

Determinação de fumonisina B₁ por CLAE: estudo da estabilidade do derivado fumonisina B₁-*ortho*-ftaldialdeído

Determination of fumonisin B₁ by HPLC: stability study of the fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative

RIALA6/1488

Mateus Henrique PETRARCA*, Elizeu Antonio ROSSI, Célia Maria de SYLOS

*Endereço para correspondência: Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", CP 502, Rodovia Araraquara – Jaú Km 1, Araraquara, SP, Brasil, CEP: 14801-902. E-mail: mateuspetarca@ig.com.br

Recebido: 14.03.2012 – Aceito para publicação: 16.08.2012

RESUMO

Este estudo avaliou a estabilidade do derivado fumonisina B₁-*ortho*-ftaldialdeído sob diferentes condições de pH, tempo e temperatura, durante a reação de derivatização e as análises cromatográficas. Na derivatização, a máxima fluorescência emitida pelo derivado foi obtida empregando-se a solução de tetraborato de sódio 0,1 M em pH 9,0, e esta não diferiu significativamente das emitidas em pH 8,0, 8,5, 9,5 e 10,0. Em 2 minutos de reação, obteve-se a máxima fluorescência, e esta não diferiu significativamente das emitidas em 4, 6 e 8 minutos de reação. A variação de 0,5 unidade no pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, empregada como fase móvel, influenciou significativamente na separação cromatográfica e na detecção do derivado fumonisina B₁-*ortho*-ftaldialdeído; em pH entre 3,3 e 3,8, obtiveram-se as maiores intensidades de fluorescência. O aumento na temperatura da coluna cromatográfica resultou na redução de intensidade da fluorescência. O derivado fumonisina B₁-*ortho*-ftaldialdeído manteve-se estável entre 20 e 27 °C. A 30 °C, houve redução significativa em 26,5% na intensidade da fluorescência emitida pelo derivado.

Palavras-chave. fumonisina B₁, *ortho*-ftaldialdeído, estabilidade, CLAE, derivatização pré-coluna.

ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the stability of fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative under different conditions of pH, time and temperature, during the derivatization reaction and chromatographic analysis. In the derivatization, the maximum fluorescence emitted by the derivative product was obtained employing a 0.1 M sodium tetraborate solution at pH 9.0, and this did not differ significantly from those emitted at pH 8.0, 8.5, 9.5 and 10.0. Within 2 minutes of reaction, the maximum fluorescence was observed and no significant difference was found when compared with those emitted at 4, 6 and 8 minutes of reaction. The 0.5 unit variation in the pH of 0.1 M sodium phosphate buffer solution, which was used as mobile phase, caused a significant effect on the chromatographic separation and on the fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative detection. The highest fluorescence intensities were found at pH from 3.3 to 3.8. Reduction in the fluorescence intensity was caused by increasing the chromatographic column temperature. The fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative remained stable from 20 °C to 27 °C. At 30 °C, it was found a significant reduction in 26.5% in the fluorescence intensity emitted by the derivative product.

Keywords. fumonisin B₁, *ortho*-phthaldialdehyde, stability, HPLC, precolumn derivatization.

INTRODUÇÃO

As fumonisinas são metabólitos secundários produzidos, principalmente, por fungos filamentosos das espécies *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, isoladas pela primeira vez de cultivos de *Fusarium moniliforme* Sheldon MCR 826 obtidos de milho, e sua estrutura química foi reportada em 1988 por Bezuidenhout e colaboradores^{1,2}.

O primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisina B₁ em alimento foi em 1990 por Sydenham e colaboradores, em milho de uma região da África do Sul com alta incidência de câncer esofágico, e os níveis detectados variaram de 44 a 83 µg.g⁻¹³. Desde então, em diferentes regiões do mundo, tem-se reportado a ocorrência de fumonisina B₁ em alimentos e bebidas, como arroz⁴, aspargo e alho⁵, cevada⁶, cervejas⁷, figos secos⁸, leite⁹ e, principalmente, em milho e seus derivados^{10,11}.

