

Análisis de micotoxinas aminopolihidroxiladas

Carlos A. VELÁZQUEZ GONZÁLEZ

I S B N: 84-89727-64-3
Depósito Legal: S. 54-98

Servei de Publicacions
Universitat de Lleida

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS EN ALIMENTOS Y PIENSOS.

1.1.2. MICOTOXINAS EN PRODUCTOS AGRÍCOLAS.

1.1.3. LAS MICOTOXINAS Y SUS EFECTOS.

1.2. LAS FUMONISINAS.

1.2.1. ASPECTOS GENERALES.

1.2.2. HONGOS PRODUCTORES DE FUMONISINAS.

1.2.3. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LAS FUMONISINAS.

1.2.3.1. Metabolitos relacionados.

1.2.3.2. Efectos del procesamiento y detoxificación de los alimentos.

1.2.4. ENFERMEDADES RELACIONADAS Y TOXICIDAD DE LAS FUMONISINAS.

1.2.4.1. Leucoencefalomalacia equina (ELEM).

1.2.4.1.1. Leucoencefalomalacia neurotóxica.

1.2.4.1.2. Leucoencefalomalacia hepatotóxica.

1.2.4.2. Edema pulmonar porcino (EPP).

1.2.4.3. Toxicosis de fumonisinas en aves de corral.

1.2.4.4. Toxicosis de fumonisinas en ganado bovino.

1.2.4.5. Cáncer de esófago en humanos (CE).

1.2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.

1.2.5.1. Generalidades.

1.2.5.2. Métodos de extracción.

1.2.5.3. Métodos de purificación.

1.2.5.4. Métodos de análisis.

1.3. EL GRUPO AMINO.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE FUMONISINAS.

3.1.1. EXPERIMENTAL.

3.1.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE FUMONISINAS.

3.1.2.1 Obtención de los extractos crudos de cultivos.

3.1.2.2. Extracción de los cultivos de *Fusarium proliferatum*.

3.1.2.3. Purificación de los filtrados acuosos.

3.1.2.3.1. Purificaciones cromatográficas.

3.2. EXTRACCIÓN DE LAS FUMONISINAS EN MUESTRAS DE MAÍZ PARA SU ANÁLISIS.

3.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE MAÍZ.

3.2.2. EXTRACCIÓN DE FUMONISINAS EN MUESTRAS DE MAÍZ DE 25 g.

3.2.3. EXTRACCIÓN DE LAS FUMONISINAS B₁ Y B₂ EN 5 g DE MAÍZ.

3.2.4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE 1 g DE MAÍZ.

3.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FUMONISINAS MEDIANTE HPLC.

3.3.1. ASPECTOS GENERALES.

3.3.1.1. Preparación de los patrones de fumonisinas.

3.3.1.2. Preparación de las curvas de calibración.

3.3.1.3. Cálculo de las concentraciones de FB₁ y FB₂ en maíz.

3.3.1.4. Cálculo de los límites de detección.

3.3.1.4.1. Método del "ruido de fondo".

3.3.1.4.2. Método de la "recta de calibración".

3.3.1.5. Análisis estadístico.

3.3.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TOXINAS EMPLEANDO OPA

3.3.2.1. Preparación del reactivo de derivatización, *o*-ftaldialdehído (OPA).

3.3.2.2. Preparación de los derivados.

3.3.2.3. Condiciones cromatográficas.

3.3.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FUMONISINAS EMPLEANDO EL REACTIVO ACCQ.FLUOR.

3.3.3.1. Preparación del reactivo AccQ.Fluor.

- 3.3.3.2. Reacción de derivatización con 20 μ l de reactivo.
- 3.3.3.3. Reacciones de derivatización con 40 μ l de reactivo.
- 3.3.3.4. Condiciones del análisis por HPLC.
- 3.3.3.5. Estudios de reproducibilidad y estabilidad.
- 3.3.4. INFLUENCIA DEL DISOLVENTE EMPLEADO EN LA DISOLUCIÓN DE MUESTRAS EN EL ANÁLISIS POR HPLC DE FB₁ Y FB₂.
- 3.4. SÍNTESIS DE ARIL DERIVADOS.
- 3.4. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE N- HIDROXISUCCINIMIDILO.
 - 3.4.1. OBTENCIÓN DE N- (QUINOLEN-6-IL) CARBAMATO DE SUCCINIMIDO.
 - 3.4.2. OBTENCIÓN DE N- (2-NAFTILMETIL)CARBAMATO DE SUCCINIMIDO.
 - 3.4.3. OBTENCIÓN DE 1-(2-NAFTILMETIL)-3-OCTILUREA.
 - 3.4.4. OBTENCIÓN DEL ÁCIDO 4-AZA-5-*terc*-BUTOXIDO-5-OXO PENTANOICO.
 - 3.4.5. OBTENCIÓN DE N- {2-[N -(2-NAFTIL)CARBAMOIL]ETIL} CARBAMATO DE *terc*-BUTILO
 - 3.4.6. OBTENCIÓN DEL TRIFLUOROBORATO DE 2-[N- (2-NAFTIL) CARBAMOIL]ETILAMONIO.
 - 3.4.6.1 Intento de obtención del Cloruro de 2-[N- (2-Naftil)carbamoil]etilamonio.
 - 3.4.7. OBTENCIÓN DE N- {2-[N -(2-NAFTIL)CARBAMOIL]ETIL} CARBAMATO DE SUCCINIMIDO.
 - 3.4.8. OBTENCIÓN DE N- [2-(1-NAFTILOXICARBONIL)ETIL]CARBAMATO DE *terc*- BUTILO.
 - 3.4.9. OBTENCIÓN DEL TRIFLUOROBORATO DE 2-(1-NAFTILOXICARBONIL)ETILAMONIO.
 - 3.4.9.1. Intento de obtención del Cloruro de 2-(1-Naftiloxicarbonil)etilamonio.
 - 3.4.10. INTENTO DE OBTENCIÓN DE [2-(NAFTILOXICARBONIL)ETIL] CARBAMATO DE SUCCINIMIDO.
 - 3.4.11. OBTENCIÓN DE LA N- (3-AMINOPROPIL)ACETAMIDA.
 - 3.4.12. RECRISTALIZACIÓN DE BENZO[de]ISOQUINOLINA-1,3-DIONA.
 - 3.4.13. OBTENCIÓN DE N -(1,3-DIOXO-2PROPIL-BENZO[de] ISOQUINOLIL) ACETAMIDA.
 - 3.4.14 OBTENCIÓN DEL CLORURO DE 3-[2-(1,3-DIOXO-1 H,3 H -BENZO[de] ISOQUINOLIL)]PROPILAMONIO.
 - 3.4.15. OBTENCIÓN DE 2-(3-AMINOPROPIL)BENZO [de]ISOQUINOLINA-1,3-DIONA.
 - 3.4.16. OBTENCIÓN DE N- {3-[2-(1,3-DIOXO-1 H,3 H -BENZO[de] ISOQUINOLIL)PROPIL]CARBAMATO DE SUCCINIMIDO.
 - 3.4.17. OBTENCIÓN DE 1-[3-(1,3-DIOXO-1 H,3 H -BENZO [de]ISOQUINOLEN-2-IL)PROPIL]-3-OCTILUREA.
- 3.5. APLICACIÓN DE LOS PRODUCTOS II Y XVI AL ANÁLISIS DE OCTILAMINA.
 - 3.5.1. DEFINICIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DE LAS UREAS III Y XVII.
 - 3.5.1.1. Optimización de los parámetros cromatográficos.
 - 3.5.1.2. Construcción de las curvas cantidad - respuesta para cada urea.
 - 3.5.1.3. Efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad de las ureas III y XVII.
 - 3.5.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN.
 - 3.5.2.1. Preparación de los reactivos.
 - 3.5.2.2. Condiciones cromatográficas.
 - 3.5.2.3. Reacciones de derivatización.
 - 3.5.2.4. Reacciones de derivatización empleando tampones y temperatura.
 - 3.5.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OCTILAMINA EN LA LINEALIDAD DE LA RESPUESTA.
 - 3.5.4. APLICACIÓN DE LOS REACTIVOS II Y XVI AL ANÁLISIS DE FUMONISINAS.
 - 3.5.4.1. Aspectos generales de las reacciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE FUMONISINAS.

4.1.1. EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.

4.1.1.1. Purificación con una resina XAD-2.

- 4.1.1.2. Purificación mediante columnas de sílica gel tipo "flash".
 - 4.1.1.3. Purificación mediante columnas de fase inversa (C₁₈).
 - 4.1.1.4. Purificación final mediante una columna de sílica gel tipo "dry-flash".
 - 4.2. ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES DE MAÍZ CON FB₁ Y FB₂.
 - 4.2.1. ESTUDIO DE LAS PRIMERAS EXTRACCIONES DE CADA MÉTODO.
 - 4.2.1.1. Estudios de los contenidos finales obtenidos por cada método.
 - 4.2.2. ESTUDIOS DE LA SEGUNDA EXTRACCIÓN PARA CADA MÉTODO.
 - 4.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FUMONISINAS MEDIANTE HPLC.
 - 4.3.1. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE FUMONISINAS MEDIANTE EL REACTIVO ACCQ.FLUOR.
 - 4.3.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS FUMONISINAS SOBRE LA RESPUESTA DE LOS DERIVADOS OBTENIDOS CON OPA Y ACCQ.FLUOR.
 - 4.3.3. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE MAÍZ.
 - 4.3.4. INFLUENCIA DEL REACTIVO Y EL DISOLVENTE SOBRE LA FORMACION DE DERIVADOS DE FB₁ Y FB₂.
 - 4.4. SÍNTESIS DE ARIL DERIVADOS
 - 4.4.1. RELACIÓN DE PRODUCTOS SINTETIZADOS.
 - 4.4.2. PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE N-(HIDROXISUCCINIMIDILO).
 - 4.4.2.1. Obtención de N-(Quinolen-6-il)carbamato de succinimido.
 - 4.4.2.2. Obtención de N-(2-(naftilmetil)carbamato de succinimido.
 - 4.4.2.3. Obtención de N-{2-[N-(2-Naftil)carbamoi]etil}carbamato de succinimido (VII) e intento de obtención de N-[2-(1-Naftiloxicarbonil)etil]carbamato de succinimido (X).
 - 4.4.2.4. Obtención de N-{3-[2-(1,3-dioxo-1*h*,3*h*-benzo[de] isoquinolil)propil]carbamato de succinimido.
 - 4.4.3. PREPARACIÓN DE DERIVADOS TIPO UREA.
 - 4.4.3.1. Obtención de 1-(2-naftilmetil)-3-octilurea (III) y 1-[3-(1,3-Dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinolen-2-il)propil]-3-octilurea (XVII).
 - 4.5. APLICACIÓN DE LOS REACTIVOS AL ANÁLISIS DE AMINAS
 - 4.5.1. PUESTA A PUNTO DE LOS REACTIVOS II Y XVI, PARA EL ANÁLISIS DE AMINAS POR HPLC.
 - 4.5.2. PROPIEDADES DE LOS DERIVADOS DE UREA.
 - 4.5.2.1. Respuestas cromatográficas de las ureas III y XVII
 - 4.5.2.2. Efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad de las ureas III y XVII
 - 4.5.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN.
 - 4.5.3.1. Tiempo de reacción.
 - 4.5.3.2. Adición de un tampón al medio de reacción
 - 4.5.3.3. Efecto de la temperatura y del pH.
 - 4.5.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OCTILAMINA EN LA LINEALIDAD DE LAS RESPUESTAS.
 - 4.5.5. APLICACIÓN DE LOS REACTIVO AL ANÁLISIS DE FUMONISINAS.
 - 4.5.5.1. Análisis de los derivados obtenidos con las fumonisinas por TLC.

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

7. ESPECTROS

8. FÓRMULAS

La sabiduría es más fuerte que la luz, porque la luz se deja vencer por la oscuridad, pero contra la sabiduría no hay oscuridad que pueda prevalecer.

Libro Sapienciales 7, 30

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se han abordado diversos aspectos que hacen referencia al análisis de unas micotoxinas aminopolihidroxiladas, las fumonisinas. El estudio llevado a cabo se pueden resumir en el contenido de los cinco puntos siguientes.

1. Obtención de fumonisinas a partir de extractos de cultivos de *Fusarium proliferatum*. Se busca con esto obtener fumonisinas para ser empleadas como patrones e incorporar mejoras en los métodos de extracción y purificación ya propuesto por otros autores. Las modificaciones que se ensayan consisten en utilizar sistemas cromatográficos con mayor resolución como el empleo de cromatografía "flash", con la que se pudo lograr una mejor separación de los productos deseados en un menor número de fracciones. Así mismo la adición de ácidos a los sistemas eluyentes presenta efectos positivos en lo que respecta a las separaciones mediante fase inversa (C18). Finalmente el empleo de la cromatografía "dry-flash", permitió la purificación final y selectiva de las fracciones con las toxinas por separado. Las modificaciones introducidas permiten disminuir el tiempo de proceso y el volumen de los disolventes consumidos, aunque no se ha conseguido obtener toxinas de adecuado grado de pureza.

2. Estudios de los sistemas de purificación de las muestras de maíz. Si bien existen métodos ya propuestos, la idea de éste trabajo se basa en la obtención de sistemas que den resultados con alta reproducibilidad, además de resultar menos engorrosos que los de referencia. El método ensayado permite, a partir de tan sólo 1 g de maíz, obtener los mismos resultados que otros descritos en la literatura. Las mayores ventajas de la metodología propuesta se basan en que tanto las extracciones como las purificaciones se realizan casi al mismo tiempo, hecho que acorta la duración del procesamiento de las muestras y disminuye el volumen de disolventes que se necesita en el análisis.

3. Estudio del empleo de AccQ.Fluor para el análisis de las muestras de maíz. La comercialización del reactivo AccQ.Fluor, empleado para el análisis de aminoácidos por HPLC, abre la posibilidad de encontrar un reactivo alternativo a los métodos empleados comúnmente en los análisis de las fumonisinas. Así se prueban las condiciones de reacción en una primera etapa de acuerdo a la metodología sugerida para el análisis de aminoácidos. Posteriormente se realizan ciertas modificaciones de acuerdo a las mejores condiciones para el análisis de las toxinas objeto del estudio. Finalmente los resultados obtenidos se comparan con el reactivo OPA, método empleado como referencia, no encontrándose diferencias significativas entre los valores. Igualmente, mediante la realización de pruebas de estabilidad se comprueba que las respuestas se mantienen estables hasta 48 h después de obtenidos los derivados.

4. Síntesis de aril derivados. En vista a los resultados conseguidos con el reactivo AccQ.Fluor se preparan derivados con estructura parecida. Partiendo de la base que el grupo carbamato activado, constituyente del reactivo AccQ.Fluor, es el punto de anclaje de las fumonisinas, se busca preparar otros carbamatos, con la idea de obtener compuestos que presenten características fluorescentes. Dos de los compuestos preparados permitieron la obtención de sus ureas asimétricas correspondientes.

5. Aplicación de los reactivos obtenidos al análisis de aminas. En vista a los derivados obtenidos en el apartado anterior se ensayaron los distintos factores que podían influir en las condiciones de reacción así como en las de análisis por cromatografía HPLC de la octilamina, para su posterior aplicación al análisis de las fumonisinas

1. Introducción

Desde los inicios de la agricultura ya se observó la naturaleza patogénica de ciertas especies de hongos, éstos eran agentes patogénicos gracias a su capacidad de producir metabolitos tóxicos.

Así, en tiempos pasados, las micotoxinas, que son los metabolitos tóxicos producidos por ciertos hongos microscópicos, han sido los responsables de los mayores episodios epidémicos de envenenamiento en hombres y animales (Bennett, 1987). La presencia del ergotismo, enfermedad asociada en la actualidad a alcaloides del ergot, ya se discute en el Antiguo Testamento. Igualmente mediante un exhaustivo estudio de informes meteorológicos, de producción granos y de datos acerca de la mortalidad, se ha obtenido la evidencia acerca del rol de las micotoxinas derivadas de *Fusarium* sp, en la aparición de graves epidemias durante la época medieval en Europa. Tales fenómenos se desplazaron posteriormente hacia la Europa central, para finalmente llegar a las Américas (Matossian, 1989).

El término "micotoxinas" podría definirse como productos naturales de origen fúngico que provocan una respuesta tóxica cuando son administradas en bajas concentraciones a grandes vertebrados. Algunos de estos metabolitos tienen múltiples efectos, pueden dar fitotoxicidad y síndromes antimicrobianos además de la toxicidad animal. A su vez las enfermedades y síndromes relacionados con ellas se denominan *micotoxicosis* (Bennett, 1987).

La mayoría de las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas y con una gran diversidad de estructuras químicas. Se conocen de 350 a 400 metabolitos de hongos con características toxigénicas (Betina, 1989). Una de las primeras de las que se tienen referencias en cuanto a sus características estructurales son las aflatoxinas (Betina, 1989) y siendo las fumonisinas una de las más recientemente descubiertas (Marasas y colaboradores, 1988).

En la actualidad las que podemos considerar de mayor importancia en la agricultura, junto con las citadas anteriormente son deoxinivalenol (nivalenol, en algunas zonas), zearalenona y ocratoxina A. Esta aseveración se basa en un extenso estudio analítico (IARC, 1993), donde se puede apreciar una información muy detallada de la distribución de los hongos en los principales cultivos. Esta lista aunque aparentemente corta implica una vasta gama de problemas científicos así como desafíos debidos a la naturaleza del hongo, especies cultivadas y las toxinas envueltas.

Actualmente, por el creciente mercado internacional, los productos alimenticios y sus derivados, se encuentran distribuidos alrededor de todo el mundo, por lo que los posibles efectos sobre los productos contaminados no se restringen sólo al país productor (Miller, 1995).

Pese al creciente caudal de conocimientos respecto al efecto de las micotoxinas en humanos, la mayoría de los datos conocidos sobre estos metabolitos y las enfermedades derivadas, provienen de la medicina veterinaria. Los estudios de campo, así como también ensayos experimentales, ponen de manifiesto la gran toxicidad potencial de las micotoxinas. Estos metabolitos se cree tienen efectos sobre la producción de tumores malignos, siendo uno de los principales responsables que aproximadamente el 80% de los casos de cáncer tengan su etiología en factores medio ambientales (Chelkowski, 1989). En futuras investigaciones acaso se determine la función causal de las micotoxinas en otras enfermedades humanas, aparte de las que se han considerado hasta ahora.

La presencia de hongos toxigénicos en cultivos ha sido históricamente dividida en dos grupos bien determinados. El primero incluye aquellos hongos que invaden y producen las toxinas antes de la propia cosecha, los que son conocidos como "hongos de los campos de cultivo", luego tenemos aquellos que invaden a los cultivos, pero la producción de toxinas es posterior a la cosecha y de acuerdo a las condiciones de almacenamiento, son los denominados "hongos de almacenamiento" (Miller, 1995).

Si bien, la fuente original de los hongos en la mayoría de los casos son los cultivos. La invasión de los hongos antes de cosecha, es manejada en forma primaria por distintos tipos de interacciones, entre las que se pueden citar por ejemplo la relación huésped-hongo, junto con otras interacciones biológicas tales como la presencia de insectos. El crecimiento y desarrollo de los hongos en etapas posteriores a la cosecha esta relacionada con aspectos tales como los nutrientes, temperatura y humedad (Betina, 1989).

Teniendo en cuenta todo esto podemos identificar los hongos toxigénicos en cuatro tipos distintos tales

como; (i) patógenos propios de las plantas, por ejemplo *Fusarium graminearum*; (ii) hongos que infectan y producen micotoxinas en plantas con procesos de estrés y otras en estado de descomposición, tales como *F. moniliforme* y *Aspergillus flavus*; (iii) hongos que infectan a las plantas y predisponen los productos de éstas a la contaminación por micotoxinas después de la cosecha, de acuerdo a las condiciones de almacenamiento como por ejemplo *A. flavus*; (iv) hongos que se encuentran normalmente en el suelo, en plantas en descomposición y que suelen infectar a los granos antes de la cosecha para desarrollarse posteriormente en los silos donde son almacenados, ejemplos de esto son *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*.

Casi todos los productos vegetales pueden servir de sustratos para el crecimiento fúngico y la ulterior formación de micotoxinas, por lo cual existe siempre la posibilidad de una contaminación directa de los alimentos para uso humano. Cuando se utilizan los sub-productos del ganado que han ingerido alimentos contaminados con micotoxinas, no sólo puede existir un efecto tóxico directo en los animales, sino también un traspaso de las toxinas a la leche, carnes y demás productos derivados, abriéndose así una nueva vía de exposición humana a las micotoxinas (Cawood y colaboradores, 1991).

Ya que como se ha comentado la presencia de las micotoxinas en los productos alimenticios está sujeta a la influencia de factores ambientales, tales como humedad y temperatura; la contaminación de los productos alimenticios con micotoxinas puede variar según las condiciones geográficas, los métodos de producción y almacenamiento, y el tipo de sustrato, puesto que algunos de ellos son más aptos que otros para el crecimiento fúngico (Cole y Cox, 1981).

En la tabla 1.1. se indican las principales micotoxinas producidas por hongos de éstos géneros.

Toxinas de <i>Aspergillus</i>	Toxinas de <i>Fusarium</i>	Toxinas de <i>Penicillium</i>	Toxinas de <i>Alternaria</i>
aflatoxinas	zearalenona	citrinina	alternariol
esterigmatocistina	toxina T-2	ocratoxinas	alternariol metil ester
ocratoxina	deoxinivalenol	ácido penicílico	altertoxina
ácido penicílico	diacetoxiscirpernol	rubratoxina	ácido tenuazónico
ácido kójico	moniliformina	patulina	altenueno
	nivalenol	penitrem	toxina-aal
	fumonisinias	viomelleina	

Tabla 1.1.: Principales géneros fúngicos y las micotoxinas producidas.

1.1. Contaminación por micotoxinas en alimentos y piensos.

Las micotoxinas son consideradas como uno de los agentes contaminantes naturales más importantes presentes en granos, nueces y otros materiales vegetales. La adquisición por parte del huésped mediante la ingestión, inhalación o contacto de una cantidad muy pequeña de estos compuestos pueden ocasionar serios daños a la salud humana y animal. Un informe de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1979) relata los graves impactos de las micotoxinas sobre la salud humana.

Como se ha expresado más arriba la ocurrencia de hongos toxigénicos en los alimentos presenta un riesgo potencial para los organismos en eslabones superiores de la cadena alimentaria y en algunos casos también para los propios vegetales (fitotóxicos) (Bhat, 1991).

La identificación de los hongos contaminantes puede servir como diagnóstico en los brotes epidémicos de micotoxicosis, aunque las conclusiones definitivas solo pueden ser hechas mediante la identificación de la toxina responsable, puesto que la presencia del hongo no es evidencia suficiente que este microorganismo sea el productor de la toxina, además que una toxina determinada puede persistir en el alimento o en piensos, aun cuando los hongos que lo producen ya no estén presentes. Mientras que un hongo determinado puede ser capaz de producir más de una toxina, a su vez una toxina determinada puede ser producida por diferentes géneros de hongos. Sin embargo la presencia de los hongos toxigénicos no es indicativo del riesgo potencial que eso conlleva (Betina, 1989).

Los hongos toxigénicos pueden crecer y producir sus toxinas en un amplio rango de sustratos tales como cultivos en crecimiento, hojas, raíces, granos, semillas, frutos, sustratos alimenticios para plantas y productos alimenticios para animales. Sin embargo, existen ciertos sustratos que evidentemente son los más

adecuados para la producción de las toxinas. Las características del sustrato constituyen probablemente uno de los aspectos más importantes en la investigación de las toxinas, en relación con la contaminación de alimentos y piensos. La ocurrencia de las micotoxinas puede darse en productos agrícolas a granel y fraccionados, así como en alimentos procesados y también en piensos (Bhat, 1991).

Como ya se ha expresado antes las micotoxinas pueden ser producidas por el hongo que crece en (i) plantas cultivadas (hongos de campo); (ii) material vegetal en descomposición (hongos de descomposición); (iii) en material almacenado (hongos de almacenamiento) (Betina, 1989).

Los hongos de los cultivos y los hongos de descomposición, requieren un alto contenido de humedad (20-25%, en peso húmedo) para su crecimiento, mientras que los hongos de almacenamiento son capaces de crecer en sustratos, que poseen contenidos de humedad inferiores (12-18%, en peso húmedo). En base al contenido de humedad y la actividad de agua (a_w), se puede expresar la habilidad del agua para permitir el crecimiento de microorganismos. Las condiciones máximas y mínimas de a_w , la temperatura a la cual el crecimiento de hongos ocurre y las micotoxinas que pueden ser producidas en esas condiciones, fueron estudiadas por Betina en 1989.

