Rose Bengal Medium for Enumeration and isolation of molds from foods. **Appl. Env. Micr.** 37(5) : 959-964 , 1979.
24. KNOX, J. H.; LAIRD, G. R. Soap chromatography - A new high-performance liquid chromatographic technique for separation of ionizable materials. **J. of Chromatography**, 122: 17-34 , 1976.
25. KNOX, J. H.; JURAND, J. Separation of catecholamines and their metabolites by adsorption, ion-pair and soap chromatography. **J. of Chromatography.** 125: 89-101 1976.
26. KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O.; STEYN, P. S.; VAN RENSBURG, S. J.; STEYN, M. Toxicity of a moniliformin - producing strain of *Fusarium moniliforme* var subglutinans isolated from maize. **Food Cosmet. Toxicol.** 15 : 579-587 , 1977.
27. KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Hepato and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. Moniliforme*) isolates from Southern African maize. **Food Cosmetic Toxicol.** 19: 447-456 , 1981.

28. LASCA, C. E.; VECHIATO, M. H.; VALARINI, P. J. Detecção e identificação de fungos em sementes de sorgo (*Sorghum sp*) produzidas no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.** 53 (1/4): 47-54 , 1986.
29. LAWPRECHT, S.C.; MARASAS, W.F.O.; THIEL,P.G.; SCHNEIDER,D.J.; KNOX-DAVIES,P.S. Incidence and toxigenicity of seedborne *Fusarium* species from Annual Medicago species in South Africa. **Phytopathology** 76(10): 1040-1042 , 1986.
30. LAWRENCE,J.F.; FREI, R.W. Chemical derivatization in liquid chromatography. 1ed. New York, v.7 212p. 1976.
31. MACRAE, R **HPLC in food analysis.** Academic Press. London, 1982 , 342p.
32. MARASAS, W.F.O.; KRIEK, N.P.J.; WIGGINS,V.M.; STEYN, P.S.; TOWERS, D. K.; HASTIE, T.J. Incidence, geographic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. **Phytopathology.** 69(11) 1181-1185 , 1979.
33. MARASAS, W.F.O.; WEHNER, F.C.; RENSBURG, S.J.V.; SCHALKWYK, D.J.V. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer in Transkei, Southern Africa. **Phytopathology.** 71(8):792-796 , 1981.
34. MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; RABIE, C.J.; NELSON, P.E.; TOUSSON,T.A. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. **Mycologia.** 78(2):242-247 1986.
35. MENDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERREIRA, L. M., MEIRELES, S. M. Relatório do laboratório regional de diagnósticos. Doenças diagnosticadas no ano de 1989. Pelotas, Univ. Fed. Pelotas, Fac. de Veterinária, 1989.
36. MUÑOZ, L. ; CARDELLE, M.; PEREIRO, M.; RIGUERA, R. Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (Northwest Spain). **J. Agric. Food Chem.** 38(4): 1004-1006 , 1990.

37. POOLE, F. C.; SCHUETTE, S.A. Contemporary practice of chromatography. 1ed. New York, 708p. 1984.
38. RABIE, C. J., LUBBEN, A.; LOUW, A. I.; RATHBONE, E. B.; STEYN, P. S.; VLEGAAR, R. Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioides*. **J. Agric. Food Chem.** 26 : 375-379 , 1978.
39. RABIE, C.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; LUBBEN, A.; VLEGAAR, R. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. **Appl. Env. Micr.** 43(3): 517-521 , 1982.
40. RIET-CORREA, F.; MEIRELLES, M. A.; SOARES, J. M., MACHADO, A. E.; ZANBRANO, A. F. Leucoencefalomálcia em equinos associada a ingestão de milho mofado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2(1): 27-30 , 1982.
41. SABINO, M.; AMAYA, D. R. Mycotoxin Research in Brazil. **Ciência e Cultura** (no prelo), 1994.
42. SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A.; MATULA, T. I. Analysis of toxins of *Fusarium moniliforme* . in **Mycotoxins and Phicotoxins** , Amsterdam, 305-316, 1986.
43. SCOTT, P. M.; ABBAS, H. K.; MIROCHA, C. J.; LAWRENCE, G. A.; WEBER, D. Formation of moniliformin by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium culmorum*. **Appl. Env. Micr.** 53(1): 196-197 , 1987a.
44. SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A. Liquid chromatographic determination and stability of the *Fusarium* mycotoxin moniliformin in cereal grains. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 70 (5) : 850-853 , 1987b.
45. SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P. Some aspects of ion-exchange chromatography employing adsorbed ion exchangers on reversed-phase columns. **J. of Chromatography**, 175: 51-63 , 1979.