A International Agency for Research on Cancer (IARC) classificou a fumonisina B₁ como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica aos seres humanos¹². O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que a fumonisina B₁ intervém na biossíntese dos esfingolípídios, em função de sua similaridade estrutural com a esfingosina e a esfinganina¹³.

A incidência de câncer esofágico na África do Sul¹⁴, China¹⁵, Itália¹⁶ e Irã¹⁷, e anormalidades no tubo neural na fronteira México-Texas¹⁸, estariam associadas à ocorrência de fumonisina B₁ em altos níveis na dieta dessas populações.

Assim, muitos estudos têm reportado o interesse em avaliar os níveis em que essas micotoxinas ocorrem nos alimentos. Para isso, diferentes técnicas analíticas, como cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e eletroforese capilar, e métodos imunológicos como ELISA, têm sido empregados na detecção e quantificação das fumonisinas nos alimentos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência a técnica mais utilizada, em função de sua alta sensibilidade e baixo limite de detecção^{19,20}.

A presença de grupos carboxílicos e hidroxilas na estrutura da fumonisina B₁ a caracteriza como molécula polar, solúvel em água e solventes orgânicos como metanol e acetonitrila²⁰. No entanto, as fumonisinas B₁ não apresentam nenhum grupo cromóforo em sua

molécula, portanto, não absorvem radiação ultravioleta e visível, e não apresentam fluorescência. Assim, torna-se imprescindível a reação de derivatização para sua determinação por CLAE com detecção de fluorescência^{19,20}.

Diferentes reagentes derivatizantes têm sido empregados na determinação de fumonisina B₁, como 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F)²¹, 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC)²², naftaleno-2-3-dicarboxialdeído (NDA)²³ e 6-amino-quinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ.Fluor)²⁴. No entanto, o orto-ftaldialdeído (OPA) é o principal reagente utilizado na reação de derivatização pré-coluna da fumonisina B₁^{19,20,25}.

Uma vez que fumonisina B₁ apresenta caráter polar, permite-se sua separação por cromatografia em fase reversa. Os principais solventes utilizados como fase móvel são acetonitrila, água, metanol, solução de ácido acético, tampão acetato e tampão fosfato, em diferentes combinações e proporções, em eluição isocrática ou gradiente¹⁹.

As fases estacionárias geralmente empregadas para a separação de fumonisina B₁ por CLAE são C₁₈ ou C₈, e as colunas variam entre 100 e 300 mm de comprimento, de 3,2 a 4,6 mm de diâmetro interno, e partículas de 2,5 a 10 µm de tamanho. De acordo com cada autor, observa-se variação também no volume de injeção no sistema cromatográfico, de 10 a 50 µL, e no fluxo da fase móvel, de 0,5 a 1,5 mL.min⁻¹, sendo os mais empregados de 10 µL e 1 mL.min⁻¹, respectivamente^{19,25}.

Considerando a relevância dos estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ em alimentos, é fundamental que as condições da reação de derivatização e das análises cromatográficas sejam controladas, a fim de obterem-se resultados analíticos precisos e exatos da contaminação do alimento por fumonisina B₁. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído sob diferentes condições de pH, tempo e temperatura, durante a reação de derivatização e as análises cromatográficas.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrão e reagentes

O padrão de fumonisina B₁ (98% de pureza) e o reagente de derivatização orto-ftaldialdeído (OPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila e metanol, grau CLAE, foram adquiridos

da J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, EUA). Ácido fosfórico e tetraborato de sódio foram adquiridos da LabSynth (Diadema, SP, Brasil); fosfato monossódico 1-hidrato, da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); 2-mercaptoetanol da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); e ácido bórico da Qhemis (Indaiatuba, SP, Brasil). A água utilizada nas análises foi obtida por meio de sistema de ultra-purificação MilliQ system (Millipore, Milford, MA, EUA).

Solução padrão de fumonisina B₁

O padrão de fumonisina B₁ (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila:água (1:1, v/v) obtendo uma solução estoque de 1.000 µg.mL⁻¹, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC)²⁶. A partir dessa solução, preparou-se a solução trabalho de 20 µg.mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, e estocadas à -18 °C.