1.1.2. Micotoxinas en productos agrícolas.

Los hongos toxigénicos junto a sus metabolitos, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido detectados en muchos cultivos agrícolas. La producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus* en cultivos agrícolas tales como cereales, nueces, semillas de algodón, melocotones, patata dulce, trigo y mandioca, están bien documentados (Betina, 1989).

Los cereales pueden ser altamente susceptibles al crecimiento de los hongos cuando aun están en los campos de cultivos. Tanto los granos más pequeños así como los más grandes son susceptibles a la infección por hongos toxigénicos y la posterior producción de micotoxinas. Las principales micotoxinas que se suelen encontrar regularmente en los cereales son aflatoxinas, ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisinas y zearalenona (Miller, 1995).

Lillehoj y Hesseltine así como Widstrom, en los años, 1977 y 1979 respectivamente, han investigado la presencia de las micotoxinas en los granos de maíz en desarrollo, encontrando que (i) los insectos pueden servir de vectores para la propagación de hongos productores de toxinas; (ii) los daños inducidos por los insectos aparentemente proveen el acceso al desarrollo de los hongos; (iii) en los granos en desarrollo un número limitado de especies en competición están asociadas a la presencia de hongos productores de micotoxinas. Estas y posteriores observaciones han servido para desarrollar la teoría de la implicancia ecológica de los metabolitos tóxicos de hongos (Lillehoj y Hesseltine, 1977). Esta se basa en un modelo de sistema que relaciona la causa-efecto entre los biotipos pertinentes en la contaminación por micotoxinas en los granos de maíz en desarrollo. El modelo sugiere que los hongos responsables de la producción de micotoxinas son habitantes naturales del tracto digestivo de un sin número de insectos que se alimentan de los granos en desarrollo. Durante los procesos de alimentación, las larvas de los insectos introducen propágulos de los hongos y provocan la apertura de sitios de infección en los granos así dañados. La asociación de los hongos con los insectos exhibe una extraordinaria variabilidad, en rangos tan variados que pueden ir desde la simbiosis hasta la patogeneidad.

Betina en 1989, analizó unas muestras contaminadas naturalmente infectadas por *F.graminearum* y estudió como los procesos de purificación, molido y cocido influyen en los niveles de las toxinas. Las concentraciones más altas de toxinas fueron encontradas en piensos y las más bajas en la harina de trigo. Mientras que las toxinas no pudieron ser destruidas ni en el proceso de molido ni en los panificados preparados a partir de la naturalmente contaminada.

1.1.3. Las micotoxinas y sus efectos.

Un gran número de metabolitos de hongos se presentan asociados a diferentes patologías. Así, algunos pueden llegar a provocar la muerte, mientras que otros pueden provocar efectos severos que incluyen la necrosis de la piel, leucopenia e inmunosupresión. Las dosis que producen enfermedades crónicas son usualmente muy bajas, respecto a aquellas responsables de los efectos agudos. Los efectos crónicos son daños tales como la aparición o el desarrollo del cáncer y pueden no ser detectados en el momento de la ingesta. Se han reportado cuatro tipos de efectos principales como son los efectos agudos, crónicos, mutagénicos y teratogénicos (Betina,

1989).

Los efectos más comúnmente descritos suelen ser intoxicaciones de tipo agudo y se caracterizan por el deterioro de las funciones del hígado y riñones, los cuales pueden llegar a desembocar en la muerte (Scott, 1993b).

Entre los hongos productores de toxinas, destacan los del género *Fusarium*.

Sus metabolitos tóxicos pueden producir diferentes síntomas de contaminación y pueden inducir respuestas agudas tales como vómitos, diarreas, síndromes anorexígenos, inflamación gastrointestinal además de efectos menos inmediatos como leucopenia, ataxia, necrosis de piel y tejidos junto con degeneración de las células nerviosas y hemorragias del tejido muscular (Cole y Cox, 1981; Ueno, 1992). Las últimas toxinas aisladas e identificadas a partir de hongos de este género son las fumonisinas. Una de éstas toxinas, la fumonisina B₁, producida por *F. moniliforme* y *F. proliferatum*, se presenta como el agente causal de una enfermedad en ganado equino denominada leucoencefalomalacia (Maddox, 1984; Marasas y colaboradores, 1988b), además de inducir el cáncer de hígado en ratas (Gelderblom y colaboradores, 1988). Se la ha relacionado de igual manera con la incidencia del cáncer de esófago en humanos tanto en China como en países africanos (Scott, 1993a).

1.2. Las fumonisinas.

1.2.1. Aspectos generales.

Como ya se ha comentado las fumonisinas son producidas principalmente por *F. moniliforme* y *F. proliferatum* así como también por otras especies de este género (Nelson y colaboradores, 1991, 1992 y 1993). Las fumonisinas fueron descubiertas en el año 1988 por dos grupos de trabajo de manera independiente. Uno de ellos estaba investigando la causa del cáncer de esófago en humanos en ciertas partes de Sudáfrica (Bezuidenhout y colaboradores, 1988). Mientras que el otro estaba buscando encontrar la etiología de una de las enfermedades bien conocidas que afectan a los caballos, la ELEM (leucoencefalomalacia) (Laurent y colaboradores, 1990).

Si bien se han descrito seis fumonisinas se tiene la certeza que por lo menos tres micotoxinas no son artefactos y son las fumonisinas B₁, B₂ y B₃. (Ver figura 1.1). Estas sustancias han demostrado ser contaminantes naturales del maíz y los alimentos derivados de estos, además de los piensos, en estudios realizados en estos materiales procedentes de los Estados Unidos, China, Europa, Sudáfrica y países de Sudamérica (Chu y Li, 1991; Doko y Visconti, 1994; Hopmans y Murphy, 1993 y 1994; IARC, 1993; Murphy y colaboradores, 1993; Sydenham y colaboradores, 1991; Ueno y colaboradores, 1992; Visconti y Doko, 1994; Yoshizawa y colaboradores, 1994). Aparentemente el maíz que es producido en zonas frías escapa a este tipo de contaminación (Miller, 1995).

Ciertas cepas de *F. moniliforme*, en muestras de maíz procedente de países como Sudáfrica, Estados Unidos, Francia, Polonia, Italia, Brasil, Argentina, Indonesia, Tailandia y Las Filipinas, han demostrado tener capacidad productora de fumonisinas (Nelson y colaboradores, 1991 y 1992; Miller y colaboradores, 1993; Rapior y colaboradores, 1993; Thiel y colaboradores, 1991; Visconti y Doko, 1994). En el presente también ya se tienen los primeros datos acerca de la existencia de fumonisinas en otras especies, por ejemplo en el sorgo, aunque las cepas aisladas de esta especie dan como resultado cantidades muy pequeñas de toxina, siendo los niveles detectados muy inferiores a los hallados en el maíz. (Leslie y colaboradores, 1992; Miller y colaboradores, 1993).

Debido a lo relativamente reciente del descubrimiento de las fumonisinas, los datos acerca de su toxicidad son todavía escasos. Si bien ya se ha logrado reproducir la ELEM, mediante la administración de toxina purificada a caballos (Marasas y colaboradores, 1988a), provocando la licuefacción masiva necrosante de los hemisferios cerebrales, con manifestaciones neurológicas graves. En exposiciones a dosis altas, la muerte puede ocurrir en cuestión de horas después de la aparición de los primeros síntomas (Prelusky y colaboradores, 1994). Los datos acerca de estudios epidemiológicos de los daños ocasionados al hígado y riñones en caballos, debido a una exposición a fumonisinas, aún son escasos (Prelusky y colaboradores, 1994). Se sabe también que las fumonisinas tienen efectos sobre la síntesis de esfingolípidos (Riley y colaboradores, 1993). Las alteraciones en los rangos de producción de los esfingolípidos, inmediatamente después a la exposición a fumonisinas, son

debidos a que también tienen efectos dramáticos sobre la síntesis de ceramidas (Wang y colaboradores, 1992).

Diversos autores han asociado la presencia de altas concentraciones de fumonisinas B₁ y B₂ en piensos para cerdos con la aparición del denominado "edema pulmonar en porcinos" (EPP) (Colvin y Harrison, 1992; Prelusky y colaboradores, 1994, Ross y colaboradores, 1990). En exposiciones a bajas concentraciones de éstas toxinas, se han reportado en lechones daños a nivel hepático y renal (Riley y colaboradores, 1993). En el caso de los pollos, existen informes sobre casos de la presencia de las fumonisinas junto con otras micotoxinas, que serían la etiología del denominado "síndrome mortal de contaminación", la cual involucra una variedad de síntomas neurológicos junto con una marcada reducción del crecimiento para, finalmente, producir la muerte de pollos, hasta con 14 días de edad (Javed y colaboradores, 1993).

Las exposiciones debidas al consumo de maíz contaminado por *F. moniliforme* y a sus toxinas, han sido relacionados con la incidencia de cáncer de esófago en Transkei (Thiel y colaboradores, 1992). Las fumonisinas han demostrado tener capacidad de inducir la producción de tumores malignos en ratas tratadas previamente con dietilnitrosamina (Gelderblom y colaboradores, 1988). Se observan efectos hepatotóxicos y hepatocarcinogénicos cuando se tratan ratas, con dosis de FB₁ hasta 50 mg/kg con 90% de pureza (Gelderblom y colaboradores, 1991). Aunque las fumonisinas son consideradas agentes no mutagénicos (Gelderblom y Snyman, 1992; Gelderblom y colaboradores, 1992) si se consideran buenos promotores del cáncer. Los datos acerca la capacidad promotora de tumores en humanos, son aún incompletos. Sin embargo el informe presentado por la IARC, en 1993, ha examinado la carcinogenicidad en humanos de los granos contaminados con *F. moniliforme*, conteniendo fumonisinas y fusarinas, posteriormente se ha demostrado la posibilidad que se comporten como posibles agentes carcinogénicos en humanos.

Estudios sobre la presencia de fumonisinas en carne, leche y huevos, hasta hoy día resultan incompletos. FB₁ radiomarcada se ha utilizado para poder determinar la posibilidad de transmisión a los huevos y la carne en pollos, pero ninguna radioactividad fue detectada en los productos obtenidos (Prelusky y colaboradores, 1994).

Las fumonisinas se muestran bastante estables a los distintos procedimientos de preparación de alimentos (Scott, 1993b; Scott y Lawrence, 1994). Tratamientos del maíz con hidróxido de calcio, empleado en la preparación de "tortillas", produjo la reducción en la concentración de las fumonisinas debido a un proceso de hidrólisis. El compuesto así obtenido, el aminopentol, aparentemente no presenta efectos carcinogénicos (Gelderblom y colaboradores, 1993), aunque las ratas alimentadas con el maíz tratado desarrollaron neoplasias de hígado y que una de ellas llegó a desarrollar adenomas (Hendrich y colaboradores, 1993).

1.2.2. Hongos productores de fumonisinas.

F. moniliforme y *F. proliferatum*, los hongos principales productores de fumonisinas son también los hongos más comúnmente asociados a las contaminaciones fúngicas del maíz. Desde hace muchos años, se sabe que *F. moniliforme*, aparece sistemáticamente en las hojas, ramas, raíces y semillas de este vegetal (Foley, 1962). Estos hongos, pueden ser los contaminantes de todo tipo de granos, aunque tengan apariencia de ser sanos (Bacon y Williamson, 1992; Hesseltine y colaboradores, 1981; Pitt y colaboradores, 1993 y Wicklow, 1994). Sin embargo, la significancia de la presencia de este hongo sobre los tejidos sanos, aun no está muy bien estudiada (King y Scott, 1981). Existen evidencias que sugieren que algunas cepas de *F. moniliforme* producen una serie de síntomas de enfermedades mientras que otras no los llegan a producir (Bacon y Williamson, 1992), lo cual podría asociarse con la presencia de las fumonisinas, unas potentes fitotoxinas como lo han reseñado Abbas y colaboradores, (1993). Igualmente Nelson y colaboradores en 1993, llevaron a cabo experiencias con cepas de baja y alta productividad de fumonisinas de *Gibberella fujikori*, observando que solo la progenie donde la productividad de las fumonisinas era alta producía la podredumbre de los tallos.

F. moniliforme y *F. proliferatum*, son también las responsables de la producción de la podredumbre de los granos por *Fusarium*, patología común en ciertas partes de América del norte así como en países tropicales (De León y Pandey, 1989; King y Scott, 1981; Ochor y colaboradores, 1987) que también está estrechamente asociado a la presencia de otros factores tales como calor, sequía y daños ocasionados por los insectos (Schurtleff, 1980).

Existe una muy estrecha relación entre los daños ocasionados por insectos y la presencia de la podredumbre de los granos por *Fusarium*. Un ensayo de campo, en Europa, demostró que la presencia de taladros de maíz incrementan la presencia de *F. moniliforme* y a su vez las concentraciones de fumonisinas (Lew

y colaboradores, 1991).

1.2.3. Propiedades químicas y físicas de las fumonisinas.

Hoy día, son seis los metabolitos producidos por *F. moniliforme*, que son conocidos como fumonisinas (Cawood y colaboradores, 1991). Las estructuras químicas se muestran en la figura 1.1.

[Figura 1-1](#)

La toxina mayormente producida por este microorganismo es la FB₁. Las FB₁ y FB₂, son descritas como sólidos amorfos (Gelderblom y colaboradores, 1988) con un punto de fusión de 103 a 105°C para la FB₁ (Vesonder y colaboradores, 1992). La FB₁ presenta una rotación óptica $[\alpha]_D$ de -28° (2 mg/ml en agua).

El espectro infrarrojo (KBr) incluye absorciones a 3450, 2934, 1729 y 1632 cm⁻¹ (Vesonder y colaboradores, 1992).

Por espectrometría de masas (EM), se han obtenido una relación masa/carga (m/z) de 721 para la FB₁ (C₃₄H₅₉NO₁₅) y una relación masa/carga (m/z) de 706 para la FB₂ (C₃₄H₅₉NO₁₄) (Bezuidenhout y colaboradores, 1988).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una herramienta importantísima en la determinación estructural, además de poder emplearse como método para la verificación de pureza de las fumonisinas. Bezuidenhout y colaboradores, 1988; Laurent y colaboradores, 1990 así como Plattner y colaboradores, 1990 y 1992 proponen una tabulación comparativa en ¹³C-RMN para las fumonisinas FB₁, FB₂ y FB₃ en D₂O y también para los productos de la hidrólisis (aminopolioles). Cambios en el ¹³C-RMN de los espectros de la FB₁, fueron atribuidos a una variación del pH, a su vez a un equilibrio de las formas cíclicas de los ácidos tricarbóxicos (1,2,3 propanotricarbóxicos) y sus cadenas laterales.

Los espectros de ¹H-RMN de la FB₁, fueron publicados por Laurent y colaboradores en 1990, así como por Plattner y colaboradores en 1990 y en 1992; los espectros formados mostraban la existencia de interacciones entre los grupos COO⁻ y NH₃⁺ en D₂O, así como la adopción de una forma globular por parte de la molécula de FB₁ (macrofusina).

Las fumonisinas al ser compuestos fuertemente polares, son solubles en agua, en mezclas (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v y muy solubles en metanol, pero nada solubles en disolventes apolares.

La sal de amonio de la FB₁, se prepara mediante un tratamiento de una disolución en CD₃OD con NH₃ (Laurent y colaboradores, 1990). La FB₁, puede ser acetilada y metilada (Bezuidenhout y colaboradores, 1988; Laurent y colaboradores, 1990). Las fumonisinas sufren hidrólisis mediante un calentamiento en presencia de HCl 6M o NaOH 0'05-2M para obtener también los ácidos tricarbóxicos (1,2,3-propanotricarbóxicos) y los correspondientes aminopolioles (aminopentol de FB₁; aminotetraoles de FB₂ y FB₃) (Bezuidenhout y colaboradores, 1988; Jackson y Bennett, 1990; Plattner y colaboradores; 1990, 1992; Sydenham y colaboradores, 1990a y b).

1.2.3.1. Metabolitos relacionados.

Alternaria alternata, es un hongo productor de fitoxinas, las toxinas-AAL. Estos son cuatro compuestos muy relacionados estructuralmente con las fumonisinas, tales como las TA-1, TA-2, TB-1 y TB-2. (Ver figura 1.2) (Bottini y colaboradores, 1981; Siler y Gilchrist, 1983). Estas han sido renombradas como "alperisinas" A₁, A₂, B₁, y B₂ (Shephard y colaboradores, 1992a). Otros metabolitos fúngicos con estructuras relacionadas lo constituyen las "esfingofunginas" A, B, C y D (vanMiddlesworth y colaboradores, 1992 a, b) y las "fumifunginas" (Mukhopadhyay y colaboradores, 1987), metabolitos antifúngicos de *Aspergillus fumigatus*.

[Figura 1-2](#)

1.2.3.2. Efectos del procesamiento y detoxificación de los alimentos.

Cuando se realizan estudios sobre el procesamiento y detoxificación de alimentos contaminados con

fumonisininas debemos hacer una distinción real entre las pérdidas de fumonisininas (incluyendo la transformación a productos derivados), las posibles reacciones y la unión a ciertas matrices de los productos alimenticios. La FB₁, es reconocida por ser un compuesto estable al calor, así al someter a calentamiento el medio de cultivo conteniendo *F. moniliforme*, durante 30 min; seguido de un proceso de secado a 60 °C durante 24 h, no se observaron cambios en las concentraciones iniciales de FB₁(Alberts y colaboradores, 1990).

Sin embargo, solo un 40% de FB₁y FB₂fueron recuperados, en maíz contaminado y sometido a un calentamiento de hasta 190 °C, pero cuando el calentamiento fue de 220°C, la destrucción fue del 100% (Scott y Lawrence, 1993c). La descomposición de la FB₁en los granos de maíz sometidos a procesos de secado en los que se calienta el material entre 100-150 °C, sigue una cinética de primer orden (Lebars y colaboradores, 1992).

Los procesos fermentativos enzimáticos del maíz naturalmente contaminado con FB₁, pueden provocar pequeñas degradaciones del contenido de estas toxinas (Bothast y colaboradores, 1992).

La utilización de atmósferas saturadas de NH₃, se sabe que tiene algunos efectos sobre las concentraciones de FB₁. A 20 °C y una alta presión (60 psi), se consigue una reducción total de hasta un 79% de la concentración de FB₁(Park y colaboradores, 1992). Sin embargo, el tiempo necesario para el secado al aire no fue establecido. En otros experimentos el tratamiento de los medios de cultivo de *F. moniliforme* con NH₄OH al 2% y a 50 °C, a presión atmosférica, produce una reducción que inicialmente se estimó en el 89%, pero al cabo de 4 días, y tras un proceso de secado, la reducción real se cifró en un 32% (Norred y colaboradores, 1991b). Por otra parte la toxicidad de los cultivos sometidos a procesos de amoniación no se vieron alterados (Norred y colaboradores, 1991b; Voss y colaboradores, 1992). Similares procedimientos de amoniación y secado, en maíz contaminado naturalmente solo dieron un 41% de reducción en la concentración de la FB₁(Norred y colaboradores, 1991b). Es muy importante analizar los procesos que se dan en los tratamientos alcalinos en los productos derivados de maíz. Así son importantes los productos de degradación de FB₁y FB₂. El tratamiento de los granos de maíz contaminados por FB₁con una disolución acuosa de hidróxido de calcio, en un proceso similar a la nixtamalización empleado durante la preparación de "tortillas", lleva a la formación de aminopentoles y ácidos tricarbóxicos, aun a temperatura ambiente (Sydenham y colaboradores, 1992).

1.2.4. Enfermedades relacionadas y toxicidad de las fumonisininas.

Los estudios de toxicidad de estos metabolitos de hongos se basan en la sintomatología, patología clínica y efectos sobre ciertos parámetros inmunológicos en animales expuestos a las fumonisininas. El consumo de piensos contaminados con fumonisininas ha sido asociado con la co-ocurrencia de enfermedades tales como ELEM y EPP. Sin embargo, no existen informes acerca de éstas micotoxicosis en otras especies animales.

1.2.4.1. Leucoencefalomalacia equina (ELEM).

La ELEM es una enfermedad no infecciosa, de carácter esporádico y altamente fatal. Afecta al sistema nervioso central (SNC) en caballos y otros equinos. La enfermedad ya fue reportada como tal en el año 1850 y ha sido reconocida en todo el mundo. Muchos nombres han sido dados a esta condición patológica, tales como "tambaleos de ciego", "enfermedad del forraje", "enfermedad del tallo del maíz", "leucoencefalitis" o "envenenamiento del maíz contaminado por hongos".

Los primeros informes demostrando el rol primario de *F. moniliforme*, en la patogénesis del ELEM, fueron realizadas por Wilson y Maronpot en 1971. En su estudio, alimentaron unos burros con maíz contaminado experimentalmente con algunas especies aisladas en piensos asociados con los brotes de ELEM, a lo largo del delta del río Nilo. Solo los granos contaminados con *F. moniliforme* reprodujeron la sintomatología clínica más característica de la ELEM.

1.2.4.1.1. Leucoencefalomalacia neurotóxica.

En el presente, 2 síndromes distintos de ELEM, han sido reportados. El reporte clínico más común de la ELEM está relacionado con el SNC y constituye la llamada forma neurotóxica. Esta forma de la enfermedad es altamente fatal y puede estar precedida por un corto período de letargia y anorexia, pudiendo acaecer la muerte de manera asintomática. Comúnmente las manifestaciones del SNC en la forma neurotóxica incluyen una hiperestesia, hiperexcitabilidad, ceguera unilateral, marcha debilitada y en círculos, variación e incremento de la presión intracraneal. En fases terminales de la enfermedad, el animal entra en una etapa depresiva,

adoptando generalmente una posición yacente, para luego entrar en coma. La morbilidad esta cifrada en un 25%, sin embargo la mortalidad está cerca del 100%. Los animales que sobreviven usualmente presentan lesiones neurológicas graves y permanentes. La patología clínica asociada incluye una masiva licuefacción necrótica, en uno de los hemisferios cerebrales. Las lesiones histológicas pueden ir desde lesiones microscópicas de la fosa malacica de la materia blanca del cerebro, hasta lesiones necróticas extensivas afectando a los tejidos corticales y subcorticales. El término "leucoencefalomalacia" describe las lesiones primarias asociadas a la enfermedad y la necrosis de la materia blanca del cerebro. Histológicamente, las lesiones cerebrales están caracterizadas por una licuefacción no celular, edema periférico alrededor de las células gliales reactivas, hemorragias perivasculares, daños en células mononucleares en las zonas llamadas de transición entre los tejidos necróticos y los normales. Los animales que sobreviven después de varios días del comienzo de la enfermedad ocasionalmente muestran neurofagia, satelitosis y gliosis (Wilson y colaboradores, 1973 y 1990; Haliburton y colaboradores, 1979; Haliburton y Buck, 1986; Marasas y colaboradores, 1988; Wilson y colaboradores, 1992).

1.2.4.1.2. Leucoencefalomalacia hepatotóxica.

La ELEM hepatotóxica, es otra forma clínica patológica de la enfermedad. Esta fue inicialmente diagnosticada por la presencia de inapetencia y seguida por un cuadro de depresión, con aparición de edema facial junto con una marcada ictericia indicativo de un serio daño hepático.

Una parálisis de la lengua y los labios, que también es observada en la forma neurotóxica, provocan una dificultad en la prehensión y la masticación. Las lesiones más importantes visualizadas en primera instancia son en el hígado, además de las lesiones en la fosa malacica tanto en el cerebro como en el cerebelo. El hígado se suele presentar usualmente pequeño, duro y de color amarillo con un patrón lobular prominente. Una necrosis y fibrosis periacinar acompañada de una infiltración celular neutrofílica fue observada microscópicamente.

Se ha demostrado que el hongo *F. moniliforme* es el responsable del desarrollo de la enfermedad tanto en experimentos como en brotes epidémicos, los metabolitos tóxicos específicos causantes del ELEM, no fueron identificados hasta la administración de fumonisinas a los animales susceptibles a la presencia de este compuesto. Posteriormente al descubrimiento de las fumonisinas, Marasas y colaboradores (1988), llegaron a reproducir la ELEM en un caballo al que se suministró por vía intravenosa 7 dosis diarias de 0'125 mg/kg de peso corporal de FB₁ durante un periodo de 9 días.