46. SHARMAN, M.; GILBERT, J.; CHELKOWSKI, J. A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. **Food Add. Contam.** 8(4): 459-466 , 1991.
47. SHEPHERD, M. J.; GILBERT, J. Method for the analysis in maize of the *Fusarium* mycotoxin moniliformin employing ion-pairing extraction and high-performance liquid chromatography. **J. of Chromatography.** 358: 415-422 , 1986.
48. SOARES, L. M. V.; AMAYA, D. B. R. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 68(6) 1128-1130 , 1985.
49. SPRINGER, J. P.; CLARDY, J.; COLE, R. J.; KIRKLEY, J. W.; HILL, R. K.; CARLSON, R. M.; ISIDOR, J. L. Struture and synthesis of moniliformin a novel cyclobutane microbial toxin. **J. Am. Soc.** 96 : 2267-2268, 1974.
50. STACK, M. E.; MISLIVEC, P.B.; ROACH, J.A. G.; POHLAND, A. E. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. **Assoc. Off. Anal. Chem.** 68 (4) 640-642 ,1985.
51. STEYN, M.; THIEL, P. G.; SCHALKWYK, G.C Isolation and purification of moniliformin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 61(3): 578-580 , 1978.
52. THALMANN, V. A.; MATZENAUER, S.; GRUBER-SCHLEY, S. Surve on the occurrence of fusariotoxins in cereals. **Ber-Landwirtsch.** 63: 257-272 , 1985.
53. THIEL, P. G. A molecular mechanism for the toxic action of moniliformin, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* **Biochemical Pharmacology.** 27: 483-486 , 1978.
54. THIEL, P. G.; MEYER, C. J.; MARASAS, W. F. O. Natural occurrence of moniliformin together with deoxynivalenol and zearalenone in Transkeian corn **J. Agric. Food Chem** 30 : 308-312, 1982.

55. THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A.; MARASA, W. F. O.; NELSON, P. E.; WILSON, T. M. Natural occurrence of moniliformin and fusarin C in corn screenings known to be hepatocarcinogenic in rats. **J. Agric. Food Chem.** 34 (5) 773-775, 1986.
56. THRANE, U. Metabolites of *Fusarium*. in Chelkowski, J. **Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity**. Elsevier, Amsterdam p. 199-225, 1989.
57. UENO, Y.; SHIMADA, N.; Reconfirmation of the specific nature of reticulocytes bioassay system to trichotec mycotoxins of *Fusarium* spp. **Chem. Pharm. Bull.** 22(11): 2744-2746, 1974.
58. UENO, Y.; **Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects**. Elsevier, 313 p., 1983.
59. URANO, T.; TRUCKNESS, M. W.; MATUSIK, J. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. **J. A. O.A.C International**, 75 (2) 319-322, 1992.
60. VESONDER, R. F. Moniliformin produced by cultures of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolated from swine feed. **Mycopathologia**. 95: 149-153, 1986.
61. WEHNER, F. C.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Lack of mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Fusarium* mycotoxins. **Appl. Envir. Microbiol.** 35: 659-662 1978.
62. WERNIMONT, G. T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. Arlington. Association Official Analytical Chemists, 1985. 183 p.
63. ZANETTA, J. P.; VINCENDON, G.; MANDEL, P.; GOMBOS, G. The utilisation of 1- dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl chloride for quantitative determination of free amino acids and partial analysis of primary structure of proteins. **J. of Chromatography**. 51: 441-458, 1970.