Derivatização

A reação de derivatização pré-coluna foi de acordo com a AOAC²⁶. O reagente de derivatização foi preparado empregando-se 40 mg de OPA, este dissolvido em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M e então adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente foi estocado em frasco âmbar, protegido da luz e em temperatura ambiente, por no máximo uma semana.

Alíquota de 225 µL do reagente de derivatização foi adicionada a um *vial* de 1,5 mL contendo 25 µL de solução padrão de fumonisina B₁, e então mantidos em banho de ultrassom por 30 segundos em temperatura ambiente e protegidos da luz, previamente à injeção no cromatógrafo a líquido.

Análise cromatográfica

Na separação, detecção e quantificação de fumonisina B₁, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Quioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de fluorescência RF 10A XL em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), injetor automático SIL 10A e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 × 4,6 mm d.i.; partículas de 5 µm) (Thermo, Reino Unido). A fase móvel empregada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M na proporção 44:56, respectivamente, em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL.min⁻¹; e volume da injeção de 10 µL.

Influência do pH, tempo e temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-ortofaldialdeído

Reação de derivatização

- pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

Avaliou-se a influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M empregada no preparo do reagente de derivatização sobre a estabilidade do derivado. Prepararam-se diferentes soluções de tetraborato de sódio 0,1 M, cujo pH foi ajustado com ácido bórico 5 M entre 4,0 e 12,0. Dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL⁻¹ de fumonisina B₁, temperatura da coluna cromatográfica de 20 °C e fase móvel acetonitrila:tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3.

- Tempo da reação de derivatização

O tempo da reação de derivatização, entre o instante que foi adicionado o reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁ até o momento da injeção no cromatógrafo, foi avaliado entre 2 e 15 minutos. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL⁻¹ de fumonisina B₁ e solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante. A temperatura da coluna cromatográfica manteve-se em 20 °C, e a fase móvel utilizada foi acetonitrila:tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3.

Análise cromatográfica

- pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M

Na avaliação do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M empregada como um dos componentes da fase móvel, prepararam-se diferentes soluções tampão fosfato de sódio 0,1 M, cujo pH foi ajustado com ácido fosfórico entre 2,3 e 4,8. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL⁻¹ de fumonisina B₁. No preparo do reagente derivatizante, utilizou-se solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 e, dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. A temperatura da coluna cromatográfica manteve-se em 20 °C.

- Temperatura da coluna cromatográfica

A influência da temperatura da coluna sobre a estabilidade do derivado foi avaliada. Para isso,

foram empregadas solução padrão de 0,25 µg.mL⁻¹ de fumonisina B₁ e solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante. Dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3, e variou-se a temperatura da coluna cromatográfica entre 20 e 30 °C.

Análise dos dados

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (%), atribuindo o valor máximo à maior área do pico cromatográfico obtida. A variação na intensidade foi empregada como indicador da estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído²⁷. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%, empregando o *software* Origin 7.0 (2000).

Descontaminação do material

Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por, pelo menos, 12 h antes de ser descartado, seguido de acetona e lavagem com água²⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reação de derivatização

Influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

No presente estudo, optou-se pelo emprego do derivatizante OPA por tratar-se de uma reação rápida, fácil e reprodutível em temperatura ambiente, e ser aceito pela AOAC e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). A reação ocorre entre orto-ftaldialdeído e o grupo amina primária da fumonisina B₁, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol, em meio alcalino, resultando na formação de derivado fluorescente^{19,25,29-31}.