Los signos clínicos neurotóxicos de la ELEM, aparecen 8 días después e incluyen un estado de hiperexcitabilidad nerviosa seguido de un estado de apatía, yacencia, temblores, ataxia, reticencia al movimiento, parálisis de los labios inferiores y lengua, provocando inhabilidad en la ingesta de alimentos y de líquidos. Kellerman y sus colaboradores en 1990, demostraron lo dicho anteriormente por Marasas y colaboradores en 1988. En este estudio, 2 caballos fueron dosificados por vía intragástrica con 1 a 4 mg/kg de peso corporal de FB₁ durante 29 a 33 días, respectivamente. Durante el período de dosificación ambos caballos desarrollaron signos clínicos típicos de la ELEM neurotóxica, confirmados luego mediante un diagnóstico postmortem. Posteriormente Wilson y colaboradores (1992), alimentaron ponies con maíz contaminado a distintas concentraciones de FB₁. Uno de los ponies alimentado con niveles de a 22 µg/g de FB₁, desarrolló la ELEM neurotóxica al cabo de 225 días que le produjo la muerte. Sin embargo, otros ponies que recibieron la misma ración, fueron sacrificados a los 180 días, el estudio histológico demostró que sólo presentaban lesiones cerebrales histopatológicas leves.

La ELEM hepatotóxica, también ha sido observada bajo condiciones experimentales. Caballos dosificados por vía intragástrica mediante piensos contaminados con cultivos de *F. moniliforme* desde 1'25 a 2'5 g/kg de peso corporal durante 7 días, desarrollaron hepatosis y un edema cerebral, particularmente apreciable en la médula oblongata. La concentración de FB₁ en cultivos fue aproximadamente de 1 mg/g. En un experimento reciente, 4 ponies fueron alimentados con maíz contaminado naturalmente con FB₁ a dosis de 44 a 88 mg/kg de peso corporal (Díaz y Boermans, 1994). A los nueve días después de iniciada la prueba, uno de los animales había muerto de manera aguda, con una necrosis hepática y una leve encefalitis. Otro de los ponies fue sacrificado al cabo de 45 días y demostró tener hepatitis necrótica y encefalitis. Después de 75 días uno de los animales murió debido a una ELEM neurotóxica, con una necrosis hepática leve; finalmente el último de los ponies fue sacrificado al mismo tiempo, y también presentó leucoencefalomalacia junto con lesiones hepáticas.

Es muy interesante notar que durante los experimentos de la reproducción de ELEM mediante la utilización de FB₁ purificada, se observó la aparición del síndrome neurotóxico. Pero se observaron resultados erráticos cuando los materiales utilizados contenían cultivos de *F. moniliforme* o productos naturalmente

contaminados, en ambos casos utilizados como fuente de fumonisinas. Estos materiales de cultivos y productos naturalmente contaminados, además de las fumonisinas tenían otros metabolitos de *Fusarium*. El rol de otros metabolitos de *Fusarium*, en la etiología de la ELEM hepatotóxica, es aun oscuro (Díaz y Boermans, 1994).

1.2.4.2. Edema pulmonar porcino (EPP).

El edema pulmonar en porcinos (EPP) es una condición letal sub-aguda, que se caracteriza por un edema de pulmón severo complicado con un hidrotórax. La enfermedad ha sido asociada con el consumo de piensos preparados con maíz contaminados naturalmente con *F. moniliforme*.

Los síntomas clínicos observados son una disnea aguda al principio de la enfermedad, debilidad, cianosis y finalmente la muerte. Harrison y colaboradores (1990), colectaron muestras de maíz de 2 granjas donde se registraron 34 muertes debido a la EPP. Los hongos aislados de los piensos contaminados de estas granjas eran idénticos morfológicamente al *F. moniliforme*, siendo los niveles extraídos de FB₁ entre 105 y 155 mg/kg.

Los cambios más grandes en la patología se observaron en los individuos muertos e incluían un marcado edema pulmonar y un hidrotórax masivo.

Estas lesiones postmortem fueron detectados en cerdos de poca edad, que resultaron muertos una semana después de haber sido alimentados con piensos contaminados y bajo las condiciones experimentales. En el mismo estudio, 2 cerdos fueron tratados con dosis de FB₁ purificada de 0'4 y 0'174 mg/kg, respectivamente. El cerdo que recibió la dosis más alta, encontró la muerte a los 5 días, con síntomas claros de EPP. El otro cerdo que recibió la dosis más baja siguió recibiendo FB₁ y posteriormente fue sacrificado sin encontrarse indicio del edema pulmonar. Otro cerdo en el mismo estudio fue tratado con dosis de hasta 0'3 mg/kg de FB₂ purificada durante 5 días, pero éste no desarrolló el EPP.

Se han reportado casos de necrosis pancreática y daño hepático, en cerdos recibiendo fumonisinas de piensos contaminados naturalmente. Las lesiones de hígado consisten en una vacuolación hepatocelular periacinar y aleatoria, hipertrofia hepatocelular, fibrósis periportal, con desorganización de los hepatocitos, necrosis celular e inflamación leve. El daño hepático no fue detectado en aquellos cerdos tratados con las toxinas purificadas. Las lesiones pancreáticas consisten en la degeneración celular acinar pancreática, también se presentaron en los cerdos signos de edema pulmonar e hidrotórax (Díaz y Boermans, 1994).

Colvin y colaboradores (1992), trataron cerdos con piensos contaminados con material de cultivo conteniendo hasta 9 mg/kg de FB₁ y 3'8 mg/kg de FB₂. Las dosis administradas fueron entre 4 a 64 mg/kg de peso corporal. Las manifestaciones clínicas incluyeron el edema pulmonar o fallo hepático como una manifestación patológica distintiva de las toxicosis debidas a fumonisinas. Los cerdos tratados con una dosis de 16 mg/kg de peso corporal de FB₁, desarrollaron un edema interlobular severo a veces asociada con la presencia de hidrotórax y edema alveolar. Cerdos con dosis inferiores a 16 mg/kg de peso corporal de FB₁, desarrollaron una marcada ictericia junto con una necrosis hepatocelular. Los investigadores concluyeron que la dosis de FB₁ resulta el determinante primario de las lesiones, en cerdos. Riley y colaboradores (1993) alimentaron a los cerdos con dietas conteniendo diferentes niveles de fumonisinas con maíz naturalmente contaminado. El contenido de las fumonisinas (B₁ y B₂) en dietas fueron de 0, 5, 23, 36, 101 y 175 mg/kg. El edema pulmonar solo se desarrolló con concentraciones de 175 mg/kg, mientras que las lesiones histológicas del hígado se observaron a niveles a partir de 23 mg/kg o superiores.

Las alteraciones en los parámetros químico-clínicos han sido observados en los cerdos expuestos a fumonisinas. Aquellos que fueron alimentados con piensos conteniendo concentraciones de hasta 166 mg/kg de FB₁ y 48 mg/kg de FB₂ presentaron un incremento de la actividad de los enzimas hepáticas aspartato-aminotransferasas (AST, EC 2.6.1.1.), fosfatasa-alcalina (AP, EC 3.1.3.1) y de gammaglutamil-transferasa (GGT, EC 2.3.2.2), además de provocar el incremento de la bilirrubina total y los niveles de colesterol (Haschek y colaboradores, 1992). Similarmente otras alteraciones se observaron en los niveles de alanina-aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2.), AST, AP, GGT. Arginasa, bilirrubina y los niveles de colesterol fueron significativamente elevados en cerdos alimentados con cantidades entre 101 y 175 mg/kg de fumonisinas totales en piensos (Riley y colaboradores, 1993). Las mediciones de estos parámetros pueden ser utilizados como indicadores inespecíficos de la toxicosis a las fumonisinas.

El promedio de tiempo antes de la aparición de los signos clínicos, es de 4'4 días. En muchos casos la

aparición de los primeros signos clínicos se puede dar de manera súbita y asintomática. La morbilidad fue del 26%, mientras la mortalidad está cifrada en 70%. El tiempo empleado para la aparición de los primeros signos clínicos por los animales afectados fue de 3'6 días. El interés del estudio de Osweiler y colaboradores (1992), consistía en comprobar un número de muestras contaminadas con *F. moniliforme* y *F. proliferatum*, cual era el contenido de fumonisinas. En las muestras analizadas se encontraron concentraciones de 20 hasta 330 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 . En el mismo estudio, una cantidad de maíz esterilizado fue inoculado con cultivos de *F. moniliforme* y se mezcló en proporciones iguales de maíz sin contaminar y contaminado naturalmente. Los cerdos que fueron alimentados con esta mezcla resultante conteniendo hasta 17 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 , durante 5 días, desarrollaron EPP y murieron. Mientras los cerdos que sobrevivieron, desarrollaron una hepatotoxicosis sub-aguda con una necrosis hepatocelular individual y hepatomegalocitosis, además de incrementar el número de mitosis.

Haschek y colaboradores (1992) han propuesto una explicación para los casos observados de EPP. De acuerdo con su teoría, el metabolismo de esfingolípidos está alterado por las lesiones causadas en la necrosis hepatocelular, lo que permite el paso de material de las membranas hacia el sistema circulatorio. Este material es fagocitado por los macrófagos intravasculares pulmonares (PIMs), los cuales están presentes en un gran número siendo los responsables del inicio de los mediadores de la inflamación. Los órganos blanco de las patologías asociadas a la presencia de micotoxinas de *Fusarium* en porcinos son pulmones, hígado y páncreas. A dosis bajas, la enfermedad hepática progresiva es el efecto más importante, mientras a altas dosis el edema pulmonar agudo es la patología principal que indefectiblemente finaliza con la muerte.

1.2.4.3. Toxicosis de fumonisinas en aves de corral.

Estudios de los efectos tóxicos de las fumonisinas sobre las especies avícolas se han desarrollado mediante la utilización de extractos acuosos de cultivos de *F. moniliforme*, como fuente única de fumonisinas. En estos estudios, piensos de aves de corral no contaminadas fueron mezcladas con cultivos de *F. moniliforme* y cantidades conocidas de fumonisinas de manera a alcanzar las concentraciones en dieta de las micotoxinas. El promedio de la concentración de FB_1 en el material de cultivo es usualmente bajo, 2 mg/g (0'2 %) o menos del total. Por consiguiente, para conseguir las concentraciones dietéticas tóxicas, las cantidades de material de cultivo necesaria son muy altas y en la mayoría de los casos constituye más del 10% de la dieta experimental (Weibking y colaboradores, 1993). A partir de las concentraciones de FB_1 , en el material de cultivo que es de alrededor del 0'2%, el resto de la mezcla (99'8%) constituye una fuente de metabolitos secundarios de *Fusarium*, lo que puede explicar de alguna manera efectos inesperados encontrados en los tratamientos. Norred y colaboradores en 1991(a), demostraron la presencia de algunos metabolitos tóxicos de *Fusarium* con un carácter hidrosoluble, éstos desarrollan un rol muy importante debido a la presencia de un amplio rango de signos clínicos. Los niveles usuales de FB_1 en maíz iban desde 0 a 5 mg/kg, que se mezclaba con maíz no contaminado hasta en un 50 % de la ración, lo cual daba niveles de concentración máximos de hasta 2'5 mg/kg de FB_1 , en piensos para aves de corral. En un estudio, solamente 6 de las 22 muestras de las aves de corral alimentadas con piensos, presentaron FB_1 y 2 de las 22 muestras FB_2 . Los valores detectados fueron de 0 a 0'48 mg/kg de FB_1 , con un promedio de 0'235 mg/kg, en aquellas muestras que dieron positivo. Por, consiguiente la significancia práctica de los estudios utilizando los niveles de FB_1 , los cuales son extremadamente difíciles de encontrar en el maíz naturalmente contaminado, es hasta cierto punto cuestionable.

Ledoux y colaboradores (1992), alimentaron a pollos de 1 día, con piensos contaminados con material de cultivo de modo a alcanzar concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg/kg de pienso de FB_1 durante 21 días. Los promedios de ganancia de peso diarias fueron disminuyendo a medida que se aumentaba cantidad de FB_1 , mientras que el hígado y otros órganos aumentaban de tamaño y peso.

Las lesiones histológicas, fueron en algunos de los pollos que recibieron dosis de 200 a 300 mg/kg de peso corporal de FB_1 , atrofia cortical del timo, necrosis multifocal hepática, hiperplasia biliar, hipertrofia de las células de Kupffer y ensanchamiento de la zona de proliferación de los cartílagos tibiotarsianos.

Niveles séricos de calcio, colesterol y la actividad de AST se veían incrementados en presencia de altas concentraciones de fumonisinas en dieta. Con lo que se puede concluir acerca de este estudio que la presencia de FB_1 en la dieta de pollos de 1 día, tiene efectos directos en el crecimiento y desarrollo.

Weibking y colaboradores (1993), llevaron a cabo experimentos en los que durante tres semanas, alimentaron a pavos de 1 día de edad, con cantidades de 0, 100 o 200 mg/kg de pienso de FB_1 , mezclados con cultivos de *F. moniliforme*. Las ganancias de peso y la utilización de los alimentos decrecen linealmente junto con el aumento de la concentración de fumonisinas. Pero existe un aumento de peso en hígado, riñones y

páncreas correlativamente al aumento de la concentración de fumonisinas en la dieta, no así en bazo y corazón. La actividad serológica de AST, se incrementa con la cantidad de FB₁, mientras que los valores de colesterol y fosfatasa alcalina, volumen celular de los hematíes y la hemoglobina se ven disminuidos. Las lesiones histopatológicas en las aves de corral que eran tratadas con FB₁, incluían hiperplasia biliar, hipertrofia de las células de Kupffer, atrofia cortical del timo, además de una moderada degeneración y proliferación de zonas hipertróficas en los tibiotsarsianos. También se pueden dar otras lesiones tales como ulceraciones en el tracto digestivo, degeneración y necrosis miofibrilar en el corazón, lesiones multifocales en hígado e inflamación de los hepatocitos y finalmente una necrosis focalhepatocelular.

De todas maneras se ha de tener en cuenta que los diferentes cultivos de *F. moniliforme*, pueden producir otros metabolitos tales como la moniliformina, fusarina, ácido fusárico. Por lo cual muchas veces, al utilizar materiales naturalmente contaminados o materiales que contengan toxinas, los resultados pueden llegar a ser difíciles de interpretar.

1.2.4.4. Toxicosis de fumonisinas en ganado bovino.

El ganado bovino parece ser el menos susceptible a los efectos adversos de las fumonisinas en maíz naturalmente contaminado, a diferencia de los cerdos y caballos.

Osweller y colaboradores (1993), evaluaron los efectos del empleo de piensos contaminados con fumonisinas, en el desarrollo del ganado alimentado con concentraciones de 15, 31 o 148 mg/kg durante 31 días. Al cabo de este tiempo, ciertos valores serológicos como AST, GGT, lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27), bilirrubina y colesterol, sufrieron un aumento. La histopatología determinada incluye lesiones hepáticas leves con degeneraciones hidrópicas microscópicas e inflamación de hepatocitos. Finalmente en terneros que recibieron las dosis más altas se observaron blastogénesis linfocitaria, sin afectar demasiado las funciones inmunológicas. Por lo que podemos concluir con esto que las dosis tóxicas para el ganado porcino y equino, aparentemente no afectan de la misma manera al bovino y tan solo causa alteraciones en el hígado y la función inmune.

1.2.4.5. Cáncer de esófago en humanos (CE).

La región de Transkei en el sur de África, incluyen algunas áreas donde los rangos anuales de la incidencia del cáncer de esófago está muy por encima de la media mundial (CE). Esto obliga a pensar en factores causales que podrían ser de origen genético, ambientales, nutricionales o la influencia de los estilos de vida.

Actualmente existen muchas teorías acerca de las causas, para este tipo de cáncer, entre ellas tendríamos presencia de trazas de elementos además de deficiencias nutritivas, hábitos dietéticos, nitrosaminas, consumo de alcohol y uso del tabaco. Todos estos agentes causales son potencialmente responsables de algún tipo de tumoración en el tracto digestivo.

Ahora bien, en ésta zona de África y también en zonas de China, existen fuertes correlaciones epidemiológicas entre la incidencia del CE y la presencia de alimentos y piensos contaminados con *F. moniliforme* (Marasas y colaboradores, 1979, 1988a; Cheng y colaboradores, 1985). Las personas afectadas en dichas regiones, consumían en la dieta alimentos basados en maíz y productos derivados. El maíz, fue cultivado, cosechado en las parcelas, y almacenados en el exterior con visibles signos de presencia de hongos.

También en Transkei, maíz muy contaminado con hongos es utilizado en procesos fermentativos caseros para la obtención de cervezas, debido a un sabor especial que le otorga estos granos.

Estos hechos llevan a pensar que las fumonisinas son una posible causa del CE. Estudios posteriores aportaron más evidencias sobre la asociación de las fumonisinas con el CE. Así, muestras de maíz sano y contaminado, de distintas áreas de Transkei, fueron analizadas para detectar la presencia de micotoxinas de *Fusarium*, incluyendo a las fumonisinas. En muestras contaminadas, las especies de *Fusarium* predominantes fueron *F. moniliforme* y *F. graminearum*, las cuales tenían una similar ocurrencia. En las regiones donde la ocurrencia del CE, era alta, predominaba *F. moniliforme* (Díaz y Boermans, 1994).

1.2.5. Métodos analíticos.

1.2.5.1. Generalidades.

A pesar que existe un progreso significativo en el campo de la metodología analítica empleada en la detección y cuantificación de las fumonisinas y que los límites de detección de alguno de los métodos cromatográficos empleados actualmente, como puede ser la cromatografía líquida y la cromatografía en capa fina, se encuentran por debajo de las concentraciones estimadas como causales de toxicidad en equinos y porcinos (Ross y colaboradores, 1992), existen aún distintos aspectos a mejorar como son la extracción de la toxina de diferentes sustratos, la recuperación obtenida después de los procedimientos de purificación, la estabilidad de los derivados obtenidos previos al análisis por HPLC y finalmente la separación de estos derivados de las posibles interferencias que puedan aparecer en los cromatogramas.

También restan por mejorar otros aspectos tales como la reducción de los costes en tiempo y dinero de los métodos de análisis.

Ya que toda la metodología de análisis de contaminantes en muestras sólidas pasa usualmente por tres etapas, una primera etapa de extracción seguida de una purificación y finalmente un análisis de la muestra obtenida, es importante hacer un estudio profundo de los tres procesos cuando se quiere proponer mejoras sobre el mismo.

1.2.5.2. Métodos de extracción.

Para dicha etapa lo más frecuente hasta la fecha ha sido la utilización de una mezcla (metanol, agua)= 3:1, v/v (Plattner y colaboradores, 1990; Scott y Lawrence, 1992; Shephard y colaboradores, 1990 y 1992).

Existen pero algunos autores que afirman que con mezclas (acetoneitrilo, agua)= 1:1, v/v, los resultados de las extracciones de las muestras naturalmente contaminadas son mejores (Bennett y Richard, 1992), a pesar que otros autores afirman lo contrario (Sydenham y colaboradores, 1990b). De todas maneras ambas tendencias coinciden en que las extracciones se deben llevar a cabo con tiempos de agitación y homogeneización adecuadamente largos.

Albert y colaboradores (1993), evaluaron factores como el pH de la mezcla de extracción y el disolvente utilizado. La mezcla elegida para la extracción fue (metanol, agua)= 3:1, v/v seguida de un paso con una partición mediante un disolvente de mediana polaridad (cloroformo) acidificado, antes de la purificación final, mediante una minicolumna de fase inversa (C₁₈). Las conclusiones que finalmente llegaron a establecer fueron:

- a) el pH inicial de la mezcla de extracción determinaba la eficiencia con la cual los componentes eran recuperados de la muestra (un pH= 3'5 resultó ser óptimo en las condiciones empleadas).
- b) la polaridad intrínseca de cada una de las fumonisinas a un pH específico, jugaba un papel importante en la recuperación de las toxinas durante los siguientes pasos de purificación, así la recuperación de la FB₁, se veía favorecida por ser más polar que la FB₂ y FB₃.
- c) la presencia de componentes que interfieren y que finalmente se co-extraen con las fumonisinas podía influir en la cuantificación de éstas.

Scott y Lawrence en 1994, alertaron acerca del hecho que con los métodos usuales de extracción mediante la utilización mezclas (metanol, agua)= 3:1, v/v el porcentaje de recuperación de las FB₁ y FB₂ presentes en ciertos alimentos elaborados básicamente de maíz y sus derivados, no se mostraba muy buena, por lo que se hacían necesarios experimentos de control en la recuperación de cada tipo de alimentos analizados, hasta poder encontrar un sistema más aplicable universalmente.

1.2.5.3. Métodos de purificación.

Como se había mencionado más arriba, uno de los aspectos fundamentales en los procesos de análisis de las toxinas es la etapa de purificación final de los extractos.

Resultan también muy interesantes las pruebas realizadas de acuerdo a los tipos de columnas utilizadas en las fases de purificación. Bennett y Richard en 1994, analizaron este factor mediante el empleo de dos tipos

de columnas, una de intercambio iónico fuerte (SAX) y otra de fase inversa (C₁₈).

Los resultados obtenidos con ambos rellenos, resultaban en una purificación parcial de los extractos de las fumonisinas, siendo los porcentajes de recuperación diferentes: 92 a 95% para la columna de intercambio iónico (SAX) y de 83 a 88% para las columnas de fase inversa (C₁₈). El primer tipo de columna daba un extracto más limpio que eliminaba más eficientemente los componentes que interfieren en los extractos. Con éste sistema las fumonisinas debían ser eluidas de manera más lenta (1 ml/min) y el pH del extracto debía estar comprendido entre 6 a 7 con tal de obtener una buena reproducibilidad en las recuperaciones efectuadas. Thiel y colaboradores en 1993, describieron resultados similares para las columnas de tipo SAX respecto a las columnas de fase inversa (C₁₈), cuando el flujo empleado era inferior a 2 ml/min y el pH era mayor que 5'8.

A pesar de éstas diferencias ya indicadas podemos encontrar algunos autores que defienden cada uno de los procesos ya mencionados más arriba. Así Pestka y colaboradores (1994), Scott y Lawrence (1992 y 1994), Shephard y colaboradores (1990), Sydenham y colaboradores (1990b), Thiel y colaboradores (1993), Velázquez y colaboradores (1995) prefieren las resinas de intercambio iónico (SAX), mientras que Alberts y colaboradores (1993), Murphy y colaboradores (1993), Wilson y colaboradores (1990), prefieren las columnas de fase inversa (C₁₈)

Recientemente, el empleo de columnas de inmunoafinidad, ha demostrado ser aplicable para los procedimientos de purificación (Hansen y colaboradores, 1992), aunque en éste caso no hay en la literatura un conjunto importante de autores que las hayan utilizado.

1.2.5.4. Métodos de análisis.

Los métodos desarrollados para la detección y determinación de las fumonisinas, generalmente suelen emplear técnicas tales como la cromatografía en capa fina, cromatografía en capa fina de alta resolución, cromatografía líquido-líquido de alta resolución, cromatografía de gases y finalmente los métodos inmunoquímicos. También se han empleado varias técnicas de espectrometría de masas (EM) con este fin (Korfmacher y colaboradores, 1991; Mirocha y colaboradores, 1992a).

Uno de los aspectos a tener en cuenta en el análisis cromatográfico de fumonisinas es la necesidad de utilizar sistemas de revelado para su detección. Así en la cromatografía en capa fina y cromatografía en capa fina de alta resolución, se utiliza, normalmente, una disolución de *p*-anisaldehído (Jackson y Bennett, 1990, Plattner y colaboradores, 1990; Ross y colaboradores, 1991, Sydenham y colaboradores, 1990a y Wilson y colaboradores, 1990). Si bien, también se ha empleado vainillina acidificada (Pittet y colaboradores, 1992). Este último sistema requiere la utilización de luz ultravioleta para la visualización de las manchas por fluorescencia.

El análisis por cromatografía de gases implica una hidrólisis inicial de las fumonisinas. Una vez hidrolizadas se han determinado los ácidos tricarbóxicos formados una vez esterificados con isobutanol (Sydenham y colaboradores, 1990a), si bien esto no permite la distinción entre los distintos tipos de fumonisinas. También se han analizado los aminopolioles de la hidrólisis, una vez formados sus derivados trimetilsililados (TMS) o trifluoroacetilados (TFA). En éstos casos el aminopentol y aminotetraol originados respectivamente a partir de la FB₁ y FB₂ pueden ser identificados muy bien por CG utilizando una columna capilar y un detector de ionización de llama, existiendo variaciones con acoplamiento con un EM (Jackson y Bennett, 1990; Plattner y colaboradores, 1990; Voss y colaboradores, 1990; Wilson y colaboradores, 1990). De todas maneras los derivados de TMS de la FB₂ y de la FB₃, dos aminotetraoles no han sido separados, mientras que los derivados de TFA, sólo se separan unos pocos segundos (Plattner y colaboradores, 1992).

La espectrometría de masas (EM) y su acoplamiento con otro espectrómetro de masas (EM/EM), han sido también utilizados para la identificación de la FB₁, previamente separados por cromatografía líquido-líquido (Chen y colaboradores, 1992).

Cabe citar aquí también que se han desarrollado mediante ensayos enzimáticos de inmunoabsorción directa o indirecta, anticuerpos con una cierta reactividad sobre la FB₁, FB₂ y FB₃, (Azcona-Olivera y colaboradores, 1992a y b). El compuesto formado, basándose en anticuerpos monoclonales, se vio que servía para la realización de "screening" de piensos contaminados con una cantidad >5µg/g de FB₁ (Azcona-Olivera y colaboradores, 1992b).

Sin duda el método más empleado hasta la fecha para el análisis de fumonisinas es la cromatografía

líquido-líquido de alta resolución (HPLC). Ahora bien, como las fumonisinas no absorben en la zona del espectro ultravioleta ni en la zona del visible, para su análisis por éstos métodos, son necesarias técnicas de derivatización de las muestras que contengan éstas toxinas.

La primera determinación cuantitativa de las fumonisinas en HPLC comprendía una detección en el espectro de UV a 230 nm de los correspondientes derivados maléicos (Harrison y colaboradores, 1990), y a pesar que esta técnica da buenos resultados en el análisis de cultivos de hongos (Alberts y colaboradores, 1990), no es suficientemente sensible para el análisis de las muestras contaminadas naturalmente. Para mejorar ésta sensibilidad se optó por la preparación de derivados fluorescentes.

Uno de los primeros reactivos empleados con este objetivo fue la fluorescamina. Este reaccionaba con el grupo NH_2 de las fumonisinas produciendo, dos picos como resultado de la formación de una mezcla en equilibrio entre los derivados ácido/alcohol y los lactónicos (Ross y colaboradores, 1991; Sydenham y colaboradores, 1990a; Wilson y colaboradores, 1990).

Un segundo reactivo introducido fue el *o*-ftaldialdehído (OPA). Este reactivo forma benzoderivados fluorescentes sobre la amina libre, los cuales presentan el inconveniente que se degrada rápidamente con el tiempo (< 2 min). A pesar de esto es el reactivo actualmente más utilizado para éste tipo de análisis (Visconti y Doko, 1994; Pestka y colaboradores, 1994). Se utiliza en estudios comparativos con métodos como el ELISA y CG-EM (Pestka y colaboradores, 1994) y también en estudios de puesta a punto de método de análisis oficiales a nivel internacional (Thiel y colaboradores, 1993).

Otro reactivo usado es el naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA), éste constituye una buena alternativa al OPA, siendo sus derivados significativamente más estables y con una mayor fluorescencia (Bennett y Richard, 1994), propiedades muy útiles a la hora de automatizar las inyecciones de los derivados. Este compuesto reacciona con las aminas primarias de las fumonisinas en presencia del ion cianuro para procurar la formación de benzoderivados (Bennett y Richard, 1994), el problema principal es el de trabajar con KCN. Scott y Lawrence en 1992 propusieron el uso de 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBF-F), para el análisis de fumonisinas después de su uso con aminoácidos (Watanabe e Imai, 1982). Con un tiempo de reacción de 1 min a 60 °C la sensibilidad del método permitía la detección de hasta 1 ng de la toxina. La estabilidad depende de la calidad del reactivo mientras que su vida media es de sólo 20 min. Scott y Lawrence, también realizaron una comparación con los derivados obtenidos con naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA-KCN), y observaron que las respuestas obtenidas fueron muy similares en un mismo material contaminado naturalmente. Dando valores de FB_1 y FB_2 de 1'7 y 0'50 $\mu\text{g/g}$ y de 1'8 y 0'35 $\mu\text{g/g}$ para (NBF-F) y (NDA-KCN) respectivamente.

Tenemos pues, que todos los reactivos empleados para el análisis de fumonisinas se aprovechan de la presencia del grupo amino en las mismas, al igual que ocurre en los métodos desarrollados para el análisis de aminoácidos.

1.3. El grupo amino.

El comportamiento de las aminas viene marcada por el par de electrones no compartido del nitrógeno, que confiere a dichos compuesto un carácter marcadamente nucleófilo. Si no se tienen en cuenta los efectos estéricos, tanto las aminas primarias como secundarias y terciarias tienen propiedades nucleófilas similares. La diferencia más importante reside en el hecho que, a diferencia de las aminas terciarias, las primarias y secundarias tienen un protón que puede perderse, una vez haya tenido lugar la adición nucleofílica. Por consiguiente, existe una distinción entre el camino que van a seguir las aminas primarias o secundarias respecto a las terciarias. Así, las primeras experimentan reacciones de adición-eliminación (adición nucleofílica seguida de la pérdida de un protón), mientras que las terciarias sólo dan reacciones de adición (Durst y Gokel, 1985). Este distinto comportamiento se puede observar en los procesos para la obtención de amidas, donde sólo las aminas primarias, secundarias reaccionan por ejemplo, con los haluros de ácido y forman amidas (Morrison y Boyd, 1990).

Otra vía para obtener amidas es hacer reaccionar las aminas con anhídridos de ácidos carboxílicos, éstas siguen un curso muy similar a las reacciones de los cloruros de ácido con aminas, aunque su velocidad es generalmente algo menor. Y así como las reacciones de los cloruros de ácido generan una molécula de cloruro de hidrógeno, las reacciones de los anhídridos de ácido generan una molécula de ácido carboxílico. Puesto que el ácido carboxílico liberado reacciona para formar una sal con la amina es necesario emplear un exceso de amina, para impedir que el ácido carboxílico interfiera en la reacción. Como ocurre en la reacción análoga de las

aminas con los haluros de acilo, se puede llevar a cabo la reacción en presencia de un equivalente de amina terciaria evitando así consumir un mol adicional de la amina reactiva (Streitwieser y Heathcock, 1987).

Igualmente se puede obtener de las amidas mediante la utilización de agentes acoplantes como las carbodiimidas. Estas permiten la formación de amidas a partir del ácido carboxílico y aminas, directamente, a temperatura ambiente y sin necesidad de una base terciaria (Benz, 1991).

Otro de éstos agentes acoplantes es el 1,1'-carbonildiimidazol, en este método inicialmente se hace reaccionar durante una hora el ácido con el 1, 1'-carbonildiimidazol, utilizando como disolvente la DMF seca, generándose el correspondiente anhídrido de ácido. Éste formará la amida después de adicionar la amina en el medio de reacción y dejarlo durante 3 días para que reaccione.

Otro proceso en el cual tiene importancia las propiedades nucleófilas de las aminas primarias y secundarias es en la formación de ureas a partir de carbamatos. Así recientemente se han descrito carbamatos con *N*-hidroxisuccinimida que reacciona con cierta facilidad con aminas primarias y secundarias (Nimura y colaboradores, 1986). Estos carbamatos activados resultan ser buenos candidatos para las reacciones de derivatización de aminoácidos y su posterior análisis.

El método más usual para la obtención de éstas sustancias consiste en hacer reaccionar un mol de amina con un ligero exceso de carbonato de succinimido (DSC), reactivo muy empleado en la síntesis de péptidos. El compuesto así obtenido se puede hacer reaccionar con otro compuesto con grupos amino, aunque estructuralmente diferente, dando así lugar a una urea asimétrica. Si el primer compuesto, posee anillos aromáticos puede resultar un candidato para preparar ureas con propiedades fluorescentes.

Una de las sustancias, que actualmente se ha comercializado para el análisis de aminoácidos es el carbamato de 6-aminoquinoleil-*N*-hidroxisuccinimidilo (AccQ.Fluor) (Cohen y Michaud, 1993). Este nuevo reactivo, parece superar los problemas de estabilidad, reproducibilidad e interferencia de picos propios de los demás sistemas de análisis de aminoácidos por HPLC. Los derivados obtenidos son estables y la sensibilidad se muestra bastante alta.

Si bien las características de los grupos aminos libres pueden ser útiles para la preparación de muchos productos de interés, a veces, puede ser necesario evitar su reactividad. Para ello se puede hacer reaccionar las aminas con distintas sustancias químicas que dan lugar a derivados estables frente a ciertas condiciones de reacción. El uso de grupos protectores de modo a poder dirigir las reacciones, está muy bien documentado en el campo de la Química Orgánica, siendo quizás el libro de Kocienski, 1994, uno de los más recientes y mejor documentados dentro de éste campo. Una de las metodologías descritas en esta monografía, y en otras muchas, para la protección de aminas es una reacción con productos que transfieren a la amina el grupo 1,1'-dimetiletoxicarbonilo (*tert*-butoxicarbonilo, BOC), grupo que es estable en medio básico y que se elimina fácilmente por tratamientos con ácidos en condiciones suaves.

2. Objetivos

Objetivos.

1. Obtención de fumonisinas a partir de extractos crudos producidos por hongos.
2. Mejorar las técnicas de análisis de las fumonisinas en muestras de maíz naturalmente contaminadas, mediante modificaciones en los procesos de extracción, purificación y derivatización.
3. Preparación de derivados con estructuras tipo carbamato, mediante el empleo de carbonato de disuccinimido (DSC).
4. Estudio de la formación de compuestos tipo urea mediante la reacción entre carbamatos y octilamina. Efecto de diversos factores en sus respuestas cromatográficas.
5. Aplicación de carbamatos activados a las reacciones de derivatización de las fumonisinas.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de fumonisinas.

3.1.1. Experimental.

Existen una serie de materiales y reactivos comunes en varias de los procesos llevadas a termino y que se relacionan a continuación.

Algunos disolventes empleados fueron purificados para su posterior utilización tales como se indica a continuación: **acetonitrilo**, se seca con cloruro de calcio anhidro y se destila a 30 Torr y 70 °C. Se recoge sobre tamices moleculares de 3 Å.

Cloroformo destilado, a presión atmosférica.

Hexano destilado, se destila a presión atmosférica.

Metanol destilado, se destila a presión atmosférica.

Agua (grado HPLC), se obtiene mediante un sistema MilliQ, marca Millipore, con filtro a 0'22 micras.

Ácido Trifluoroacético, grado pro-análisis.

Placas para cromatografía en capa fina. Se han utilizado cromatofolios con soporte de aluminio, espesor de la sílica gel de 0'2 mm y con indicador de fluorescencia (254 nm).

Las fases cromatográficas empleadas en cromatografía líquida han sido sílica gel 60 (0'063-0'200 mm), para la columna de tipo "flash", sílica Gel tipo 60H, (5-40 m) para las columnas tipo "dry-flash", una resina de poliestireno (XAD-2) y una fase inversa (C₁₈) Bondapak (37-55 μm).

Un sistema cromatográfico líquido-líquido de alta resolución (HPLC) compuesto por dos bombas, inyector tipo RHEODYNE con bucle de 20 μl, detector ultravioleta y detector de fluorescencia con filtros de emisión de onda fija e intercambiables. Todos estos componentes son de la marca APPLIED Biosystem. Integrador-graficador HEWLET PACKARD 3396 Serie II y columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0,39 x 15 cm).

Un segundo sistema cromatográfico líquido-líquido de alta resolución (HPLC), compuesto por una bomba, un controlador de fase móvil con dispositivo para gradiente cuaternario, un dispositivo automático de inyección de muestra, detector de ultravioleta de diodos, soporte informático Milenium versión 2.1, columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0,39 x 15 cm), todos estos componentes son de la marca WATERS. Millipore Co. Colector de fracciones para cromatografía preparativa marca PHARMACIA LKB.

Otros equipos que se utilizan en ésta parte del trabajo son un horno de bolas marca BÜCHI, evaporador rotatorio marca BÜCHI; pHmetro; agitador orbital; estufa de secado (200 °C) con circulador de aire y un molinillo para granos de café marca TAURUS.

3.1.2. Métodos de obtención de fumonisinas.

3.1.2.1 Obtención de los extractos crudos de cultivos.

Se utilizan extractos crudos de cultivos de *Fusarium* sp, que fueron proveídos por el Departament de Tecnologia d'Aliments, Universitat de Lleida.

3.1.2.2. Extracción de los cultivos de *Fusarium proliferatum*.

A cada uno de los erlenmeyers de 500 ml con 100g de maíz cada uno y conteniendo los cultivos obtenidos producto de la inoculación de cepas toxigénicas en el medio de cultivo, se añaden 150 ml de agua bidestilada. Posteriormente se someten a agitación orbital durante 48 h, de modo a romper las hifas que confieren una consistencia "impermeable" a los cultivos de *Fusarium*. La agitación orbital se realiza a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se filtra con papel Whatman nº 4. El filtrado acuoso así obtenido

se guarda. Los residuos se someten a una re-extracción, mediante el mismo procedimiento, los filtrados se unen y se lleva a sequedad en rotavapor.

3.1.2.3. Purificación de los filtrados acuosos.

Una vez obtenido el residuo seco de los cultivos de *Fusarium*, se procede a la extracción de las toxinas según el método propuesto por Cawood y colaboradores en 1991, con algunas modificaciones. En una primera fase los filtrados acuosos se extraen con (3 x 200 ml) de acetato de etilo destilado, para procurar la extracción de todos los compuestos de carácter menos polar. La fase orgánica producto de las extracciones se desecha, no así los filtrados acuosos que se llevan a sequedad en rotavapor, para posteriormente someterlos a las sucesivas purificaciones cromatográficas.

3.1.2.3.1. Purificaciones cromatográficas.

Los extractos acuosos secos se pesan y suspenden en una mezcla (metanol, agua)= 1:3, v/v y se lleva a pH=2'7 mediante la adición controlada de HCl concentrado. El extracto crudo así re-suspendido se pasa por una primera columna que contiene como relleno una resina apolar de poliestireno (XAD-2). La relación (producto, fase estacionaria) empleada es 8:1, p/p. La elución del extracto se realiza mediante un gradiente compuesto por mezclas de (metanol, agua)= 1:3 y 1:1, v/v y finalmente sendos volúmenes de metanol. Las fracciones metanólicas así obtenidas se llevan a sequedad en rotavapor y se pesan.

Estas fracciones metanólicas se pasan por una segunda columna, pero utilizando de relleno sílica gel 60 (0'063-0'200 mm), con la cuál se prepara una columna tipo "flash". De fase móvil se utiliza una mezcla de (cloroformo, metanol, ácido acético)= 6:3:1, v/v/v, con una relación (producto, fase estacionaria)= 1:30, p/p. Las fracciones obtenidas se juntan en función de la toxina mayoritaria que presentan, se llevan a sequedad en rotavapor y se pesan.

Las fracciones, así obtenidas se someten a otra columna "flash" en idénticas condiciones.

Una vez purificadas por la columna "flash", los extractos se pasan por una columna que contiene de relleno una fase inversa (C₁₈), se prueban dos mezclas eluyentes una de ellas compuesta por (metanol, agua)= 3:1, v/v y otra compuesta por (metanol, agua) = 3:1, v/v con el agregado de ácido trifluoroacético al 0'1% en volumen. Finalmente, las fracciones obtenidas que tienen una toxina en mayor porcentaje se juntan, se llevan a sequedad y se pesan. En ambos casos se utilizan una relación (producto, fase estacionaria)= 1:30, p/p.

Una última purificación se realiza mediante una columna "flash-dry", que es una variante de las columnas tipo "flash" utilizando para éste efecto sílica Gel 60H (5-40 μ m). En este caso se va pasando secuencialmente, mediante aplicación de vacío de trompa, volúmenes discretos de fase móvil. La composición de partida es (cloroformo, metanol, ácido acético)= 68:31:1, v/v/v y se llega hasta 50:50:1, v/v/v. Las fracciones se unen de acuerdo a su pureza y seguidamente se llevan a sequedad y se pesan.

El seguimiento de las fracciones obtenidas mediante las distintas purificaciones cromatográficas, se realiza por HPLC mediante el método de Shephard y colaboradores (1990), con mínimas modificaciones.

La pureza final de las toxinas extraídas en las distintas columnas y sucesivas fracciones, se comparan frente a patrones de FB₁ y FB₂ de concentración conocida.

Para el presente trabajo experimental se considera la pureza de los patrones del 100%.

[Figura 3-1](#)

3.2. Extracción de las fumonisinas en muestras de maíz para su análisis.

3.2.1. Preparación de las muestras de maíz.

Se muelen 5 kg de maíz, de modo a obtener un tamaño de grano uniformemente fino, se homogeneiza

el total molido y de aquí se recogen sub- muestras de 100 g. Cinco de estas muestras se utilizan para los estudios posteriores.

3.2.2. Extracción de fumonisinas en muestras de maíz de 25 g.

La extracción de estos 25 g se realiza según el método propuesto por Shephard y colaboradores (1990), modificado mínimamente.

Se homogeneizan 100 g de maíz molido, de los cuales se pesan 25 g y se suspenden en 50 ml de una mezcla (metanol, agua)= 3:1, v/v, se dejan con agitación magnética durante 30 min. Luego se filtran con papel Whatman n° 4.

La purificación, se realiza con minicolumnas de resina de intercambio iónico (Sax) de 3 ml. Se realiza un pre-acondicionamiento de la columna con 5 ml de metanol, seguidos de 5 ml de (metanol, agua)= 3:1, v/v, cuidando de no dejar secar la fase estacionaria.

Una vez acondicionada la columna se adiciona a la misma 10 ml del extracto filtrado, obtenido anteriormente.

Seguidamente se procede a realizar sendos lavados con 8 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, seguidos de 3 ml de metanol. La elución final de las muestras se realiza con (3 x 7 ml) de ácido acético al 0'5% en metanol. Recogiéndose los lavados en sendos tubos.

Durante todo el proceso se realiza la elución de las minicolumnas con la utilización de vacío.

Finalmente se juntan las fracciones de los lavados con ácido acético y se llevan a sequedad en un rotavapor (40 °C y 30 Torr). Se retoman con 1 ml de metanol, y se vuelven a evaporar en corriente de N₂ a 60 °C en baño de arena. Este paso se repite tres veces más con la finalidad de eliminar los restos de ácido acético que puedan afectar los resultados del posterior análisis por HPLC.

El residuo sólido o sobrenadante obtenido después de los procesos iniciales de extracción se somete a un proceso re-extractivo y de purificación. La muestra final se analiza también por HPLC.

[Figura 3-2](#)

3.2.3. Extracción de las fumonisinas b₁ y b₂ en 5 g de maíz.

El siguiente sistema de extracción, se realiza según Scott y colaboradores (1992).

A partir de una sub-muestra de 100 g se obtienen 5 g de maíz y se extraen con 10 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, mediante agitación magnética durante un período de 30 min a 60 % de la velocidad del agitador. Se filtra con papel Whatman n° 4.

Para la purificación de la disolución de obtenida se sigue la misma metodología que en el apartado anterior. La variante con respecto al sistema anterior en que aquí se utilizan el volumen total extraído.

El residuo sólido o sobrenadante obtenido después del proceso de filtración inicial, se somete a una re-extracción y nueva purificación, igual que en el apartado 3.2.2.

Las dos muestras así obtenidos se analizan por HPLC.

[Figura 3-3](#)

3.2.4. Extracción y purificación de las muestras de 1 g de maíz.

En primer lugar, se procede al acondicionamiento de las columnas de intercambio iónico (Varian Sax Elut) igual que en el apartado (3.2.2.).

Después se pesa una muestra de 1 g de maíz a partir de una de las sub-muestras de 100 g. Posteriormente la muestra de maíz se introduce en la columna y, una vez acondicionada mediante una suave presión, se coloca una frita. Seguidamente se adiciona a la columna un volumen de 1'5 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, cubriendo todo el maíz con este disolvente. Se deja la mezcla en contacto con el maíz durante 1 hora, al cabo de la cual, se eluye la columna.

Posteriormente se eluye de igual manera que en los casos interiores. Primero con 8 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, y luego 5 ml de metanol.

Finalmente se eluye la columna con una disolución de ácido acético al 0'5 % en metanol (4 x 7 ml). Todo proceso de elución se realiza mediante vacío en la cubeta para aumentar el flujo de los eluyentes por la fase estacionaria.

Las cuatro fracciones ácidas obtenidas se llevan por separado a sequedad en rotavapor (40 °C, 30Torr). Posteriormente se retoman con un volumen de 1 ml de metanol, y se re-evaporan con una corriente de N₂ calentado a 60 °C en baño de arena.

Finalmente se disuelven en metanol y se pasan por un filtro de 0'45 micras, para su posterior análisis por HPLC.

[Figura 3-4](#)

3.3. Análisis del contenido de fumonisinas mediante HPLC.

3.3.1. Aspectos generales.

3.3.1.1. Preparación de los patrones de fumonisinas.

Se realizan partiendo de una disolución "madre" de 500 g/ml, preparada a partir de patrones de fumonisinas suministrados por el centro "CSIR, Division of Food Science and Technology", Pretoria, Sudáfrica. A partir de aquí se preparan disoluciones de 40, 20, 10, 1 y 0'5 µg/ml, en distintos disolventes tales como metanol y acetonitrilo y una mezcla de (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v. Todos los disolventes empleados son de grado HPLC.

3.3.1.2. Preparación de las curvas de calibración.

La preparación de una curva de calibración se realiza mediante la utilización de patrones de distintas concentraciones de FB₁ y FB₂, tratadas con el reactivo correspondiente e inyectadas en el HPLC. Las inyecciones en el cromatógrafo de HPLC se realizan por triplicado obteniendo una curva de calibración para cada serie de patrones disueltos en los distintos disolventes.

Las curvas se construyen dibujando las áreas de los picos medidas en mV contra las concentraciones de las FB₁ y FB₂ expresadas en µg/ml.

3.3.1.3. Cálculo de las concentraciones de FB₁ y FB₂ en maíz.

La concentración de las fumonisinas en las disoluciones provenientes de la purificación, (*S*) se calcula a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos y de su asociación con los valores en las rectas de calibración.

Una vez cuantificado el contenido de las fumonisinas en las muestras inyectadas, falta realizar la determinación de la concentración de las muestras del maíz. Para llegar a este resultado se tendrán en cuenta todos los factores de dilución y de concentración a que se han sometido las muestras de maíz durante la extracción y purificación. Finalmente se expresará el resultado respecto al peso inicial del maíz empleado durante la extracción.

La expresión utilizada para efectuar los cálculos del contenido de fumonisinas en las muestras de maíz es la siguiente.

$$C (\mu\text{g/g}) = S.V.D/W.A$$

V = volumen del disolvente utilizado en la extracción del maíz (ml).

D = volumen en que se ha disuelto la muestra una vez purificada (ml).

W = peso de la muestra de maíz (g).

S = corresponde a la concentración de las fumonisinas en la disolución a partir de la cual se obtiene el derivado.

A = volumen de la solución obtenida después de extraer el maíz y purificado a partir de una columna de intercambio iónico (ml).

3.3.1.4. Cálculo de los límites de detección.

Los límites de detección se calculan a partir de los dos sistemas más empleados en la bibliografía.

3.3.1.4.1. Método del "ruido de fondo".

En éste caso se analiza una muestra que denominaremos "blanco" cuyos contenidos de toxina no sean detectables por nuestro sistema y una muestra en la que se hayan conseguido las mínimas respuestas. Inicialmente se inyecta la muestra "blanco" y se desarrolla el cromatograma hasta un tiempo superior al de detección de las toxinas, seguidamente se calcula la altura alcanzada por la línea de base en distintos tiempos y se promedia. Finalmente se inyecta la muestra con la toxina y se mide la altura.

Los cálculos se realizan mediante la siguiente expresión:

$$C (\text{ng}) = (q/h)h'.3$$

c = cantidad de toxina detectable, medida en ng.

q = cantidad de toxina inyectada, medida en ng.

h = altura del pico de toxina medida en mm.

h' = altura del ruido de fondo, medida en mm.

3.3.1.4.2. Método de la "recta de calibración".

En éste método el cálculo del límite de detección, para cada una de las toxinas y cada uno de los reactivos utilizados, se basa en la recta de calibración obtenida (Miller y Miller, 1993).

El límite de detección se calcula de la forma siguiente: a partir de la ordenada en el origen (*b*) y la desviación estándar del blanco (S_B), se calcula la ordenada $y = b + 3S_B$ (si $b < 0$ se considera $b = 0$). Dicho valor se sustituye en la correspondiente recta de regresión (recta tipo $y = ax \pm b$), y se encuentra el valor de la "x" que se toma como "límite de detección del análisis".

3.3.1.5. Análisis estadístico.

Los datos se analizan mediante el uso del programa Statgraphic versión 6.1. (Statistical Graphics Corp.; Rockville, Maryland) y SAS system versión 6.03 (SAS Institute, Cary, NC).

3.3.2. Análisis del contenido de toxinas empleando OPA

3.3.2.1. Preparación del reactivo de derivatización, *o* -ftaldialdehido (OPA).

Se disuelven 40 mg de *o* - ftaldialdehido en 1 ml de metanol. Luego se diluyen con 5 ml de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Finalmente se agregan 50 l de 2 -mercaptoetanol.

Se debe tener en cuenta que la estabilidad del OPA es de solo una semana. Otros cuidados a tener en cuenta son, depositar el reactivo en un sitio refrigerado y en un frasco oscuro.