No preparo do reagente derivatizante OPA, emprega-se uma solução de tetraborato de sódio. Entretanto, existem divergências quanto ao pH dessa solução, como 8,3³² e 10,4³³, enquanto na AOAC²⁶ não é reportado o ajuste do pH da solução tetraborato de sódio. Contudo, Rice et al.³⁴, ao variarem o pH da solução de

tetraborato de sódio 0,1 M de 6,0 a 9,0, reportaram as maiores áreas dos picos cromatográficos em valores de pH entre 8,0 e 8,5, e redução significativa nas áreas em pH acima de 8,5. Assim, o presente estudo avaliou a influência do pH da solução de tetraborato de sódio sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

A Figura 1 apresenta as diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M avaliadas e a intensidade da fluorescência. Nos extremos da faixa de pH, 4,0 e entre 11,0 e 12,0, não foi possível a detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído, enquanto próximo à neutralidade, entre 5,0 e 7,0, obteve-se intensidade significativamente menor em relação ao pH 9,0.

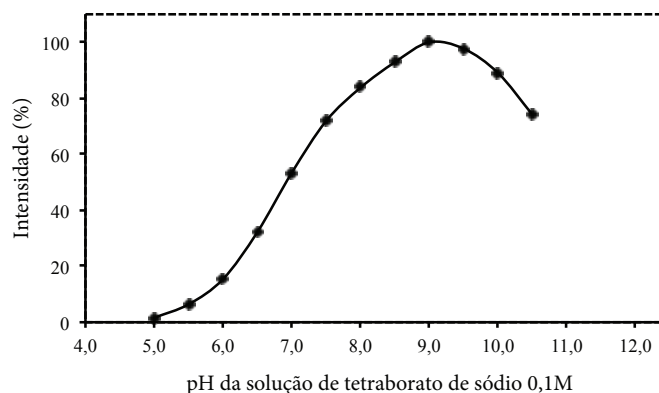


Figura 1. Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

Com o emprego da solução de tetraborato de sódio 0,1 M em pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante, obteve-se a intensidade máxima da fluorescência e baixo coeficiente de variação, 3%, não diferindo significativamente da fluorescência emitida em pH 8,0 (83,8%), 8,5 (92,9%), 9,5 (97,7%) e 10,0 (89%), indicando que o derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é estável na faixa de pH entre 8,0 e 10,0, com pH ótimo de 9,0 para a realização da reação de derivatização.

Influência do tempo da reação de derivatização

A reação de derivatização com OPA, em temperatura ambiente, resulta na formação de derivados fluorescentes, cuja intensidade da fluorescência pode decrescer minutos após a reação. Recomenda-se que o tempo de reação, entre o instante que é adicionado o reagente derivatizante à amostra até o momento da injeção no cromatógrafo, seja de 1 a 2 minutos²⁶.

Em estudo sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes tempos de reação, de 0,5 a 64 minutos, e com exposição à luz, Sydenham et al.³⁵ não observaram diferenças significativas na fluorescência até 4 minutos. No entanto, em 8 e 64 minutos de reação houve redução em 5 e 48% na fluorescência, respectivamente, em comparação à reação em 0,5 minuto, recomendando-se que as injeções no cromatógrafo devam ser realizadas dentro de 4 minutos após a adição do reagente OPA.

Thakur e Smith³⁶ reportaram que a reação de derivatização em 1 minuto foi a que resultou em intensidade máxima de fluorescência, menor variação e resultados reprodutíveis, e que o declínio na fluorescência com o aumento do tempo de reação não foi linear, no intervalo entre 0,5 e 10 minutos. Pagliuca et al.³¹ também estabeleceram o tempo máximo de 1 minuto para a reação de derivatização, pois verificaram redução em aproximadamente 15%, 20%, 20% e 40% na intensidade da fluorescência em 2, 4, 6 e 10 minutos de reação, respectivamente.

Frete aos dados apresentados, o presente estudo avaliou a influência do tempo da reação de derivatização sobre a estabilidade do derivado variando-se o tempo em 2, 4, 6, 8, 10 e 15 minutos, entre o instante que foi adicionado o reagente derivatizante à solução padrão de fumonisina B₁ até o momento de injeção no cromatógrafo.

Ao variar o tempo da reação, de 2 a 15 minutos, verificou-se uma redução significativa na fluorescência do derivado (Figura 2). Com a reação de derivatização em 2 minutos, obteve-se a máxima fluorescência, porém esta não diferiu significativamente da fluorescência emitida em 4 (98,8%), 6 (88,8%) e 8 (83,4%) minutos de reação, indicando que, em temperatura ambiente e sob proteção da luz, os derivados fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído são estáveis por até 8 minutos.