3.3.2.2. Preparación de los derivados.

Se transfieren 50 μl de la muestra a analizar a un vial, luego se le agregan 200 μl del reactivo OPA. Se mezcla vigorosamente mediante un agitador-mezclador durante 20 seg. Antes del minuto y medio de haber realizado la mezcla, se inyecta el derivado en el cromatógrafo líquido-líquido.

3.3.2.3. Condiciones cromatográficas.

Previamente al acondicionamiento de la columna de fase inversa (C_{18}) Novapak (0'39 x 15 cm) se hace circular por la misma agua de calidad Milli-Q^R durante 30 min. Seguidamente se acondiciona con la fase móvil, que es una mezcla de (metanol, NaH_2PO_4 0'1 M)= 65:35, v/v, ajustada a pH=3'35, mediante la utilización de ácido ortofosfórico.

Para la elución de los analitos se procede a la utilización del siguiente gradiente de flujo. Se comienza con un flujo de 0'7 ml/min, durante los 6 primeros min, a los 7 min se eleva el flujo a 1'25 ml/min y se mantiene hasta el minuto 12, para volver a los 0'7 ml/min a los 13 min.

La detección se realiza por fluorescencia, utilizando una longitud de onda de excitación de 335 nm y un filtro de emisión de 418 nm.

Todos los disolventes y mezclas utilizadas, son previamente filtrados y desgasificados.

3.3.3. Análisis del contenido de fumonisinas empleando el reactivo AccQ.Fluor.

3.3.3.1. Preparación del reactivo AccQ.Fluor.

La preparación del reactivo se realiza según Cohen y Michaud (1993), (Ver apartado 3.4.1.1), con un mínimo de modificaciones. Luego de las caracterizaciones analíticas correspondientes y a las sucesivas purificaciones, se preparan para el uso en la derivatización una disolución madre de 3 mg/ml. Ésta se emplea en reacciones de derivatización tal cual o diluidas según el caso.

3.3.3.2. Reacción de derivatización con 20 μl de reactivo.

Para la reacción de derivatización, se cogen 50 μl de cada muestra purificada, disuelta en el disolvente correspondiente y se depositan en viales de 2 ml. Luego se adicionan 60 μl de tetraborato de sodio 0'1 M, se agitan en un mezclador durante 10 seg y posteriormente se agregan 20 μl de reactivo AccQ.Fluor disuelto en acetonitrilo (seco) a cada uno de los viales de reacción. Cada uno de los viales de reacción se somete a agitación durante 10 seg, incubación durante un minuto a temperatura ambiente y luego se calienta a 55 °C, en baño de arena durante 10 min.

3.3.3.3. Reacciones de derivatización con 40 μl de reactivo.

La derivatización se realiza igual que en el apartado anterior con la variante que para la derivatización por AccQ.Fluor, se utilizan 40 μl del reactivo.

3.3.3.4. Condiciones del análisis por HPLC.

Previo al acondicionamiento de la columna fase inversa (C_{18}) Novapak (0'39 x 15 cm) se hace circular agua de calidad Milli-Q^R, durante 30 min. Seguidamente se acondiciona con la fase móvil, que es una mezcla de (metanol, NaH_2PO_4 0'1 M)= 65:35, v/v, ajustada a pH=3'35, mediante la utilización de ácido ortofosfórico, siendo esta la fase móvil (A) y se dispone un recipiente solo con metanol, que se desempeña como fase móvil (B). Todos los disolventes y sus mezclas, se utilizan filtrados y desgasificados.

Para la elución de los analitos se procede a la utilización del siguiente gradiente, a un flujo constante de

1'0 ml/min.

Se comienza con una composición de 100% (A), durante los 5 primeros min, luego entre los 5 y 6 min se pasa a 55% (A), y se mantiene hasta el minuto 15, luego entre el minuto 15 y 16, se vuelve a 100% (A).

3.3.3.5. Estudios de reproducibilidad y estabilidad.

Veinte (20) muestras conteniendo concentraciones de 50 ppm, de FB₁ y FB₂ se preparan de acuerdo a lo que se describe en el apartado (3.3.1.1.).

Después de un período de 1, 4, 6, 24 y 48 h, estas muestras se analizan por HPLC, en grupos de tres reacciones y sus áreas se comparan con las de una reacción recién preparada.

3.3.4. Influencia del disolvente empleado en la disolución de muestras en el análisis por HPLC de FB₁ y FB₂.

100 g de una de las sub-muestras, obtenidas en el apartado (3.2.1), se extraen con 200 ml una mezcla (metanol, agua)= 3:1, v/v mediante agitación magnética durante 30 min. Por filtración se recupera la parte líquida de la mezcla y 5 alícuotas de 10 ml mismas se purifican según la metodología descrita en el apartado (3.2.2). Los residuos así obtenidos se redissuelven en 1 ml de metanol, acetonitrilo y mezclas de (acetonitrilo, agua)= 1:1, (acetonitrilo, NaHCO₃sat.)= 1:1, (metanol, NaHCO₃sat.)= 1:1. Todas las relaciones de las mezclas están expresadas en v/v.

Cada uno de éstas disoluciones se analizan utilizando los tres métodos descritos en los siguientes apartados 3.3.2.2; 3.3.3.2. y 3.3.3.3.

El análisis por HPLC, se realiza según los apartados 3.3.2.3. y 3.3.3.4.

3.4. Síntesis de aril derivados.

Experimental.

Existen una serie de materiales y reactivos e instrumental comunes en varias de las reacciones llevadas a termino y que se relacionan a continuación.

Placas para cromatografía en capa fina. Se han utilizado cromatofolios con soporte de aluminio, espesor de la sílica gel de 0'2 mm y con indicador de fluorescencia (254 nm).

Algunos disolventes empleados fueron purificados para su posterior utilización tales como: **dimetilformamida (DMF)**, se destila a 30 Torr y 70 ° C, se recogiendo sobre tamices moleculares de 3 Å y se guarda en un lugar oscuro.

Trifluoruro de boro en éter etílico, se destila mediante presión reducida, después de agregarle un 1% de éter etílico y una cantidad aproximada (1:10) p/v de hidruro de calcio, como agente desecante.

Acetonitrilo, se seca con cloruro de calcio anhidro y se destila a 30 Torr y 70 ° C recogiendo sobre tamices moleculares de 3 Å.

Piridina, se destilada a presión reducida y se recogen sobre tamices moleculares de 3 Å.

Hexano destilado, se destila a presión atmosférica.

Los puntos de fusión están sin corregir y se han determinado con un aparato, Gallenkamp con una precisión de 0'1 ° C.

Para la eliminación de los disolventes y purificación de algunos productos se ha utilizado un horno de bolas marca BÜCHI, modelo GKR 50.

Los espectros de RMN [¹H se han realizado con un espectrómetro Gemini 200 operando a frecuencias de 200 MHz. En algunos casos se utiliza también un espectrómetro Varian 300, operando a 300 MHz. Las señales de los desplazamientos químicos (δ) están indicados con referencia al TMS (tetrametilsilano) como

referencia interna y se expresan en partes por millón (ppm).

Los espectros de RMN [^{19}F] se han realizado mediante un espectrómetro Varian Unity 300 a 282 MHz, mientras que los valores están expresados en escala (δ) relativa al ácido trifluoroacético, que se utiliza de referencia externa (1'1% en CDCl_3).

Los espectros de RMN [^{13}C], se han registrado en un espectrómetro Varian XL 200 operando a frecuencias de 200 MHz y están indicados con referencia (δ) al tetrametilsilano (TMS) y vienen expresados en ppm. En todos los casos las multiplicidades observadas en la asignación de señales aparecen en el texto de la siguiente manera: s, singulete; t, triplete; c, cuadruplete; q, quintuplete; m, multiplete; dd, doble doblete; dt, doble triplete; dc, doble cuadruplete; dm, doble multiplete; sa, señal amplia; sc, señal compleja.

Los espectros de infrarrojo se han registrado con un espectrófotometro marca PHILIPS PU 9700. Utilizando la técnica de la pastilla de KBr.

Los espectros de masas (EM), se han realizado en un espectrómetro de masas marca Hewlett Packard serie 5989A, equipado con analizador cuadrupolo. La introducción de la muestra se ha realizado mediante la técnica de introducción directa (DIP). Las señales detectadas, se expresan en la relación (masa/carga) (m/z) a partir de espectros normalizados. Identificándose los fragmentos principales, tanto como el M^{1+} , M^{2+} y el ion molecular (M^+).

El sistema de cromatografía de alta resolución, está compuesto por una bomba provista de un sistema de gradiente cuaternario, un inyector automático, detector ultravioleta tipo fotodiodo, columna de fase inversa (C_{18})Novapak (0'39 x 15 cm) y soporte informático Millenium versión 2.1. Todos ellos de la marca Water Co.

3.4. Síntesis de derivados de *N*- hidroxisuccinimidilo.

3.4.1. Obtención de *N*- (quinolen-6-IL) carbamato de succinimido.

[Figura 3-5](#)

En un balón se pesan 1'5 g (6 mmol) de carbonato de di(*N*- succinimidilo) (DSC) y se disuelven en 43 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado). La disolución se lleva a reflujo y posteriormente mediante un embudo de adición, se agregan gota a gota durante 1 h, 30 ml de una solución conteniendo 0'75 g (5 mmol) de 6-aminoquinoleína (AMQ) en acetonitrilo. Finalizada la adición se deja a reflujo durante 30 min más.

La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente y se evapora a mitad de volumen en rotavapor. Se enfría a -20°C durante 24 h y los cristales de color marrón así obtenidos se lavan con acetonitrilo frío y se secan al vacío (0'01 Torr). La cantidad obtenida es de 0'48 g (1'78 mmol). Lo cual da un rendimiento del 35%, respecto a la aminoquinoleína.

El producto se identifica a partir de su punto de fusión y las siguientes características espectrales, que se corresponden a las descritas por Cohen y Michaud en 1993.

IR (KBr) (cm^{-1}): 3300 (NH); 1680 (C=O).

Pto. de fusión: 210-212 ° C (sin corregir) (Pto. de fusión: 210-215° C Cohen y Michaud, 1993)

RMN [^1H] (CDCl_3) (δ): 2'81 (s, 4 H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 7'56 (dd, 1H, $J= 3'2, 8'4$ Hz, aromático); 7'9 (dd, 1H, $J= 2'1, 8'4$ Hz, aromático); 8'22 (da, 1H, $J= 7'4$ Hz, aromático); 8'6 (da, 1H, $J= 6'7$ Hz, aromático); 8'45 (d, 1H, $J= 3'2$ Hz, aromático); 8'9 (dd, 1H, $J= 2'1, 6'7$, aromático); 10'58 (sa, 1H, NHCO).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 285 (M^+ , 0'02); 170 (90); 142 (86); 115 (100).

UV (CH_3CN) (nm): 236, 268, 316, 326.

3.4.2. Obtención de *N*- (2-naftilmetil)carbamato de succinimido.

[Figura 3-6](#)

Se pesan 1'04 g (3'6 mmol) de carbonato de di(*N*- succinimidilo) (DSC) y se disuelven en 45 ml de

acetonitrilo (seco y recién destilado). Posteriormente y mediante un embudo de adición, una solución de 0'46 g (2'91 mmol) de naftilmetilamina en 10 ml de acetonitrilo se agregan a temperatura ambiente y gota a gota. Al cabo de las cuales se deja reaccionando bajo agitación magnética durante 1 h más.

La solución obtenida se evapora a mitad de volumen en rotavapor. Se enfría a -20 ° C durante 24 h y se obtienen cristales de color blanco, que se lavan con acetonitrilo frío y se secan al vacío (0'01 Torr). Una parte de éstos cristales se redisuelve en acetato de etilo (destilado) y se lava con agua, se prueba secando o no la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, se lleva a sequedad y se redisuelve en acetonitrilo. Por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol)= 86:14, v/v y revelado con luz ultravioleta, se observa que el sólido presenta una sola mancha con un Rf= 0'8. La cantidad obtenida es de 0'3 g (1'09 mmol) Rendimiento del 37%, respecto a la naftilmetilamina.

El producto se caracteriza, a partir de los siguientes parámetros físico-químicos.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1740 (C=O).

Pto. de fusión: 163-165 ° C (sin corregir).

RMN [¹H] (CDCl₃) (δ): 2'8 (s, 4H, COCH₂CH₂CO); 4'9 (d, 2H, J= 5'8 Hz, CH₂NHCO); 5'6 (s, 1H, CH₂NH CO); 7'4 (sc, 2H, aromático); 7'56 (sc, 2H, aromático); 7'8 (sc, 1H, aromático); 7'98 (sc, 2 H, aromático).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 289 (M⁺, 0'01), 183 (56), 154 (30), 141 (100), 115 (25).

3.4.3. Obtención de 1-(2-naftilmetil)-3-octilurea.

Figura 3-7

Se pesan 40 mg (0'13 mmol) de **II**, y se disuelven en 4 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado), posteriormente se agregan 1'6 ml de una disolución de 25 mg/ml de octilamina en acetonitrilo (0'31 mmol) y finalmente se agrega el doble de volumen en acetonitrilo (seco y recién destilado), para disolver totalmente la mezcla y se deja bajo agitación magnética durante 48 h.

Se controla la evolución de la reacción mediante cromatografía HPLC, utilizando una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0'39 x 15 cm), una mezcla eluyente (metanol, NaH₂PO₄0'1M)= 3:1, v/v, con detector de fluorescencia l_{ex}= 290 nm, l_{em}= 389 nm, y flujo de 1'5 ml/min. Se para la reacción, se evapora a sequedad en rotavapor se retoma con 10 ml de acetato de etilo (destilado), posteriormente se lava con (3 x 5 ml) de agua bidestilada. Se evapora a sequedad en rotavapor, se retoma con 10 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado) y se enfría a -20 ° C durante 24 h para la cristalización del compuesto. La cantidad obtenida es 32 mg (0'102 mmol), siendo el rendimiento de 78%.

La caracterización analítica del compuesto se realiza teniendo en cuenta los siguientes parámetros físico-químicos.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 y 3320 (NH); 1620 (C=O).

Pto. de fusión: 170-172 ° C (sin corregir).

RMN [¹H] (CDCl₃) (δ): 0'8 (t, 3H, J= 6'1 Hz, CH₂CH₃(CH₂)); 1'2 [s, 12H, (CH₂)₆CH₃]; 3'14 (c, 2H, J= 6'1 Hz, NHCH₂CH₂); 4'32 (sa, 1H, CONHCH₂); 4'6 (sa, 1H, NH CONH); 4'8 (d, 2H, J = 5'5 Hz, ar-CH₂NH); 7'4 (sc, 2H, aromático); 7'45 (sc, 1H, aromático); 7'53 (sc, 1H, aromático); 7'81 (sc, 1H, aromático); 8'04 (sc, 1H, aromático).

RMN [¹³C] (CDCl₃) (δ): 158'2 (CO); 134'7 (C-9); 131'2 (C-4); 128'6 (C-5); 128'1 (C-8); 126'3 (C-7); 125'8 (C-6); 125'3 (C-3); 123'4 (C-2); 77'4 a 76'5 (C-16 a C-21); 42'4 (C-15); 40'5 (C-11); 14'1 (C-22).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 312 (M⁺, 1), 214 (44), 183 (3), 156 (6), 141 (100), 115 (69).

Combustión. Valores calculados: C= 76'87, H= 9'04, N= 8'97.

Valores experimentales: C= 76'1, H= 9'01, N= 8'86.

3.4.4. Obtención del ácido 4-aza-5-terc-butoxido-5-oxo pentanoico.

Figura 3-8

Se disuelven 12 g (45 mmol), de carbonato de di(terc-butilo) en una mezcla de 160 ml (dioxano,

agua)= 2:1, v/v y se agrega gota a gota mediante un embudo de adición, sobre una disolución en agitación de 4'4 g (50 mmol) de β - alanina en 160 ml de (dioxano, agua)= 2:1, v/v. Durante la adición la temperatura se mantiene entre 0-5 ° C en baño de hielo y el pH entre 9-10, mediante la adición de NaOH 1M. Al finalizar la adición, se lleva la mezcla a temperatura ambiente y se deja bajo agitación magnética durante 12 h, manteniendo el pH de la disolución entre 9 y 10, mediante la adición de un volumen extra de NaOH 1M.

La mezcla se lleva a sequedad en rotavapor y el residuo se retoma con 200 ml de agua destilada. La fase acuosa se extrae con éter etílico (3 x 100 ml). El extracto acuoso, así obtenido, se trata con ácido clorhídrico concentrado (37%) hasta alcanzar un pH=3. Se extrae nuevamente la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 100 ml) y finalmente se lava esta fase orgánica con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, hasta obtener en las aguas de lavado un pH= 6.

La fase orgánica se trata con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se lleva a sequedad en rotavapor. El sólido blanco se purifica por cristalización en una mezcla de (éter etílico, hexano)= 1:1, v/v. Los cristales así obtenidos se secan al vacío (0'01 Torr). Por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol)= 9:1, v/v revelado con H₂SO₄ al 10 % en metanol, se obtiene una sola mancha con R_f= 0'6. La cantidad de producto obtenido es de 9'07 g (47 mmol), lo que da un rendimiento de 94 %.

El producto obtenido se identifica mediante los siguientes datos, que se corresponden con los obtenidos por Houssin, Bernier y Henichart en 1988.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3460 (OH); 1710 (COOH) y 1680 (CONH).

Pto. de fusión: 76-77 ° C (sin corregir) (Pto. de fusión: 77-77'5 ° C Houssin, Bernier y Henichart, 1988).

3.4.5. Obtención de *N*- {2-[*N* -(2-naftil)carbamoil]etil} carbamato de *terc* -butilo

[Figura 3-9](#)

En un recipiente con 15 ml de dimetilformamida (seca y recién destilada), se disuelven 1'55 g (8'20 mmol) de Boc- β - alanina. Acto seguido se adicionan 1'36 g (8'36 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol. La mezcla se deja bajo agitación magnética durante 1 h, a temperatura ambiente. Luego se añaden 1'16 g (8'13 mmol) de 2-naftilamina y se deja agitar durante tres días, a temperatura ambiente.

Se agregan 20 ml de agua bidestilada, se recupera el sólido blanco formado por filtración al vacío y se lava con agua fría sobre el mismo filtro. Una posterior adición de agua bidestilada al filtrado no rinde más sólido.

El filtrado se extrae con acetato de etilo (3 x 50 ml), la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora a sequedad en rotavapor. En el residuo se observa una sola mancha por capa fina (cloroformo, acetato de etilo)=9:1, v/v (R_f=0'66).

Dicho residuo se junta con el precipitado y se secan al vacío en rotavapor. Se redisuelve el conjunto en acetonitrilo, se enfría a -20 ° C y al cabo de 24 h se cosechan unos cristales de color blanco.

Se obtienen 0'61 g de un sólido blanco (1'94 mmol) lo que da un rendimiento total del 24%, con respecto a la amina.

Los siguientes datos sirven para la identificación del producto.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 y 3320 (NH); 1580 y 1620 (C=O).

Pto. de fusión: 127-129° C (sin corregir).

RMN [¹ H] (CDCl₃) (d): 1'44 [s, 9H, C(CH₃)₃]; 2'47 (t, 2H, *J*= 6'0 Hz, NHCH₂CH₂); 3'54 (c, 2 H, *J*= 6'0 Hz, CH₂CH₂); 5'2 (sa, 1H, CONH CH₂); 7'5 (sc, 3H, aromático); 7'71 (dd, 2H, *J* = 1'6, 7'8 Hz, aromático); 7'85 (dd, 2H, *J*= 1'7, 7'8 Hz, aromático).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 314 (M⁺, 9), 290 (5), 258 (10), 214 (3), 169 (6), 143 (100), 115 (16).

3.4.6. Obtención del trifluoroborato de 2-[N- (2-naftil) carbamoil]etilamonio.

Figura 3-10

A una disolución enfriada con un baño de hielo de 0'62 g (2 mmol) de (V) en 10 ml de (diclorometano, ácido acético)= 5:1, v/v, se añaden 0'8 ml de trifluoruro de boro en éter etílico (67'8 mg, 0'47 mmol), seco y recién destilado. La mezcla se mantiene bajo agitación magnética, durante 1 h en baño de hielo y al cabo de ese tiempo, se filtra al vacío y se lava el residuo obtenido con éter etílico frío. Por cromatografía en capa fina se obtiene una sola mancha, con (cloroformo, acetato de etilo, trietilamina)= 9:1:0'1, v/v/v (Rf= 0'8). El residuo obtenido se seca al vacío (0'01 Torr) y se obtienen 0'51 g (1'8 mmol), siendo el rendimiento de la reacción del 90'1%.

El producto obtenido se identifica con los siguientes datos.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1620 (C=O).

RMN [¹H] (CD₃ OD) (d): 3'04 (t, 2H, J= 6'5 Hz, NHCH₂CH₂); 3'36 (sc, 2H, CH₂CH₂); 7'5 (sc, 3H, aromático); 7'7 (dd, 1H, J= 1'8, 7'8 Hz, aromático); 7'83 (sc, 1H, aromático); 7'95 (d, 1H, J= 7'8 Hz, aromático); 8'06 (sc, 1H, aromático).

RMN [¹⁹F] (CD₃ OD) (d): -152 (s).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 214 (16), 184 (4), 156 (6), 143 (100), 115 (5), 55 (2).

3.4.6.1 Intento de obtención del Cloruro de 2-[N- (2-Naftil)carbamoil]etilamonio.

Figura 3-11

A una disolución de 0'15 g (0'49 mmol) de V en 7'5 ml de acetato de etilo, se añaden 5 ml de ácido clorhídrico 3M y se deja la mezcla durante 30 min, a temperatura ambiente, bajo agitación magnética intensa.

Se separan las fases. La fase acuosa se trata con NaOH 1M hasta pH alcalino y posteriormente se extrae con cloroformo (destilado) (3 x 25 ml). La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora a sequedad con rotavapor. El residuo se analiza por HPLC, mediante una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak de mezcla eluyente (acetonitrilo, agua)= 55:45, v/v, flujo= 1'5 ml/min y l = 215 nm. El pico cromatográfico así obtenido, posee un tiempo de retención correspondiente a la 2-naftilamina.

3.4.7. Obtención de N- {2-[N -(2-naftil)carbamoil]etil} carbamato de succinimido.

Figura 3-12

A una disolución de 0'65 g (2'54 mmol) de carbonato de di (N- succinimidilo) (DSC) en 20 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado) se agregan gota a gota y a temperatura ambiente, 10 ml de una solución que contiene 0'45 g (2'12 mmol) de VI, junto con 0'29 ml (2'12 ml) de trietilamina, en acetonitrilo.

Una vez finalizada la adición (3 a 4 h) la mezcla de reacción se deja bajo agitación magnética una hora más a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se filtra, el residuo se lava con acetonitrilo frío, se reduce a mitad de volumen y se enfría a -20 ° C. Al cabo de 24 h se filtran los cristales obtenidos y secan al vacío (0'01 Torr). Por cromatografía en capa fina eluyendo con (cloroformo, metanol, trietilamina)= 86:14:0'1, v/v/v y revelado con luz ultravioleta, se observa que este residuo contiene una sola mancha (Rf= 0'8). La cantidad obtenida es de 0'41 g (1'19 mmol). Rendimiento del 56 %, respecto a la sal de la amina.

El producto se puede identificar a partir de los siguientes parámetros físico químicos:

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1620 (C=O).

Pto. de fusión: 202-204 ° C (sin corregir).

RMN [¹H] (CD₃ OD) (δ): 2'5 (s, 4H, COCH₂CH₂CO); 3'28 (m, 2H, NHCH₂CH₂); 3'4 (m, 2H, COCH₂CH₂); 7'27 (dd, 3H, *J* = 1'2, 8'9 Hz, aromático); 7'57 (sc, 2H, aromático); 7'8 (sc, 2H, aromático).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 355 (M⁺, 0'1), 295 (1), 272 (0'1), 240 (30), 169 (12), 143 (100), 115 (18), 87 (13), 55 (24).

3.4.8. Obtención de *N*- [2-(1-naftiloxicarbonil)etil]carbamato de *terc*-butilo.

Figura 3-13

En un recipiente con 15 ml de dimetilformamida (seca y recién destilada), se disuelven 1'55 g (10 mmol) de Boc- β - alanina. Acto seguido se adicionan 1'62 g (10 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol. La mezcla se deja agitando durante 1 h y luego se añaden 1'44 g (10 mmol) de 2-naftilamina. La reacción se deja bajo agitación magnética, durante 3 días. Posteriormente se agregan 20 ml de agua destilada a la mezcla y el sólido de color blanco obtenido se recupera por filtración al vacío y se lava con agua fría. El filtrado se intenta reprecipitar con un volumen extra de agua bidestilada.

El filtrado se extrae con acetato de etilo (3 x 50 ml), se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y evapora a sequedad en rotavapor. El residuo obtenido se junta con el precipitado y se secan al vacío (0'01 Torr). Se redisuelve el sólido en acetonitrilo, se enfría a -20 ° C y al cabo de 24 h se cosechan los cristales de color blanco obtenidos.

Se recuperan 0'70 g (2'25 mmol) lo que da un rendimiento total del 23 %, respecto al naftol.

Los siguientes datos nos sirven para identificar al compuesto.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 y 3320 (NH); 1580 y 1620 (C=O).

Pto. de fusión: 177-178 ° C (sin corregir)

RMN [¹H] (CDCl₃) (δ): 1'46 [s, 9H, C(CH₃)₃]; 2'85 (t, 2H, *J* = 6'2 Hz, NHCH₂CH₂); 3'54 (c, 2H, *J* = 6'2 CH₂CH₂); 5'18 (sa, 1H, CONH CH₂); 7'23 (dd, 3H, *J* = 1'2, 9'0 Hz, aromático); 7'57 (sc, 2H, aromático); 7'84 (sc, 2H, aromático)

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 313 (M⁺, 0'1), 290 (72), 214 (2), 169 (6), 143 (100), 115 (16).

3.4.9. Obtención del trifluoroborato de 2-(1-naftiloxicarbonil)etilamonio.

Figura 3-14

A una disolución enfriada con baño de hielo de 0'56 g (2 mmol) de VIII, en 10 ml de una mezcla (diclorometano, ácido acético) = 5:1, v/v, se añaden 0'8 ml de trifluoruro de boro en éter etílico (67'8 mg, 0'47 mmol) (seco y recién destilado). Se mantiene la mezcla bajo agitación magnética durante 1 h en baño de hielo, al cabo de ese tiempo se filtra al vacío y se lava el residuo obtenido con éter etílico frío. Por cromatografía en capa fina del sólido se obtiene una sola mancha, (cloroformo, acetato de etilo, trietilamina) = 9:1:0'1, v/v, (R_f = 0'7). El residuo obtenido se seca al vacío y se obtienen 0'41 g (1'44 mmol), siendo el rendimiento de la reacción de 71'9%, con respecto a la amina.

El producto obtenido se puede caracterizar por medio de los siguientes datos.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1620 (C=O).

RMN [¹H] (CD₃ OD) (δ): 3'03 (t, 2H, *J* = 6'2 Hz, NHCH₂CH₂); 3'36 (sc, 2H, CH₂CH₂); 7'59 (sc, 3H, aromático); 7'7 (dd, 1H, *J* = 0'8, 8'2 Hz, aromático); 7'82 (sc, 1H, aromático); 7'94 (sc, 1 H, aromático); 8'07 (sc, 1H, aromático).

RMN [¹⁹F] (CD₃ OD) (δ): -152 (s)

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 288 (M⁺, 0'1), 216 (9), 163 (2), 141 (100), 115 (5), 77 (11), 55 (2).

3.4.9.1. Intento de obtención del Cloruro de 2-(1-Naftiloxicarbonil)etilamonio.

[Figura 3-15](#)

A una disolución de 0'16 g (0'49 mmol) de [VIII](#) en 7'5 ml de acetato de etilo, se añaden 5 ml de ácido clorhídrico 3M y se deja la mezcla durante 30 min, a temperatura ambiente, bajo agitación magnética intensa.

Se separan las fases. La fase acuosa se trata con NaOH 1M hasta pH alcalino y posteriormente se extrae con cloroformo (destilado) (3 x 25 ml). La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora a sequedad con rotavapor. El residuo se analiza por HPLC, mediante una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak, la fase móvil una mezcla (acetonitrilo, agua)= 55:45, v/v, flujo 1'5 ml/min, λ =215 nm. El pico cromatográfico así obtenido, posee un tiempo de retención correspondiente al naftol.

3.4.10. Intento de obtención de [2-(naftiloxicarbonil)etil] carbamato de succinimido.

[Figura 3-16](#)

A una disolución de 0'51 g (2'0 mmol) de carbonato di (*N*-succinimidilo) (DSC) en 20 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado) se agregan gota a gota (a temperatura ambiente) mediante un embudo de adición 10 ml de una disolución que contiene 0'35 g (1'26 mmol) de [IX](#), junto con 0'23 ml (1'66 mmol) de trietilamina en acetonitrilo.

Una vez finalizada la adición (3 a 4 h) la mezcla de reacción se deja bajo agitación magnética una hora más a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se filtra, el residuo se lava con acetonitrilo frío, se reduce a mitad de volumen y se lleva a enfriar a -20 ° C. Al cabo de 24 h se filtran los cristales obtenidos y pone a secar al vacío (0'01 Torr). Por cromatografía en capa fina eluyendo con (cloroformo, metanol, trietilamina)= 86:14:0'1, v/v/v, revelado con luz ultravioleta, se observa que este residuo contiene una sola mancha (R_f= 0'8), que se corresponde con el producto de partida [IX](#).

3.4.11. Obtención de la *N*- (3-aminopropil)acetamida.

[Figura 3-17](#)

Una mezcla de 55'47 g (0'73 mol) de 1,3-diaminopropano con 25'58 g (0'34 mol) de acetato de etilo (recién destilado) se deja agitando a temperatura ambiente durante 10 días. Posteriormente se evapora en rotavapor hasta peso constante. El residuo aceitoso obtenido se somete a destilación fraccionada y se aísla la fracción de punto de ebullición 120 a 125 ° C (30 Torr), que se purifica por redestilación en iguales condiciones.

Los siguientes datos sirven para confirmar la estructura del compuesto y según lo publicado por Bruno, Ivanovic y Gaozza, 1994.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3450 (NH₂); 1640 (C=O).

RMN [¹ H] (CDCl₃) (d): 1'59 (m, 2H, *J*= 6'3 Hz CH₂); 1'93 (s, 3H, COCH₃); 1'83 (sa, 2H, -NH₂); 2'76 (t, 2H, *J*= 6'3 Hz, CH₂NH₂); 3'30 (c, 2 H, *J*= 6'3 Hz, CH₂NHAc); 6'65 (sa, 1H, NH CO).

Pto. de ebullición= 120-125 ° C (30 Torr) (Pto. de ebullición= 110-130 ° C, 1 Torr según Bruno, Ivanovic y Gaozza, 1994).

3.4.12. Recristalización de benzo[de]isoquinolina-1,3-diona.

[Figura 3-18](#)

A 10 g (50'5 mmol) de [XII](#) sin purificar se le agregan 150 ml de anhídrido acético y se calienta a reflujo bajo agitación magnética hasta disolución de la mezcla. Posteriormente se deja enfriar. El precipitado así obtenido se recupera por filtración y finalmente se seca al vacío (0'01 Torr).

La cantidad de sólido obtenido es de 9'19 g (46'65 mmol), lo que da un rendimiento del 92 %.

3.4.13. Obtención de *N*-(1,3-dioxo-2propil-benzo[de] isoquinolil) acetamida.

[Figura 3-19](#)

Se disuelven 2 g (17 mmol) de [XI](#), en 60 ml de piridina (seca y recién destilada) y se añaden 3 g (15 mmol) de [XII](#), recién cristalizada en anhídrido acético. La mezcla se deja bajo agitación magnética durante tres días a temperatura ambiente.

Al cabo de ese tiempo se filtra al vacío y se lava con etanol (2 x 30 ml) (seco y recién destilado). El residuo junto con los filtrados se llevan a sequedad en rotavapor, así la cantidad de sólido obtenido es de 2'47 g (8'52 mmol), dando un rendimiento de 57 %, respecto a [XII](#).

El producto obtenido se identifica por los siguientes parámetros físico químicos y se comparan con datos obtenidos de Bruno, Ivanovic y Gaozza, 1994.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1670 y 1640 (C=O).

RMN [¹H] (CDCl₃) (d): 1'95 (m, 2H, *J*= 5'8 Hz CH₂CH₂CH₂); 2'06 (s, 3H, COCH₃); 3'25 (c, 2H *J*= 5'8 Hz, CH₂NAc); 4'26 (t, 2H, *J*= 6'1 Hz, NHCH₂CH₂); 6'49 (sa, 1H, NHCO); 7'77 (dd, 2H, *J*= 1'2, 9'0 Hz, aromático); 8'24 (dd, 2H, *J*= 1'2, 8'7 Hz, aromático); 8'60 (dd, 2H, *J*= 1'0, 8'7, aromático).

3.4.14 Obtención del cloruro de 3[-2-(1,3-dioxo-1 *H*,3 *H* -benzo[de] isoquinolil)]propilamonio.

[Figura 3-20](#)

1 g (3'4 mmol) de [XIII](#), se disuelve en una mezcla compuesta por 25 ml de HCl 2M y 25 ml de etanol. La mezcla se deja bajo agitación magnética intensa y a reflujo durante 20 h en baño de aceite, al cabo de las cuales se lleva la mezcla a temperatura ambiente, se filtra al vacío y el sólido así obtenido se lava con etanol frío. Por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol)= 9:1, v/v, revelado con ultravioleta, da una sola mancha (R_f= 0'7).

La cantidad obtenida es de 0'85 g (2'9 mmol) lo que implica un rendimiento del 85%, respecto a [XIII](#).

El producto obtenido se puede caracterizar por medio de los siguientes datos y se comparan con los obtenidos por Bruno, Ivanovic y Gaozza, 1994.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1670 y 1640 (C=O).

RMN [¹H] (CDCl₃) (d): 1'8 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂); 2'1 (s, 3H, CH₃); 4'3 (t, *J*= 5'0 Hz, 2H, imida=NH₂); 6'6 (sa, 1H, NH); 7'8 (t, 2H, *J*= 4'0 Hz, aromáticos); 8'3 (d, 2H, *J*= 4'5 Hz, aromáticos).

3.4.15. Obtención de 2-(3-aminopropil)benzo [de]isoquinolina-1,3-diona.

[Figura 3-21](#)

Método A.

Se pesa 0'85 g (2'9 mmol) de [XIV](#), se trata con 50 ml de NaOH 2'5M, se deja bajo agitación magnética durante 1 h, obteniéndose un precipitado que se filtra al vacío y se lava con agua destilada en frío. El sólido da una sola mancha por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol, trietilamina)= 9:1:0'1, v/v/v (R_f= 0'7). La cantidad de sólido que se obtiene es 0'47 g (1'6 mmol), lo que implica un rendimiento del 56%, con respecto al producto XIV.

Método B.

A una disolución de 4'0 ml (48 mmol) de 1,3-diaminopropano en 30 ml de piridina (seca y recién destilada) se agregan lentamente 6'0 g (30 mmol) de anhídrido 1,8-naftálico y se deja bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 días. Al cabo de los cuales se separa por filtración al vacío el sólido sobrenadante insoluble y el filtrado se enfría a -20 ° C durante 24 h.

Al cabo de ese tiempo se observa la formación de cristales de color amarillo en el filtrado. Estos se separan por filtración al vacío, luego se lleva a sequedad en rotavapor, para finalmente lavar varias veces los cristales y el residuo del filtrado con éter etílico frío, de modo a eliminar los restos de piridina.

Los productos obtenidos por filtración y cristalización, dan una sola mancha por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol, trietilamina)= 86:13:1, v/v/v, (Rf= 0'6), en ambos casos y revelado con ultravioleta. La cantidad total de sólido obtenida es 3'6 g (14 mmol), dando un rendimiento de 47%, respecto al anhídrido 1,8-naftálico.

El producto obtenido se puede caracterizar por medio de los siguientes datos y se comparan con los obtenidos por Krotz y colaboradores, 1991.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3500 (NH); 1700 (C=O).

RMN [¹H] (CDCl₃) (δ): 2'03 (m, 2H; *J*= 0'7 Hz CCH₂C); 2'84 (t, 2H; *J*= 0'9 Hz CH₂NH₂); 4'4 (t, 2H; *J*= 0'8 Hz CH₂NH₂); 7'68 (dd, 2H; *J*= 1'2, 7'6 Hz aromáticos); 8'17 (dd, 2H, *J*= 1'2, 7'9 Hz aromático)

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 296 (M⁺, 1), 225 (4), 222 (23), 210 (35), 198 (86), 56 (100).

3.4.16. Obtención de *N*-{3-[2-(1,3-dioxo-1 *H*,3 *H* -benzo[de]isoquinolil)propil]carbamato de succinimido.

[Figura 3-22](#)

A una disolución de 0'37 g (1'33 mmol) de carbonato di-(*N*-succinimidilo) (DSC) en 15 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado) se agregan 0'31 g (1'23 mmol) de [XV](#).

Una vez finalizada la adición (3 a 4 h) la mezcla de reacción se deja bajo agitación magnética una hora más a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se filtra, el residuo se lava con acetonitrilo frío, se reduce a mitad de volumen y se lleva a enfriar a -20 ° C. Al cabo de 24 h se filtran los cristales obtenidos y se seca al vacío (0'01 Torr). Por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol, trietilamina)= 86:14:0'1, v/v/v, revelado con luz ultravioleta, se observa que este residuo da una sola mancha (Rf= 0'8). La cantidad obtenida es de 0'22 g (0'57 mmol). Rendimiento del 48%, respecto al [XV](#).

El producto se puede identificar a partir de los siguientes datos físico químicos.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 (NH); 1620 (C=O).

Pto. de fusión: 205-208 ° C (sin corregir).

RMN [¹H] (CD₃CO₂D₃) (δ): 2'85 (s, 4H, COCH₂CH₂CO); 3'40 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂); 4'27 (t, 2H, *J*= 7'4 Hz NHCH₂); 7'31 (sa, 1H, NHCO); 7'91 (dd, 2H, *J*= 0'62, 7'5 Hz aromático); 8'47 (dd, 2H, *J*= 1'25, 7'5 Hz aromático); 8'57 (dd, 2H, *J*= 1'25, 8'0 Hz aromático).

EM (DIP) (m/z): 395 (M⁺, 0'1), 295 (1), 282 (3), 252 (64), 222 (66), 198 (100), 180 (10), 115 (39), 55 (87).

3.4.17. Obtención de 1-[3-(1,3-dioxo-1 *H*,3 *H* -benzo [de]isoquinolen-2-il)propil]-3-octilurea.

[Figura 3-23](#)

Se pesan 40 mg (0'101 mmol) de [XVI](#), y se disuelven en 4 ml de acetonitrilo (seco y recién destilado), posteriormente se agregan 1'6 ml de una disolución de 25 mg/ml de octilamina en acetonitrilo (0'31 mmol) y finalmente se agrega el doble de volumen en acetonitrilo (seco y recién destilado), para disolver totalmente la mezcla, se deja bajo agitación magnética durante 48 h.

Se controla la evolución de la reacción mediante cromatografía HPLC, utilizando una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0'39 x 15 cm), una mezcla eluyente (acetonitrilo, agua)= 55:45, v/v, un detector de ultravioleta de diodos (200-400 nm) y un flujo de 1'5 ml/min. Se para la reacción, se lleva a la mitad de volumen en rotavapor, se lleva a enfriar a -20° C durante 24 h para la cristalización el compuesto. La cantidad obtenida es 32 mg (0'078 mmol), siendo el rendimiento de 77 %.

La caracterización analítica del compuesto se realiza teniendo en cuenta los siguientes parámetros físico químicos.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3300 y 3320 (NH); 2920 (-CH₂-); 1580 y 1620 (C=O).

Pto de fusión: 161-163 ° C (sin corregir).

RMN [¹H] (CD₃ OD) (δ): 0'87 (t, 3H, *J*= 2 Hz CH₂CH₃); 1'27 [s, 12H, CH₂(CH₂)₆CH₃]; 3'06 (sm, 2H, NHCH₂); 3'11 (t, 2H; *J*= 7'02 Hz, CCH₂C); 3'21 (q, 1H, *J*= 2'2 Hz NHCH₂CH₂); 4'13 (t, 2H, *J*= 7'13 Hz CONH CH₂); 4'6(sa,1H,NHCO); 5'4 (sa, 1H, NHCO); 7'76 (t, 2H, *J*= 7'6 Hz aromático), 8'48 (dd, 2H; *J*= 1'17, 7'6 Hz aromático); 8'6 (dd, 2H, *J*= 1'17, 7'9 Hz aromático).

RMN [¹³C] (CDCl₃) (δ): 173'4 (CO); 164'6 (CO); 158'4 (CO); 134'1 (C-2 y C-10); 131'5 (C-3 y C-9); 131'4 (C-4 y C-8); 126'9 (C-5 y C-7); 122'3 (C-6 y C-11); 77 -76 (C-21 a C-26); 40'7 (C-23); 37'5 (C-20); 36'8 (C-11); 30'1 (C-14); 29'3 (C-15); 29'2 (C-16); 14'1 (C-27).

EM (DIP) (intensidad relativa) (m/z): 409 (M⁺, 1), 281 (7), 252 (7), 222 (21), 198 (100), 180 (100), 115 (1), 55 (44).

Combustión. Valores calculados: C= 70'37, H= 7'63, N= 10'27.

Valores experimentales: C= 69'96, H= 7'74, N= 10'26.

3.5. Aplicación de los productos II y XVI al análisis de octilamina.

3.5.1. Definición de las características cromatográficas de las ureas III Y XVII.

3.5.1.1. Optimización de los parámetros cromatográficos.

Se preparan disoluciones en acetonitrilo de las ureas [III](#) y [XVII](#), con las siguientes concentraciones de 0'1, 0'5, 1 y 6 mg/ml. A continuación se inyectan 20 l de cada una de ellas al cromatógrafo líquido-líquido equipado con una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0'39 x 15 cm), un detector de ultravioleta de diodos y un detector de fluorescencia conectados en serie.

La elución se lleva a cabo con dos mezclas de disolventes de distinta composición. La primera una mezcla de (acetonitrilo, agua)= 55:45, v/v; la segunda, una mezcla eluyente tamponada (metanol, NaH₂PO₄0'1M)= 3:1, v/v, ajustada a pH= 3'35. En ambos casos el flujo se mantiene a 1'5 ml/min.

En lo que respecta a la detección por absorvancia, se utiliza un rango del espectro ultravioleta que va desde 200 a 400 nm. Las condiciones para la detección de fluorescencia implican la utilización de varias longitudes de onda de excitación que son 290, 300, 305, 313, 330 y 335 nm, en cuanto a los filtros de emisión se emplean longitudes de onda de 345, 389 y 418 nm.

3.5.1.2. Construcción de las curvas cantidad - respuesta para cada urea.

Se preparan disoluciones en acetonitrilo de las ureas [III](#) y [XVII](#) con las siguientes concentraciones 10⁻⁶ a 10⁻¹mg/ml. A continuación se inyectan 20 μl de cada una de ellas al cromatógrafo líquido-líquido equipado con una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0'39 x 15 cm), con un detector de ultravioleta de diodos y otro detector de fluorescencia conectados en serie.

Para la urea [III](#) la elución se lleva a cabo empleando la mezcla eluyente tamponada descrita en el apartado anterior, mientras que la detección en el espectro de ultravioleta se realiza a 215 nm. Para el análisis por fluorescencia se emplea una longitud de onda de excitación de 290 nm, con un filtro de emisión de 389 nm.

Para la urea **XVII** la elución se lleva cabo empleando la mezcla eluyente no tamponada descrita en el apartado anterior, siendo la detección por ultravioleta a 233 nm. La longitud de onda de excitación así el filtro de emisión para el análisis por fluorescencia de 389 nm y la longitud de onda de excitación de 360 nm.

3.5.1.3. Efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad de las ureas III y XVII.

Se preparan disoluciones en acetonitrilo de las ureas **III** y **XVII** con las siguientes concentraciones de 10^{-6} a 10^{-1} mg/ml. A continuación se toman alícuotas de 100 μ l de cada una de ellas y se les adiciona un volumen equivalente de una disolución de tetraborato de sodio a pH= 8'5 o un volumen de una disolución de dihidrogeno fosfato de potasio ajustada a un pH= 3'35, mediante ácido ortofosfórico. Para cada urea se realiza el análisis cromatográfico según se indica en el apartado 3.5.2.

Las mismas disoluciones, cuando se quiere realizar el experimento correspondiente, se calientan durante 15 min a 60 °C en baño de arena.

3.5.2. Optimización de las condiciones de derivatización.

3.5.2.1. Preparación de los reactivos.

Por una parte se preparan las siguientes disoluciones en acetonitrilo seco y recién destilado de los reactivos **II** y **XVI** conteniendo 0'1, 0'2, 3 y 6 mg/ml. Mientras que las concentraciones de octilamina preparadas son de 0'02, 0'04, 0'2, 0'5, 0'75 y 1 mg/ml, también en acetonitrilo.

3.5.2.2. Condiciones cromatográficas.

El progreso de todas las reacciones de derivatización, se siguen mediante HPLC, empleando una columna de fase inversa (C_{18}) Novapak (0'39 x 15 cm), con una mezcla eluyente (acetonitrilo, agua)=55:45, v/v, a un flujo de 1'5 ml/min y un detector de ultravioleta, a 215 nm. También se incluye un detector de fluorescencia para las determinaciones una vez obtenidos los derivados.

3.5.2.3. Reacciones de derivatización.

Se mezclan a temperatura ambiente 100 μ l de una de las disolución de los reactivos **II** y **XVI** con 100 μ l de una de las disoluciones de octilamina, se espera el tiempo correspondiente, y se inyecta en el cromatógrafo HPLC.

Todas las inyecciones en el HPLC a tiempos de reacción distintos al tiempo inicial van precedidas de la inyección de una reacción realizada justo antes de la misma, a la que denominados tiempo 0 h.

3.5.2.4. Reacciones de derivatización empleando tampones y temperatura.

A una mezcla de reacción preparada según se describe en el apartado anterior se adiciona un volumen equivalente una disolución acuosa de tetraborato de sodio 0'1M a pH= 8'5.

Para el análisis de las mismas sigue el mismo procedimiento que el empleado de 3.5.2.3.

De la misma manera a las distintas mezclas de reacciones a estudiar se añade un volumen equivalente de fase móvil tamponada a pH=3'35, compuesta por (metanol, NaH_2PO_4 0'1M)= 3:1, v/v. El análisis se lleva a cabo como en los casos anteriores.

Para estudiar el efecto de la temperatura, se realiza la mezcla de la octilamina con el reactivo y si es el caso, con la disolución tamponada y se calienta 15 min, a 60 °C.

3.5.3. Efecto de la concentración de octilamina en la linealidad de la

respuesta.

A 100 μ l de sendas disoluciones en acetonitrilo de **II** y **XVII** conteniendo 0'1 mg/ml y 6 mg/ml respectivamente, se le agregan 100 μ l de una de las siguientes disoluciones de octilamina 0'02, 0'04, 0'2, 0'5 y 1 mg/ml. Los viales que contienen el reactivo **II** se calientan 15 min a 60 °C, se dejan enfriar y se inyectan en el cromatógrafo HPLC, en las condiciones descritas en el apartado 3.5.1.1.

Los viales que contienen el reactivo **XVII** se dejan 3 h agitando a temperatura ambiente y también se analizan por HPLC según las condiciones descritas en el apartado 3.5.2.2.

Las curvas de calibración se calculan representando la respuesta obtenida con respecto a la cantidad teórica de urea inyectada (suponiendo un rendimiento del 100%).

3.5.4. Aplicación de los reactivos **ii y **xvi** al análisis de fumonisinas.**

3.5.4.1. Aspectos generales de las reacciones.

La aplicación de los reactivos **II** y **XVI**, a las reacciones de derivatización con las fumonisinas, se realizan de la siguiente manera.

Los reactivos que se utilizan son disoluciones de **II** y **XVI** en acetonitrilo y metanol de 3 y 6 mg/ml, respectivamente mientras que las toxinas son disoluciones en una mezcla de (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v, de 500 y 1000 μ g/ml, para la FB₁, FB₂ y las mezclas de FB₁ y FB₂.

Las mezclas se dejan reaccionando 24h y luego se analizan los productos obtenidos por cromatografía en capa fina de sílica gel empleando la siguiente mezcla eluyente (cloroformo, metanol, ácido acético)= 65:30:5, v/v/v y revelando con *p*-anisaldehído. En cada placa se siembra también los reactivos iniciales a una concentración equivalente a la que presentan inicialmente en las correspondientes mezclas de reacción.

4. Resultados y discusión

4.1. Obtención de fumonisinas.

4.1.1. Extracción de los extractos crudos.

Mediante el desengrasado y posterior extracción de los cultivos de *Fusarium proliferatum* obtenidos mediante siembra de inóculo en un total de 10 recipientes conteniendo 100 g de maíz cada uno, se obtuvo 44'9 g de un residuo oleoso que fue sometido a sucesivas etapas de purificación por técnicas cromatográficas. Para ello se tomó como referencia el método propuesto por Cawood y colaboradores en 1991, con algunas modificaciones.