No entanto, em 10 e 15 minutos de reação, verificou-se redução em 23,3 e 37,7% na intensidade da fluorescência, respectivamente, em relação à reação em 2 minutos. Notou-se que entre 6 (88,8%) e 10 (76,7%) minutos de reação não houve variação significativa na fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

A partir da Figura 2 pode-se observar que a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é tempo-dependente, e que, após 10 minutos de reação, houve um declínio significativo na intensidade da fluorescência.

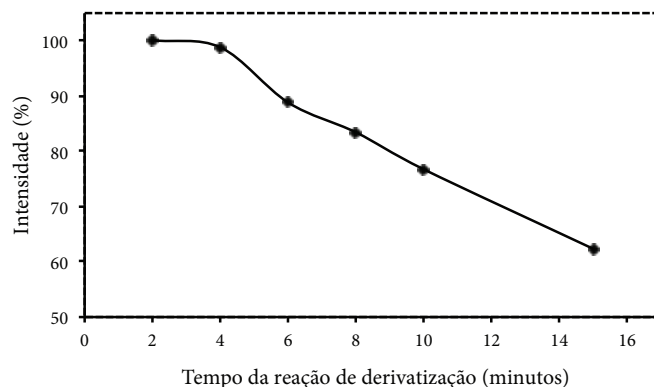


Figura 2. Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes tempos da reação de derivatização

Entretanto, alguns estudos demonstraram estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em tempos maiores de reação de derivatização. Em estudo com amostras de milho, Rice et al.³⁴ relataram que não houve diferença significativa nas áreas dos picos cromatográficos quando a reação de derivatização foi conduzida entre 2 e 40 minutos, obtendo resposta máxima do detector em 10 minutos de reação, e um declínio linear nas áreas dos picos com o aumento dos tempos de reação, até atingir 70 minutos de reação.

Williams et al.²⁷ reportaram que, em reação de derivatização à 4 °C, o derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído permaneceu estável por até 24h, demonstrando influência positiva da temperatura da reação de derivatização sobre a estabilidade dos derivados, assim sugerindo a refrigeração dos derivados por até 24h, quando não há a possibilidade da realização das injeções cromatográficas naquele momento da análise.

Variando o tempo da reação de derivatização de 1 a 60 minutos e com o mínimo de exposição à luz, Samapundo et al.³⁷ verificaram maior resposta do detector de fluorescência em 8 minutos de reação, a qual não diferiu significativamente das obtidas nos tempos de reação entre 4 e 15 minutos. Entretanto, nos extremos, entre 1 e 2 minutos, e de 30 a 60 minutos, observaram-se respostas do detector significativamente menores.

Os resultados do presente estudo, juntamente com os dados da literatura, indicam que o tempo de reação pode variar de acordo com as condições em que é realizada a derivatização, como a presença de luz e temperatura, sendo imprescindível o estabelecimento do tempo ótimo para a reação, no qual se observa a intensidade máxima da fluorescência, a fim de assegurar a reprodutibilidade do método.

Análise Cromatográfica

Influência do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M

As fumonisinas apresentam comportamento iônico em solução, e a sua separação em colunas de fase reversa envolve mecanismos tanto de fase reversa quanto de troca iônica. No entanto, em solventes neutros e não tamponados, as fumonisinas não eluem convenientemente nessas colunas, e as melhores resoluções cromatográficas são obtidas em fase móvel acidificada. Assim, na fase móvel, a solução tampão fosfato deve apresentar pH suficientemente ácido para garantir a supressão da ionização dos ácidos carboxílicos presentes na molécula de fumonisina B₁^{19,38}.