4.1.1.1. Purificación con una resina XAD-2.

Cawood y colaboradores (1991), proponen una primera purificación con una resina de tipo XAD-2 sin realizar ninguna indicación de la necesidad de ajustar el pH inicial a 2'7. Posteriormente Caldas y colaboradores (1994), proponen éste ajuste previo a la purificación de sustancias de estructura semejante a las fumonisinas, mediante éste tipo de resinas. Ya que es de suponer que ha de ser la forma neutra de las fumonisinas la que sea sometida a un proceso cromatográfico adecuado en este tipo de fases se decide emplear éste ajuste de pH previo a la cromatografía. Otra modificación en el método de Cawood y colaboradores (1991), fue el de utilizar una menor relación (peso resina/ peso muestra) para así evitar tener que manipular grandes cantidades de volúmenes de disolventes polares. Así, 44'9 g de extracto seco de *F. proliferatum* eran suspendidos con 200 ml de una mezcla (metanol, agua)=1:3, v/v y el pH era ajustada 2'7, mediante HCl concentrado. La suspensión era añadida a una columna conteniendo la resina manteniendo una relación (producto, fase)= 1:8, p/p mientras que la relación sugerida por la literatura es de 1:15, p/p. Después de lavar la columna con 400 y 600 ml de mezclas (metanol, agua)= 1:3 y 1:1, v/v respectivamente, se procedía a la elución de las toxinas con metanol destilado. El seguimiento de las fracciones obtenidas por HPLC determinó que los mayores contenidos de las toxinas se obtienen con la elución de las tres primeros volúmenes de metanol. Así los contenidos se estiman entre 50 a 1000 ppm y 100 a 450 ppm, para la FB₁ y FB₂, respectivamente. Una vez analizados los contenidos las fracciones metánolicas se agruparon y se llevaron a sequedad en rotavapor, siendo el peso de crudo así obtenido de 1'90 g (4'5 % respecto al peso inicial). Siendo los porcentajes de recuperación no muy alejados de los expresados en la literatura (6'7%) (Cawood y colaboradores, 1991).

4.1.1.2. Purificación mediante columnas de sílica gel tipo "flash".

Si bien Cawood y colaboradores (1991), emplean una columna de sílica eluyendo por gravedad, algunas experiencias previas en nuestros laboratorios y la descripción realizada por Caldas y colaboradores (1994) sobre la posibilidad de utilizar cromatografía de tipo "flash" en la purificación de sustancias de constitución semejante a las fumonisinas me llevó a ensayar la siguiente metodología. Así, los 1'90 g se purificaron mediante una columna de sílica gel 60 tipo "flash" y la elución se realizó mediante una mezcla (cloroformo, metanol, ácido acético)= 6:3:1, v/v/v. El análisis de las 50 fracciones recolectas muestra que entre las fracciones 12-25 (51%) se obtiene básicamente FB₂, entre las fracciones 25-35 (12%) aparece una mezcla de FB₂-FB₁ y finalmente las fracciones 36-50 (30%) rinden básicamente FB₁.

Las fracciones así obtenidas se sometieron a otra columna de sílica gel tipo "flash" en idénticas condiciones. Si bien aquí sólo se procesaron las fracciones que contienen de forma mayoritaria una sola toxina. Así se pasaron por esta segunda columna y por separado las fracciones 12-25 y 36-50, conteniendo FB₂ y FB₁, respectivamente. En ambos casos se recogieron un total de 40 fracciones. Para la fracción enriquecida con FB₂, la segunda columna permite colectar entre las fracciones 14-26 (85%). Mientras que para la columna correspondiente al segundo grupo de fracciones se recuperan las fracciones 27-50 (90%), conteniendo FB₁.

4.1.1.3. Purificación mediante columnas de fase inversa (C₁₈).

La purificación mediante una columna de fase inversa se realizó con las fracciones, obtenidas a partir de las purificaciones mediante las segundas columnas de sílica gel tipo "flash", conteniendo principalmente FB₂ y FB₁, respectivamente. Se empleó una relación (producto, fase estacionaria)= 1:25, p/p, y las muestras se

disolvieron en la mezcla eluyente. Se colectaron 50 fracciones.

La elución de las columnas se probó con distintas mezclas de disolventes. Así partiendo del extracto conteniendo básicamente FB₁ con la mezcla (metanol, agua)= 3:1, v/v y mediante el análisis por HPLC, se agruparon las fracciones 2-20 (45%), mientras que para la columna con la mezcla (metanol, agua)= 3:1, v/v con ácido trifluoroacético al 0'1% las fracciones agrupadas fueron la 24-26 (44%). Así mismo para la FB₂, con la primera mezcla eluyente se recogen las fracciones 21-34 (52'5%), mientras que para la segunda mezcla se recogen las fracciones 29-40 (45'2%).

Así se puede decir que de las mezclas de elución ensayadas, aquellas que emplean en su composición ácido trifluoroacético al 0'1%, mostraron un retardo en la elución de las fumonisinas y una agrupación de las mismas (sobre todo la FB₁), en un menor número de fracciones. Hecho que se puede explicar teniendo en cuenta los distintos equilibrios químicos tipo ácido-base que han de presentar las fumonisinas.

4.1.1.4. Purificación final mediante una columna de sílica gel tipo "dry-flash".

La última parte de la purificación se realizó empleando una columna de sílica gel tipo "dry-flash", aplicada a las fracciones obtenidas de la columna de fase inversa, conteniendo básicamente FB₁ y FB₂.

Así los extractos empleados fueron las fracciones obtenidas por ambos sistemas de elución tanto para la FB₁ y FB₂. La elución se realizó mediante un gradiente, que se inició con una composición de partida (cloroformo, metanol, ácido acético)= 68:31:1, v/v/v llegando hasta 50:50:1, v/v/v. La muestra inicial se disolvía en la mezcla eluyente.

Se colectaron 35 fracciones. Las fracciones 1-2 se corresponden a la mezcla (68:31:1); 3 (64:35:1); 4-5 (60:39:1), 8-10 (57:42:1); 11-14 (54:45:1) y 22-35 (50:50:1). Todas las relaciones de las mezclas empleadas están en v/v/v.

El seguimiento determina que las fracciones así obtenidas formen dos grupos para cada toxina, así para la FB₂ las fracciones 4-5 (2'5%) conteniendo básicamente FB₂, 6-10 (13%) conteniendo FB₂ menos purificadas, debido a la presencia de más picos cromatográficos que en las fracciones anteriores. Para la FB₁ las fracciones colectadas 15-20 (18'4%) conteniendo esta toxina junto con otros productos no identificados y finalmente las fracciones 22-35 (5%) conteniendo básicamente FB₁.

Después de las sucesivas purificaciones se observa que las fracciones que contienen básicamente una toxina, presentan productos de menor polaridad en el caso de la FB₁ y para la FB₂, de mayor polaridad.

Finalmente como se puede ver en los cromatogramas [4-1](#), [4-2](#) y [4-3](#) se comprueba la pureza de los extractos así obtenidos preparando una disolución con las distintas fracciones obtenidas por purificación conteniendo básicamente una sola toxina, similar a los patrones y la mediante la comparación de las respuestas en el cromatógrafo HPLC, se determinó que para la (FB₁extracto/FB₁patrón) = 90% de contenido de la toxina en los extractos, mientras que para la (FB₂extracto/FB₂patrón) = 43% de contenido de la toxina frente a la respuesta del patrón.

4.2. Estudio del rendimiento de las extracciones de maíz con FB₁ y FB₂

2•

4.2.1. Estudio de las primeras extracciones de cada método.

Para proceder a la evaluación de los resultados obtenidos con el método propuesto, se comparan la primeras extracciones de los métodos de Shephard y colaboradores de 1990 (25 g), y el método de Scott y colaboradores de 1992 (5 g); en ambos casos con las primeras extracciones del método de 1 g. Cabe tener en cuenta que en los primeros métodos la primera extracción contenía tres fracciones acéticas (21 ml de la dilución de ácido acético al 0'5% en metanol) y en el nuevo método propuesto las dos primeras fracciones acéticas, utilizan tan solo 14 ml de ácido acético al 0'5 %, como el método original de Shephard y colaboradores (1990).

Los resultados expuestos en la tabla 4.1. indican que los tres métodos descritos dan un contenido de

FB₁ entre 4 a 5 µg/g y para la FB₂, entre 1 a 2 µg/g.

Método	nº de muestras (n)	Contenido en FB ₁ (µg/g + SE ¹)	Contenido en FB ₂ (µg/g + SE ¹)
25 g	5	4.7 ± 0.63	1.6 ± 0.22
5 g	3	4.7 ± 0.49	1.1 ± 0.36
1 g	5	4.3 ± 0.89	1.7 ± 0.31

¹ Error típico.

Como que $Pr > F$ (0.491) para la FB₁ y (0.433) para la FB₂, y ambos valores son mayores que 0.05 ($\alpha=5\%$), con una probabilidad del 95% no existen diferencias significativas entre las primeras extracciones de las muestras de maíz de cada método para la FB₁, y la FB₂.

Tabla 4.1: Contenido de fumonisinas en la primera extracción de los tres métodos empleados en el análisis de las muestras de maíz (µg/g).

El análisis estadístico de los mismos permite afirmar que el nuevo método propuesto para las muestras de maíz permite obtener resultados del mismo orden que los obtenidos con los métodos de Shephard y colaboradores, (1990) (muestras de 25 g) y el de Scott y colaboradores (1992) (muestras de 5 g), los cuales se han tomado como referencia. Además este nuevo sistema de extracción supone un ahorro en cuanto a la cantidad de los disolventes utilizados, ya que las cantidades requeridas son menores. Finalmente es un método fácilmente aplicable, además no incluye procesos de extracción y filtración que si son necesarios en los otros dos métodos, empleados como referencia.

4.2.1.1. Estudios de los contenidos finales obtenidos por cada método.

En la tabla 4.2. se presentan los contenidos finales obtenidos de las fumonisinas en las muestras de maíz y mediante los tres métodos empleados.

Método	nº de muestras (n)	Contenido en FB ₁ (µg/g + SE ¹)	Contenido en FB ₂ (µg/g + SE ¹)
25 g	5	6.0 ± 0.76	2.1 ± 0.27
5 g	3	6.3 ± 0.73	1.3 ± 0.49
1 g	5	4.9 ± 0.89	2.0 ± 0.34

¹ Error típico.

Como que $Pr > F$ (0.482) para la FB₁, y (0.222) para FB₂, ambos valores son mayores que 0.05 ($\alpha=5\%$) con una probabilidad del 95% no existen diferencias significativas entre los contenidos finales de fumonisinas obtenidos por cada método.

Tabla 4.2.: Contenidos finales de las fumonisinas por las muestras de maíz.

Los valores resultantes para la FB₁, se encuentran alrededor de los 6 µg/g para los métodos de referencia empleados en el análisis. Mientras que en las muestras de 1 g, se obtiene un contenido inferior, alrededor de 5 µg/g. Este resultado se puede explicar por la obtención en una las repeticiones de un valor que se aleja de los otros, lo que provoca una disminución del promedio final.

Los resultados correspondientes a la FB₂, para las tres metodologías empleadas, oscilan de 1 a 2 µg/g, destacando entre los tres resultados el promedio obtenido en el método propuesto.

Por lo tanto, el nuevo método puesto a punto en el presente trabajo ofrece unos contenidos finales para ambas fumonisinas similares a los obtenidos con los otros dos métodos que se utilizan de referencia. Los resultados así obtenidos no presentan diferencias significativas, lo que demuestra la validez del método propuesto.

Se adjuntan los cromatogramas para cada uno de los tres métodos utilizados en la cuantificación de la FB₁ y la FB₂ en las muestras de maíz. Las reacciones de derivatización de las muestras se realizan con OPA.

Se observan que las muestras en las que se emplean 1 y 25 g, los cromatogramas no presentan interferencias en los picos obtenidos correspondientes a la FB₁. Mientras que en las muestras de 5 g, los picos obtenidos para la FB₂ se muestran con mayor interferencia, para cada uno de los tres casos.

4.2.2. Estudios de la segunda extracción para cada método.

Seguidamente se busca evaluar la necesidad de realizar o no múltiples extracciones en las muestras de maíz. Hecho que está relacionado con la cantidad de disolventes empleados, el tiempo utilizado en el análisis de las muestras y los valores finales obtenidos de contenidos en fumonisinas.

En la tabla 4.3 se comparan los resultados obtenidos para las muestras de 25 g analizadas, según el método de Shepard y colaboradores (1990), teniendo en cuenta la primera extracción y el contenido final que resulta de realizar una segunda extracción de las muestras de maíz.

Método Shepard y col. (1990)	n° de muestras (n)	Contenido en FB ₁ (µg/g + SE ¹)	Contenido en FB ₂ (µg/g + SE ¹)
Parcial	5	4'7 ± 0'63	1'6 ± 0'22
Final	5	6'0 ± 0'76	2'1 ± 0'27

¹ Error típico.

Como que $Pr > F$ (0'212) para la FB₁, y la (0'214) para la FB₂, y ambos valores son más grandes que 0'05 ($\alpha = 5\%$) con una probabilidad del 95%, no existen diferencias significativas entre las extracciones parciales y finales ambas fumonisinas en las muestras de maíz de 25 g.

Tabla 4-3.: Contenidos parciales y finales en las muestras de 25 g.

Si bien las extracciones parciales dan valores de 4'6 µg/g para FB₁ y de 1'5 µg/g para FB₂, que resultan ser inferiores a los valores finales obtenidos 6 µg/g de FB₁ y 2 µg/g de FB₂, dichos valores no son significativamente diferentes como indica el tratamiento estadístico aplicado. Por lo que se puede concluir que en éste método la cuantificación de las fumonisinas viene determinada por el resultado de la primera extracción, no siendo necesaria la segunda extracción al menos con los niveles de contaminación obtenidos.

En la tabla 4.4, se exponen los resultados obtenidos para las muestras de 5 g, utilizando el método de Scott y colaboradores (1992), se analizan también en cuanto al número de extracciones que son factibles y comparando los contenidos que se extraen. En este caso, y después del análisis estadísticos de los resultados, se pueda observar igualmente la no necesidad de una segunda extracción para determinar los niveles de contaminación de fumonisinas.

Método Scott y col. (1992)	n° de muestras (n)	Contenido en FB ₁ (µg/g + SE ¹)	Contenido en FB ₂ (µg/g + SE ¹)
Parcial	3	4'7 ± 0'49	1'1 ± 0'36
Final	3	6'3 ± 0'72	1'3 ± 0'49

¹ Error típico.

Como que $Pr > F$ (0'154) para la FB₁ y de (0'743) para la FB₂, y que ambos son valores superiores que 0'05 ($\alpha = 5\%$) con una probabilidad del 95% no existen diferencias significativas entre las extracciones parciales y finales de ambas fumonisinas en las muestras de maíz de 5 g.

Tabla 4.4.: Contenidos parciales y finales en la muestras de 5 g.

En el último procedimiento se comparan los valores obtenidos después de eluir la columna con 14 ml de la disolución ácida con los obtenidos a partir de los 28 ml finales de los eluyentes ácidos, que se pasan por la columna. En la tabla 4.5. podemos, observar de nuevo la no necesidad de hacer más de dos eluciones con la mezcla ácida para obtener más valores representativos del nivel de contaminación.

Método	nº de muestras	Contenido en FB ₁	Contenido en FB ₂
1 g	(n)	(µg/g + SE ¹)	(gWg + SE)
Parcial	5	4'3 ± 0'89	1'7 ± 0'31
Final	5	4'9 ± 0'83	1'9 ± 0'34

¹ Error típico.

Como que $Pr > F$ (0'608) para la FB₁, y (0'537) para FB₂, y ambos valores son más grandes que 0'05 ($\alpha=5\%$) con una probabilidad del 95% no existen diferencias significativas entre las extracciones parciales y finales de ambas fumonisinas en las muestras de maíz de 1 g.

Tabla 4.5: Contenidos parciales y finales en las muestras de 1 g.

4.3. Análisis del contenido de fumonisinas mediante HPLC.

4.3.1. Análisis de los patrones de fumonisinas mediante el reactivo AccQ.Fluor.

Como ya se ha comentado anteriormente la comercialización del reactivo AccQ.Fluor obtenido por (Cohen y Michaud, 1993), para el análisis de aminoácidos me llevó a estudiar su posible uso en el análisis por fluorescencia de las toxinas FB₁ y FB₂.

En un primer estadio se llevó a cabo el análisis empleando la misma metodología cromatográfica descrita para el análisis de aminoácidos. Así, una vez obtenido el derivado se procedió a su análisis empleando las siguientes condiciones cromatográficas, una columna de fase inversa (C₁₈) Novapak (0'39 x 15 cm) y un gradiente a partir de dos disoluciones, la primera una mezcla compuesta por una disolución acuosa de KH₂PO₄ 0'1 M, con NaOH 0'1 M (A) a pH= 7'0, siendo la otra (B) metanol, de grado HPLC. La detección se realizó mediante un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 335 nm y un filtro de emisión (λ_{em}) de 418 nm.

En la tabla 4.6, podemos apreciar la excelente linealidad de los valores obtenidos al inyectar en el cromatógrafo, disoluciones de 1, 10, 30, 50 y 100 µg/ml de FB₁ y de FB₂. Las respuestas cromatográficas se deben a unas cantidades de toxinas inyectadas de 7'5 hasta 750 ng.

Toxina	Día	pendiente ^a (µV/ng)	y-intercepción (µV)	gl ^b	F ^c	R ^{2d}
FB ₁	1	59'8	950	3	15228	0'999
	2	47'7	314	8	5928	0'998
FB ₂	1	55'9	780	3	4803	0'999
	2	46'4	-1'08	8	914	0'991

^a Existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas en días diferentes ($P < 0'05$, calculado por el Test de Heterogeneidad de pendientes).

^b Grados de libertad.

^d Coeficiente de determinación.

Tabla 4.6.: Estudios de la linealidad de la respuesta de las FB₁ y FB₂ a las reacciones de derivatización con AccQ.Fluor, con la fase móvil a pH=7.

También se hizo evidente la necesidad de preparar una curva para cada día de análisis. Hecho por otra parte bastante común cuando se trabaja con la detección de por fluorescencia.

Una vez se vio que la respuesta era lineal se procedió a estudiar la estabilidad de los derivados. Como se muestra en la tabla 4.7. inyecciones realizadas sobre patrones conteniendo concentraciones de 50 µg/ml, de FB₁ y de FB₂. muestran ser estables hasta 48 h después de haber llevado a cabo la reacción de derivatización. Dicha estabilidad es mucho mayor que la descrita para el OPA en la bibliografía (Shephard y colaboradores,

1990).

tiempo (h)	FB ₁ ^a		FB ₂ ^a	
	X ± SD	X ± SD ^b	X ± SD	X ± SD ^b
0 ^c	16'5 ± 1'30		13'3 ± 0'85	
1 ^c	17'6 ± 1'10	18'1 ± 0'73	13'1 ± 1'10	12'5 ± 0'85
4 ^c	18'1 ± 0'73	15'8 ± 2'10	13'2 ± 1'10	12'7 ± 0'56
6 ^c	17'5 ± 0'50	15'8 ± 2'10	13'2 ± 0'75	12'7 ± 0'56
24 ^d	16'4 ± 0'65	17'2 ± 0'65	13'0 ± 0'29	13'5 ± 0'40
48 ^e	17'5 ± 1'80	17'3 ± 1'50	13'6 ± 0'80	13'4 ± 0'65

^a(altura x 1000) de los picos medidas en mV.

^b Reacciones a tiempo = 0 h, ^c inyecciones del día 1, ^d inyecciones del día 2, ^e inyecciones del día 3.

Tabla 4.7.: Estudios de estabilidad de los derivados de la FB₁, y FB₂, mediante la utilización de patrones de 50 µg/ml.

Otro factor importante a considerar es el límite de detección de la técnica, en nuestro caso aplicando el método del "ruido de fondo" obtuvimos un límite de detección para ambas toxinas de 20 ng. Lo que indica que es diez veces superior a los valores descritos por OPA.

Con el objeto de intentar disminuir el límite de detección y superar ciertos problemas de sobre-presión que producía el primer sistema cromatográfico, se pensó en modificar las condiciones cromatográficas. Si bien se utilizó la misma columna de fase inversa (C₁₈), Novapak (0'39 x 15 cm), la fase móvil consistió en un gradiente que empleaba dos disolventes: (A) (metanol, NaH₂PO₄0'1M)= 65:35, v/v ajustada a pH= 3'35 y (B) metanol, de grado HPLC.

De nuevo se estudió la linealidad de la respuesta. Así, en la tabla 4.9., podemos apreciar la buena linealidad de los valores obtenidos al inyectar en el cromatógrafo HPLC, disoluciones conteniendo 1, 5, 10, 30 y 50 µg/ml de FB₁ y de FB₂.

toxina	día	pendiente ^a	y-intercepción. ^b	g l ^c .	F	R ^{2d}
FB ₁	1	1'66	9'92	3	3289'1	0'999
	2	1'59	6'25	8	812'79	0'990
FB ₂	1	1'57	6'94	3	4069'9	0'999
	2	1'51	3'10	8	788'97	0'990

^a No existen diferencias significativas entre curvas en días diferentes (P < 0'05, calculado por el Test de Heterogeneidad de pendientes).

^b Intercepción con el eje "y", medidas en µV.

^c Grados de libertad.

^d Coeficiente de determinación.

Tabla 4.8.: Estudios de la linealidad de la respuesta de FB₁ y FB₂ a las reacciones de derivatización con el reactivo AccQ.Fluor.

En este caso se realizan estudios de reproducibilidad en base a inyecciones realizadas mediante la utilización de patrones de 10 µg/ml (Ver apartado 3.3.3.5), Después de las doce inyecciones que se realizan, y teniendo en cuenta el valor de las áreas, el coeficiente de variación que se obtuvo fue de 7'71 y 7'68 para la FB₁ y FB₂, respectivamente.

Igualmente los estudios de estabilidad, que se presentan en la tabla 4.10. determinan que las respuestas de los derivados se mantienen estables hasta las 48 h después de realizar las reacciones.

tiempo (h)	FB ₁ ^a		FB ₂ ^a	
	X ± SD	X ± SD ^b	X ± SD	X ± SD ^b
0 ^c	58'17 ± 1'72		54'85 ± 2'06	
1 ^c	60'33 ± 1'95	67'30 ± 3'22	56'43 ± 3'38	70'90 ± 3'32
6 ^c	50'43 ± 2'25	56'20 ± 2'70	49'37 ± 2'11	52'50 ± 1'06
24 ^d	54'13 ± 2'40	48'77 ± 2'65	47'53 ± 2'12	45'50 ± 1'83
48 ^e	50'50 ± 0'96	51'50 ± 0'44	46'97 ± 0'42	51'93 ± 1'62

^a (áreas x 1000) de los picos medidas en mV

^b Reacciones a tiempo = 0 h, ^c inyecciones del día 1, ^d inyecciones del día 2,

^e inyecciones del día 3.

Tabla 4.9.: Estudios de estabilidad de los derivados de la FB₁, y FB₂, con patrones de 10 µg/ml.

4.3.2. Efecto de la concentración de las fumonisinas sobre la respuesta de los derivados obtenidos con OPA y AccQ.Fluor.

Ya que desde un punto de vista cualitativo se observaba que había aumentado la respuesta de los derivados de AccQ.Fluor me propuse comparar las respuestas de los derivados con OPA y el reactivo AccQ.Fluor de los patrones de las fumonisinas.

Las figuras que se presentan a continuación, en forma de curvas de calibración, son la representación de las respuestas cromatográficas obtenidas en el análisis de estas disoluciones de los patrones. Se adjuntan un total de 4 rectas de calibración, dos de los cuales muestran los resultados obtenidos por ambas fumonisinas con el reactivo OPA ([Figura 4-4](#) y [Figura 4-6](#)) y las otras dos al reactivo AccQ.Fluor, respectivamente. ([Figura 4-5](#) y [Figura 4-7](#)).

En cada una de ellas se representan en abcisas las cantidades teóricas inyectadas de cada una de las fumonisinas expresadas en ng y en las ordenadas los valores de las áreas divididas por mil.

[Figura 4-4](#)

[Figura 4-5](#)

[Figura 4-6](#)

[Figura 4-7](#)

En las cuatro rectas de calibración representadas, se observan que la respuesta de los derivados con OPA y AccQ.Fluor se ajustan con un buen coeficiente de correlación a una línea recta dentro del margen de cantidades estudiadas para ambas fumonisinas.

También se puede observar que la respuesta para el caso de la FB₁ es tres veces mayor en el reactivo OPA y para la FB₂ es sólo de dos veces mayor. Este hecho se puede explicar a partir de las distintas condiciones cromatográficas empleadas en cada caso y teniendo en cuenta la dependencia de la respuesta fluorescente respecto a la fase móvil (Miller y Miller, 1993).