Mantendo as condições pré-estabelecidas, vazão de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 µL, e fase móvel em eluição isocrática na proporção de 44:56, não foi possível a separação do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído empregando solução tampão fosfato 0,1 M em pH 2,3. No entanto, com a variação de 0,5 unidade no valor do pH, já foi possível a separação do pico cromatográfico dos possíveis interferentes da reação de derivatização no tempo de retenção de 13,5 minutos, além da obtenção de picos cromatográficos bem definidos, ou seja, mais estreitos, sem cauda frontal e ombro (Figura 3). Porém, a intensidade da fluorescência do derivado em pH 2,8 (61,4%) foi significativamente menor que a emitida em pH 3,3.

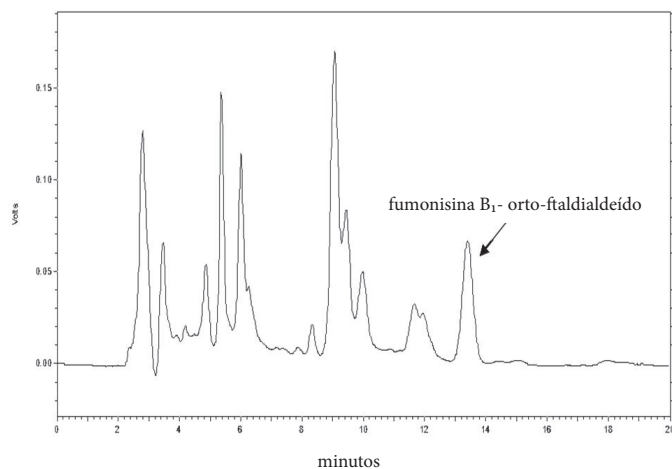


Figura 3. Cromatograma característico da separação e detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila; tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min⁻¹, temperatura da coluna: 20 °C, volume injetado: 10 µL, e coluna ODS Hypersil de 250 × 4,6 mm d.i. e partículas de 5 µm

O emprego da solução tampão fosfato de sódio em pH 3,3 resultou em máxima fluorescência e em menor coeficiente variação, 1,2%. Na análise de fumonisina B₁ em alimentos, principalmente milho e seus derivados, tem sido amplamente utilizada solução tampão fosfato de sódio, como um dos solventes da fase móvel, com pH ajustado a 3,3 ou 3,35 com ácido fosfórico^{19,26}.

A variação no pH de 3,3 a 3,8 resultou em redução de 3,7% na intensidade da fluorescência, porém não significativa. Entretanto, com a utilização na fase móvel de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M em valores de pH mais elevados (4,3 e 4,8), nas condições pré-estabelecidas, não foi possível a detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

Samapundo et al.³⁷, em estudo sobre a influência de diferentes parâmetros experimentais sobre a fluorescência do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído verificaram que o pH da fase móvel (metanol:solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, 3:1) influenciou significativamente sobre a resposta do detector. Em pH 2,85, observou-se a menor resposta do detector, enquanto no pH 3,85 a resposta do detector foi significativamente maior que em pH 3,35.

Variando o pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M em 0,5 unidade, observou-se que o derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é estável na faixa entre 3,3 e 3,8, sendo fundamental o controle do pH da solução tampão empregada como fase móvel, a fim de obter-se picos cromatográficos bem definidos e a máxima fluorescência emitida pelo derivado.

Influência da temperatura da coluna cromatográfica

Em estudo sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes temperaturas durante as análises cromatográficas, Samapundo et al.³⁷ relataram possível instabilidade térmica do derivado com o aumento da temperatura de 22 °C para 35 °C. Entretanto, na literatura, para a determinação de fumonisina B₁ por CLAE com detecção de fluorescência, tem-se empregado temperaturas de 23 °C²⁶, 24 °C³⁹, 30 °C⁴⁰ e 40 °C³⁶ durante as análises cromatográficas. Assim, o presente estudo avaliou a influência da temperatura da coluna cromatográfica sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

A Figura 4 apresenta as temperaturas da coluna cromatográfica avaliadas e a intensidade da fluorescência. Ao variar a temperatura da coluna de 20 a 30 °C, verificou-se redução na intensidade da

fluorescência com o aumento da temperatura. Em análise cromatográfica a 20 °C, obteve-se a intensidade máxima e baixo coeficiente de variação, 3,9%, porém esta não diferiu significativamente da emitida a 22 °C (98,3%), 25 °C (93,8%) e 27 °C (87%), demonstrando estabilidade térmica do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído na faixa entre 20 e 27 °C.

No entanto, durante as análises a 30 °C, verificou-se redução significativa em 26,5% na intensidade da fluorescência, em relação a 20 °C, demonstrando a instabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em temperaturas acima de 27 °C.

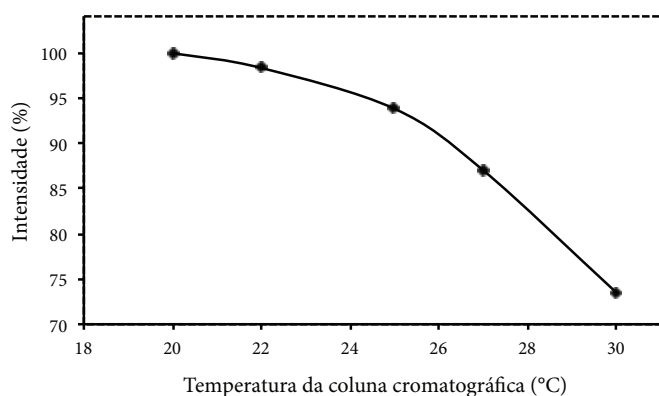


Figura 4. Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes temperaturas da coluna cromatográfica

A partir da Figura 4, é possível visualizar a influência da temperatura da coluna cromatográfica sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído, indicando que as análises cromatográficas devam ser realizadas entre 20 °C e 27 °C.

Williams et al.²⁷, ao estudarem o efeito da temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído, relataram redução em 40% e 90% na fluorescência do derivado a 4 °C e 24 °C, respectivamente, após 48 horas de derivatização, e que esta instabilidade pode ser atribuída à ausência do grupo hidroxila na posição C1 da molécula de fumonisina B₁, grupo que está presente na molécula da esfinganina, cujo derivado esfinganina-orto-ftaldialdeído demonstrou-se estável por até 24 horas à temperatura de 24 °C.

CONCLUSÃO

O derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído manteve-se estável em solução de tetraborato de sódio 0,1 M na faixa de pH entre 8,0 e 10,0, e de 2 a 8 minutos de

reação, durante a derivatização pré-coluna. Nas análises cromatográficas, verificou-se a estabilidade do derivado com o emprego na fase móvel de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M na faixa de pH entre 3,3 e 3,8, e temperatura da coluna cromatográfica de 20 a 27 °C. Assim, torna-se imprescindível o controle dos parâmetros experimentais pH, tempo e temperatura durante a reação de derivatização e as análises cromatográficas, a fim de assegurar a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído e a obtenção de resultados fidedignos sobre a contaminação dos alimentos por fumonisina B₁.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor (processo nº 130387/2009-6) e pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Commun*. 1988;11:743-5.
2. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R, et al. Fumonisins: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(7):1806-11.
3. Sydenham EW, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J Agric Food Chem*. 1990;38(10):285-90.
4. Tanaka K, Sago Y, Zheng Y, Nakagawa H, Kushiro M. Mycotoxins in rice. *Int J Food Microbiol*. 2007;119:59-66.
5. Seefelder W, Knecht A, Gobmann M, Kleta S, Büttner C, Humpf HU. Occurrence of fumonisins in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) from Germany. *Mycotoxin Res*. 2004;20:29-30.
6. Park JW, Kim EK, Shon DH, Kim YB. Natural co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Addit Contam*. 2002;19(11):1073-80.
7. Kawashima LM, Vieira AP, Valente Soares LM. Fumonisin B₁ and ochratoxin A in beers made in Brazil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):317-23.
8. Heperkan D, Karbancioglu-Güler F, Oktay HI. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxin, cyclopiazonic acid, fumonisin and ochratoxin A in dried figs. *Food Addit Contam Part A*. 2011;1-10.
9. Gazzotti T, Lugoboni B, Zironi E, Barbarossa A, Serraino A, Pagliuca G. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Control*. 2009;20:1171-4.
10. Weidenbörner M. Foods and fumonisins. *Eur Food Res Technol*. 2001;212:262-73.

11. Lino CM, Silva LJG, Pena AS. Fumonisinas: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Rev Port Ciênc Vet*. 2004;99(552):181-92.
12. International Agency for Research on Cancer – IARC. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-102. List of classifications by alphabetical order. França; 2011. [acesso 2012 fev 2]. Disponível em: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf].
13. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AM. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium verticillioides*. *J Biol Chem*. 1991;266:1486-90.
14. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shepard GS, Van Schalkwyk DJ. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathol*. 1992;82:353-7.
15. Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisina B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(3):847-52.
16. Franceschi S, Bidoli E, Baron AE, La Vecchia C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:1407-11.
17. Shephard GS, Marasas WFO, Leggott NL, Yazdanpanah H, Rahimian H, Safavi N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *J Agric Food Chem*. 2000;48(5):1860-4.
18. Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill Jr AH, Rothman KJ, et al. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ Health Perspect*. 2006;114(2):237-41.
19. Lino CM, Silva LJG, Pena AS. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. *Quím Nova*. 2006;29(2):293-9.
20. Krska R, Welzig E, Boudra H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;137:241-64.
21. Scott PM, Lawrence GA. Liquid Chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J AOAC Int*. 1992;75(5):829-34.
22. Holcomb M, Thompson Jr. HC, Hankins LJ. Analysis of Fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *J Agric Food Chem*. 1993;41:764-7.
23. Ware GM, Francis O, Kuan SS, Umrigar P, Carman A, Carter L, et al. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Lett*. 1993;26(8):1751-70.
24. Velázquez C, van Bloemendal C, Sanchis V, Canela R. Derivation of Fumonisins B₁ and B₂ with 6-Aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *J Agric Food Chem*. 1995;43:1535-7.
25. Shephard GS. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J Chromatogr A*. 1998;815:31-9.
26. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg (MD): AOAC; 2005.
27. Williams LD, Meredith FI, Riley RT. Fumonisin-ortho-phthalaldehyde derivative is stabilized at low temperature. *J Chromatogr B*. 2004;806:311-4.
28. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
29. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Snijman PW, Van Schalkwyk DJ. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *J AOAC Int*. 1996; 79(3):688-96.
30. Arranz I, Baeyens WRG, Van Der Weken G, De Saeger S, Van Peteghem C. Review: HPLC Determination of Fumonisin Mycotoxin. *Cr Rev. Food Sci Nutr*. 2004;44:195-203.
31. Pagliuca G, Zironi E, Ceccolini A, Matera R, Serrazanetti GP, Piva A. Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B₁ and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr B*. 2005;819:97-103.
32. Tardieu D, Auby A, Bluteau C, Bailly JD, Guerre P. Determination of fumonisin B₁ in animal tissues with immunoaffinity purification. *J Chromatogr B*. 2008;870:140-4.
33. Camargos SM, Machinski Jr M, Valente Soares LM. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1999;58(2):71-9.
34. Rice LG, Ross PF, Dejong J. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. *J AOAC Int*. 1995;78(4):1002-9.
35. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. *J AOAC Int*. 1992;75(2):313-8.
36. Thakur RA, Smith JS. Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J Agric Food Chem*. 1996;44(4):1047-52.
37. Samapundo S, De Meulenaer B, De Muer N, Debevere J, Devlieghere F. Influence of experimental parameters on the fluorescence response and recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B₁. *J Chromatogr A*. 2006;1109:312-6.
38. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J L Chromatogr*. 1990;13(10):2077-87.
39. Almeida AP, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega E, Corrêa B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem*. 2002;50:3877-82.
40. Batatinha MJM, Simas MMS, Botura MB, Bitencourt TC, Reis TA, Corrêa B. Fumonisins in brewers grain (barley) used as dairy cattle feed in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*. 2007;18:608-12.