4.3.2.1. Cálculo de los límites de detección.

A partir de estos datos se puede calcular los límites de detección de ambos métodos.

Método del ruido de fondo.

De acuerdo con la metodología descrita en el apartado (3.3.1.4.) se pueden calcular los límites de detección para ambas toxinas, expresando los resultados que se obtienen en las siguientes tablas. Los valores del ruido de fondo se obtienen, mediante el promedio de una hora de desarrollo cromatográfico.

Reactivo	Altura del pico FB ₁ (mm)	Altura del ruido de fondo* (mm)	Límite de detección FB ₁ (ng)
OPA	86	21	≥4
AccQ	68	27	≥3

*Valor multiplicado por 3

Tabla 4.10: Límites de detección calculados a partir del ruido de fondo para la FB₁ con los reactivos OPA y AccQ.Fluor. Relación (señal, ruido)= 3:1.

Reactivo	Altura del pico FB ₂ (mm)	Altura del ruido de fondo * (mm)	Límite de detección FB ₂ (ng)
OPA	66	24	≥6
AccQ	72	24	≥7

*Valor multiplicado por 3

Tabla 4.11.: Límites de detección calculados a partir del ruido de fondo para la FB₂ con los reactivos OPA y AccQ.Fluor. Relación (señal, ruido)= 3: 1.

Método de la recta de calibración.

De acuerdo con la metodología descrita en el apartado (3.3.1.4.2) se procede a calcular los límites de detección para ambas fumonisinas, expresando los resultados que se obtienen en las siguientes tablas.

Tipos de reactivo	Ordenada al origen (b)	Desvío estándar del blanco(S _B)	Coordenada y (b + 3S _B)	Límite de detección FB ₁ (ng)
OPA	0'7	7'8	24'1	≥10
AccQ	-0'8	3'4	9'4	≥12'2

Tabla 4.12.: Límites de detección calculados a partir de las rectas de calibración para la FB₁ con los reactivos OPA y AccQ.Fluor.

Tipos de reactivo	Ordenada al origen (b)	Desvío estándar del blanco(S _B)	Coordenada Y (b + 3S _B)	Límite de detección FB ₁ (ng)
OPA	-5'6	5'1	9'7	≥6,7
AccQ	-10'3	7'1	13	≥17'5

Tabla 4.13.: Límites de detección calculados a partir de las rectas de calibración para la FB₂ con los reactivos OPA y AccQ.Fluor.

Analizando el presente cuadro se observa que los valores para los límites de detección que se obtienen por el método basado en el ruido de fondo resultan inferiores a los obtenidos por el método basado en la recta de calibración. Este método a pesar de ser el más utilizado por la comunidad científica, generalmente es menos conservativo que el anterior ya que se basa en una percepción visual y no en un análisis estadístico que tenga en cuenta la variabilidad de la respuesta obtenida.

4.3.3. Resultados obtenidos en el análisis de muestras de maíz.

Quedaba por conocer si ambos métodos de análisis aplicados sobre muestras de maíz daban respuestas semejantes o había una influencia de la matriz. Con objeto de analizar éste punto se tomaron varias muestras de maíz que ya sabíamos contenían fumonisinas y se procesaron según Shephard y colaboradores (1990), con

mínimas modificaciones y se analizaron los resultados con ambos métodos (AccQ.Fluor y OPA).

muestra	FB ₁ ^a		FB ₂ ^a	
	Método Shephard ^b	Método AccQ.Fluor	Método Shephard ^b	Método AccQ.Fluor
1	1'0	1'3	0'5	0'3
2	1'3	2'0	0'7	0'3
3	10'3	13'8	5'8	4'2

^a Concentraciones en µg/g, ^b reacciones de derivatización con OPA.

Tabla 4.14.: Resultados obtenidos con la muestras de maíz.

Como se puede ver en la tabla 4.14. los resultados eran semejantes aunque había ciertas variaciones que en un principio, se podían atribuir a la variabilidad de los mismos métodos.

4.3.4. Influencia del reactivo y el disolvente sobre la formación de derivados de FB₁ y FB₂.

Con el objeto de estudiar si el disolvente empleado en la disolución de patrones y muestras podría tener alguna influencia en el resultado final de los análisis se procedió a preparar patrones y muestras disueltas en acetonitrilo, metanol y acetonitrilo agua, tal como se indica en el apartado 3.2.2. Los análisis se realizaron según los apartados 3.3.1.2, 3.3.2.5 y 3.3.2.6.

En la gráficas siguientes se puede observar la linealidad al realizar curvas de calibración, de los patrones en distintos sistemas de disolventes. Igualmente se puede observar la dependencia de la respuesta frente al disolvente empleado.

[Figura 4-8](#)

[Figura 4-9](#)

[Figura 4-10](#)

[Figura 4-11](#)

Una vez observada la dependencia de la respuesta con el disolvente se procedió a estudiar cual podía ser su influencia sobre muestras reales. Por ello, tal como ya se ha indicado, se prepararon un conjunto de muestras que fueron analizadas según los apartados más arriba referidos y cuyas cantidades fueron calculadas en cada caso con los valores obtenidos de las rectas de regresión con cada uno de los disolventes y sus mezclas.

En la tabla 4.15. se presentan un resumen de los resultados de las muestras analizadas según los apartados más arriba referidos.

disolvente	reactivo	n	FB ₁ µg/g (±SD) ^a	FB ₂ µg/g (±SD) ^a
A	OPA ^b	4	7'8 ± 0'43	3'1 ± 0'18
A	AccQ20 ^c	4	7'5 ± 0'55	2'7 ± 0'35
A	AccQ40 ^e	4	7'4 ± 0'25	3'1 ± 0'70
B	OPA ^b	4	8'8 ± 0'91	3'1 ± 0'15
B	AccQ20 ^c	4	2'4 ± 0'35	3'0 ± 0'55
B	AccQ40 ^d	4	2'4 ± 0'22	2'6 ± 0'07
C	OPA ^b	4	8'4 ± 0'35	3'5 ± 0'09
C	AccQ20 ^c	2	3'9 ± 1'25	0'7 ± 0'24
C	AccQ40 ^d	4	5'3 ± 0'52	2'4 ± 0'12
D	OPA	2	2'85 ± 0'10	0'97 ± 0'13
D	AccQ20 ^c	2	1'20 ± 0'18	0'34 ± 0'08
D	AccQ40 ^d	2	2'89 ± 0'18	0'73 ± 0'01
E	OPA	2	2'85 ± 0'10	0'97 ± 0'13
E	AccQ20 ^c	2	1'20 ± 0'10	0'37 ± 0'01
E	AccQ40 ^d	2	ND	ND

^a Valores calculados a partir de las respectivas curvas de calibración construidas a partir de la inyección de los patrones disueltos en los mismos disolventes, que en las muestras.

^b Derivatizaciones según el apartado (3.3.1.2)

^c Derivatizaciones según el apartado (3.3.2.5).

^d Derivatizaciones según el apartado (3.3.2.6).

ND sin datos.

A: metanol, B: acetonitrilo, C: (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v, D: (metanol, NaHCO₃, sat.)

1: 1, v/v

E: (acetonitrilo, NaHCO₃, sat.) = 1:1, v/v.

Tabla 4.15: Valores correspondientes a las muestras analizadas según los apartados (3.3.1.2; 3.3.2.5 y 3.3.2.6).

Las muestras disueltas en metanol (A) dan en todos los casos cantidades semejantes más altas que el resto. Mientras que las muestras disueltas en acetonitrilo (B) y una mezcla de (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v, (C) presentan, para el caso del AccQ.Fluor una distribución de los resultados más variada. La adición de más reactivo en el caso del AccQ.Fluor no parece tener influencia en los resultados obtenidos.

Cuando se compara los valores obtenidos con AccQ.Fluor con los de OPA, muchos casos muestran la existencia de diferencias significativas. También hay diferencias según la toxina analizada y el método empleado.

Las muestras analizadas por OPA, en los distintos sistemas de disolución empleados, dan resultados similares cuando se utiliza metanol, acetonitrilo y una mezcla (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v. Cuando se introduce una sal en el medio el nivel, para ambas toxinas disminuye.

Las razones para explicar estos resultados no son nada evidentes. La explicación más plausible es que las matrices presentes en las muestras de maíz no permitan la disolución completa de las fumonisinas, básicamente FB₁, según sea el disolvente o provoquen la más rápida descomposición del reactivo, hecho que seguramente sucede en el caso de la introducción de una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio.

4.4. Síntesis de aril derivados

4.4.1. Relación de productos sintetizados.

La presente relación corresponde a los productos obtenidos mediante los distintos procedimientos de síntesis empleados.

N- (Quinolen-6-il)carbamato de succinimido (**I**).

N- (2-naftilmetil)carbamato de succinimido (**II**).

1-(2-naftilmetil)-3-octilurea (**III**).

Ácido 4-aza-5-*terc*- Butóxido-5-oxo pentanoico (**IV**).

N- {2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etil} carbamato de *terc* -butilo (**V**).

Trifluoroborato de 2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etilamonio (**VI**).

N- {2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etil} carbamato de succinimido (**VII**).

N- [2-(1-Naftiloxicarbonil)etil]carbamato de *terc* -butilo (**VIII**).

Trifluoroborato de 2-(1-Naftiloxicarbonil)etilamonio (**IX**).

N- (3-Aminopropil)acetamida (**XI**).

Benzo[de]isoquinolina-1,3-diona (**XII**).

N- (1,3-dioxo-2-Propil-benzo[de]isoquinolil)acetamida (**XIII**).

Cloruro de 3[-2-(1,3-dioxo-1*H*,3*H* -Benzo[de]isoquinolil)propilamonio (**XIV**).

2-(3-Aminopropil)benzo[de]isoquinolina-1,3-diona (**XV**). *N*- {3-[2-(1,3-Dioxo-1*H*,3*H* - benzo[de]isoquinolil)propil]carbamato de succinimido (**XVI**).

1-[3-(1,3-Dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinolen-2-il)propil]-3-octilurea (**XVII**).

Los productos **II**, **III**, **V**, **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, **X**, **XVI** y **XVII** se han sintetizado por primera vez.

4.4.2. Preparación de derivados de *N*-(hidroxisuccinimidilo).

Cuando me planteé la obtención de reactivos químicos con posible uso en la derivatización de fumonisinas, por una parte ya habían realizado pruebas preliminares con el reactivo AccQ.Fluor, gracias a una muestra suministrada por Waters Co., y por otra parte del análisis de la bibliografía (Takeda y colaboradores, 1983) y los propios conocimientos que poseía hacían evidente que los reactivos a diseñar debían de poseer anillos aromáticos. Si bien cuando uno analiza la bibliografía encuentra que no existe una clara relación de la estructura con la actividad o sea de la fluorescencia que presenta una sustancia y su composición química, en parte debido a que el fenómeno fluorescente depende también de la configuración adoptada por la sustancia y del disolvente en el que se encuentra disuelto (Kocienski, 1994). También es cierto que las sustancias con núcleo tipo naftalénico son buenos candidatos para presentar fluorescencia (Kocienski, 1994).

Una vez definido el sinton que podría conferir la fluorescencia a los reactivos se había de diseñar el grupo funcional que permitiría una reacción rápida y cuantitativa con el grupo amino de las fumonisinas y no reaccionara ni con grupos hidroxilo ni carboxilo. De nuevo las pruebas preliminares realizadas con AccQ.Fluor me llevaron a escoger el sistema carbonato de succinimido como candidato para la consecución de los objetivos propuestos. Para la unión de éste grupo con el sistema aromático hacía falta que este poseyera un grupo amina, que no fuese uno de los reactivos ya obtenidos por Nimura y colaboradores (1986) o Takeda y colaboradores (1983) y que su precio no fuera muy elevado para evitar el problema de alto coste del análisis asociado al reactivo AccQ.Fluor.

Teniendo en cuenta todas estas premisas y después de realizar un análisis exhaustivo de la bibliografía y de los catálogos de las casas suministradoras de productos químicos me planteé la síntesis de cuatro carbamatos activados indicados en la figura 4.12.

[Figura 4-12](#)

Paralelamente a estas síntesis me planteé la obtención según el método descrito Cohen y Michaud (1993), el reactivo AccQ.Fluor con el doble objeto de familiarizarme con la reacción y de obtener más reactivo para los estudios planteados en ésta tesis.

Finalmente, teniendo en cuenta el elevado precio de las fumonisinas y que al iniciar la tesis tan solo disponíamos de una mínima cantidad de las mismas, me planteé utilizar una amina comercial como modelo para estudiar la posible aplicabilidad de los reactivos obtenidos.

4.4.2.1. Obtención de *N*- (Quinolen-6-il)carbamato de succinimido.

[Figura 4-13](#)

La preparación de este producto ya fue descrita por Cohen y Michaud en 1993. Para el presente trabajo experimental la técnica de preparación de éste compuesto fue modificada, de modo a realizar la adición de la amina aromática sobre el DSC a temperatura ambiente y no bajo reflujo (Cohen y Michaud, 1993), durante 3 a 4 h y dejando 1 h más con agitación magnética. La introducción ésta variante en el sistema de adición, permite un incremento en el rendimiento en un 10% con respecto a los resultados de la metodología original propuesta. El punto de fusión de los productos así obtenidos resultan más cortados (210-212 ° C) que los determinados en base al producto obtenido en la literatura (210-215 ° C) (Cohen y Michaud, 1993).

4.4.2.2. Obtención de *N*- (2-(naftilmetil)carbamato de succinimido.

[Figura 4-14](#)

La primera síntesis que se abordó fue la obtención del carbamato **II**. Fueron las razones para ello, una que la amina era comercial, la otra que permitiría conocer si el paso de una amina aromática, como es la aminoquinoleína, a aminas alifáticas como las que se quería utilizar provocaba la mayor aparición de uno de los subproductos de la reacción, la urea simétrica (Takeda y colaboradores, 1983).

La reacción se llevó a cabo de la misma manera que la anterior, con la adición lenta de la amina sobre un exceso de DSC con el objeto de minimizar la formación de la urea simétrica. Los resultados finales obtenidos con un rendimiento de un 56 %, y la no obtención de la urea simétrica, al menos a un nivel fácilmente observable, confirmaron lo adecuado de la metodología adoptada.

En éste caso se estudió la posibilidad de eliminar el exceso de DSC, que podría interferir en la reacción de derivatización y la *N*-hidroxilamina liberada durante la reacción no por cristalizaciones sucesivas sino por la disolución del reactivo obtenido en acetato de etilo y posteriores lavados con agua. Por HPLC se observó lo adecuado del proceso así como posteriormente se comprobó que una vez lavada la disolución de acetato de etilo, su secado con sulfato de magnesio anhidro conducía a la descomposición de parcial del compuesto. (Figura 4-15).

4.4.2.3. Obtención de *N*- {2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etil}carbamato de succinimido (VII) e intento de obtención de *N*- [2-(1-Naftiloxicarbonil)etil]carbamato de succinimido (X).

Figura 4-16

Una vez se había comprobado que la obtención de carbamatos activados a partir de aminas no aromáticas daba resultados satisfactorios, aborde la síntesis de los demás compuestos diseñado, como se puede apreciar en el presente esquema. Ya que lo que se quería era la unión de un -aminoácido sobre una amina o alcohol se optó por una aproximación típica a la síntesis de péptidos. Esto implicaba la necesidad de protección del grupo amino del β -aminoácido, protección que se realizó según se describe en la bibliografía (Houssin y colaboradores, 1988) aunque con ligeras modificaciones, tales como el empleo de un ácido fuerte en la neutralización del medio alcalino, en el paso previo a la extracción con acetato de etilo, así como la utilización de un agente desecante, para la fase orgánica, con lo que desde un primer momento se obtuvo el producto en forma cristalina, frente a los residuos oleosos a los que hace referencia la metodología descrita por Houssin y colaboradores (1988), que posteriormente han de ser sometidos a destilación disminuyendo con ello el rendimiento. Seguidamente se pasó a la condensación del aminoácido con el alcohol o la amina utilizando 1,1'carbonildiimidazol como agente acoplante. Si bien ya se sabe que éste último paso no da rendimientos demasiado altos, la comodidad del mismo, la baja solubilidad de la BOC-alanina en disolventes que no sean muy polares y la pureza de los productos que se forman me hizo decidir por ésta aproximación a la síntesis del correspondiente éster y amida.

El éster VIII y la amida V habían de ser ahora sometidos a un proceso de desprotección conducente a la eliminación del grupo BOC.

Desde hace bastante tiempo los grupos *tert*-butoxicarbonilos (BOC) vienen siendo empleados para la protección de grupos funcionales aminos en distintos tipos de reacciones. El mencionado sistema tiene los méritos de ser bastante selectivo y de fácil remoción por una simple acidólisis (HCl o CF₃COOH, en un disolvente inerte) (Nagasawa y colaboradores, 1973).

Si bien éstos sistemas de eliminación del BOC son reacciones bastante estudiadas, no todos los sistemas convencionales son siempre adecuados según que grupos estén presentes en los productos tratados.

Las técnicas de referencia implican la utilización de un ácido diluido en presencia de un disolvente de mediana polaridad (Staab, 1962; Satchell y Satchell, 1969; Haslam, 1980; Carpino, 1972; Vollhardt y Schore, 1994). Aunque otras técnicas prefieren la utilización de ácidos más concentrados en presencia de disolventes de alta polaridad, tales como ácido clorhídrico y dioxano (Morita y colaboradores, 1995). Finalmente una de las técnicas referenciadas como sistemas de eliminación del BOC, propone el empleo de trifluoruro de boro en éter etílico, recién destilado (Hiskey y colaboradores, 1970).

En el presente trabajo se han ensayado de las diversas técnicas propuestas para la eliminación del BOC, de su unión con los grupos aminos presentes en V y VIII. Las técnicas empleadas incluyen los tratamientos con ácido trifluoroacético: diclorometano ácido trifluoroacético; acetato de etilo y trifluoro de boro: éter etílico. La técnica del ácido clorhídrico en dioxano no se probó por considerar que el método ya era demasiado polar y podía provocar la hidrólisis del enlace éster o amida aromáticos.

Los productos de las distintas reacciones se analizaron por HPLC, mediante una columna de fase inversa (C₁₈)Novapak (0'39 x 15 cm), con una mezcla eluyente (acetonitrilo, agua)= 60:40, v/v y un detector de ultravioleta de diodos a 215 nm.

4.4.2.3.1. Método del ácido trifluoroacético/diclorometano.

A una disolución de amina protegida en diclorometano (saturado con agua) se le agrega ácido trifluoroacético, en un exceso molar respecto al carbamato y se deja con agitación magnética durante 3 h a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se lleva a sequedad en rotavapor.

El residuo así obtenido se redissuelve en acetato de etilo (recién destilado), se lava con agua destilada (2 x 10 ml), se trata con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 para neutralizar el exceso de ácido y seca con MgSO_4 anhidro. La fase orgánica se reduce a mitad de volumen en rotavapor y se enfría a -20°C , durante 24 h. Por filtración se obtiene un sólido. Tanto el residuo como el filtrado analizados por HPLC denotan la única presencia de picos con tiempos de retención asignables a los productos de partida. Lo cual es indicativo que el tratamiento si bien provoca la hidrólisis del BOC, también produce la hidrólisis del enlace tipo amida o ésteres aromáticos.

4.4.2.3.2. Método del ácido clorhídrico/acetato de etilo.

A una disolución de la amina protegida en un volumen de acetato de etilo (recién destilado), se añade HCl 3M en un exceso molar con respecto a la amina y se deja bajo agitación magnética durante 30 min, a temperatura ambiente. De nuevo un análisis por HPLC sólo mostraba picos asignables a los productos resultantes de la hidrólisis completa de los productos.

Ambos resultados se confirmaron al conseguir obtener los productos deseados mediante el tercer método.

4.4.2.3.3. Método del trifluoruro de boro.

A una disolución enfriada con un baño de hielo de los carbamatos en una mezcla (diclorometano, ácido acético)= 5:1, v/v, se le añade trifluoruro de boro en éter etílico, seco y recién destilado. La mezcla se mantiene bajo agitación magnética durante 1 h en baño de hielo. Al cabo de ese tiempo, el sólido formado se recupera por filtración al vacío y se lava con éter etílico frío.

Mediante técnicas cromatográficas se observa la no presencia de los productos de hidrólisis como en los casos anteriores y por técnicas espectroscópicas se identifican ambas sustancias como los correspondientes trifluoroboratos de amonio. Los rendimientos son del 90'1% y 71'9%, buenos teniendo en cuenta la facilidad con que éste tipo de grupos funcionales sufre hidrólisis.

Una vez obtenidos estas dos sales el paso siguiente implicaba la reacción con el DSC.

Para la preparación del carbamato **VII**, mediante la metodología de Cohen y Michaud (1993) modificada, los mayores problemas se presentaron a la hora de disolver el producto **VI**, la adición de trietilamina en una relación mol a mol con la amina en acetonitrilo ayudaba a la disolución, al mismo tiempo que liberaba la base de la sal de modo a permitir la adición sobre el DSC. Una vez finalizada la reacción, se observó la formación de un precipitado, que se recuperó por filtración al vacío y se secó. El filtrado se redujo a la mitad de volumen y se enfrió a -20°C . Los cristales así obtenidos se filtraron y secaron. La RMN [^1H] de este segundo producto presentaba una señal intensa a 2'57, asignable al DSC sin reaccionar (50% respecto al producto deseado). Los intentos de purificación, semejantes a los utilizados en el caso de purificación del producto **II**, no dieron en éste caso los resultados esperados. Tampoco las distintas recristalizaciones a que se sometió el mismo permitieron una purificación hasta el nivel considerado adecuado para su uso en las reacciones de derivatización.

Para el intento de preparación del carbamato **X**, se empleó también la metodología de Cohen y Michaud (1993) modificada. Aunque el empleo de trietilamina en una relación mol a mol con la amina en acetonitrilo permitió obtener una disolución de **IX**, al cabo de poco tiempo de comenzar la adición se observaba la aparición de un precipitado, que no se consiguió redissolver ni agregando un exceso de trietilamina, ni con el aumento del volumen de acetonitrilo seco. Finalmente la adición se continuó, se filtró el sólido obtenido, se llevó a mitad de volumen y se enfrió a -20°C . Al cabo de 24 h se volvió a concentrar la muestra y se comprobó por cromatografía en capa fina (cloroformo, metanol)= 8:2, v/v que el producto obtenido y de las aguas madres daban de forma mayoritaria una mancha con el mismo R_f que **IX**.

4.4.2.4. Obtención de *N*-[3-[2-(1,3-dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinolil)propil] carbamato de succinimido.

[Figura 4-17](#)

Sustancias con estructura tipo 1,3-dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinoleina son empleadas como marcadores fluorescentes en los tratamientos de frutales (Planas, 1994). Por otra parte este sistema permite plantear la síntesis de una estructura semejante a las anteriores.

Con esta premisa y una vez conocidos los trabajos de Krotz y colaboradores (1991) y Bruno y colaboradores (1994), me planteé la síntesis de la aminopropilimida **XVI**. Utilizando las dos metodologías descritas en la obtención del producto deseado (Krotz y colaboradores, 1991; Bruno y colaboradores, 1994) que sería utilizado en la preparación del correspondiente carbamato.

En este caso para la preparación de **XVI**, se utilizó también la metodología de Cohen y Michaud (1993), modificada, como en los casos anteriores. Aunque ahora para resolver una problemática semejante presentada en los casos anteriores con respecto a la disolución de **XV**, se optó por la adición de **XV** en forma sólida durante 3 a 4 h. Se observó que inicialmente el sólido se iba disolviendo en el medio aunque hacia mediados de la adición ya se observó la presencia de precipitado, la mezcla final obtenida se trató según se describe en la metodología y se obtuvo un producto que se identificó como el carbamato deseado. Nuevamente intentos de purificación mediante redisolución en disolventes orgánicos y lavados posteriores con agua no dieron resultados deseados por lo que se optó por procesos de recristalización para la obtención del producto con una pureza adecuada.

4.4.3. Preparación de derivados tipo urea.

4.4.3.1. Obtención de 1-(2-naftilmetil)-3-octilurea (**III**) y 1-[3-(1,3-Dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinolen-2-il)propil]-3-octilurea (**XVII**).

[Figura 4-18](#)

Ya Takeda y colaboradores (1983) describieron la formación de ureas asimétricas a partir de los carbamatos de succinimidilo. En nuestro caso los rendimientos obtenidos, 78 % para **XVII** y 77% para **III**, son aceptables teniendo en cuenta que se calculan sobre los productos recristalizados.

El seguimiento de la evolución de la reacción permite determinar que a las 24 h de la misma el porcentaje de derivado de urea formado, representa la mayor parte del total obtenido, por lo que el aumento del tiempo a otras 24 h solo provoca un pequeño aumento del rendimiento.

El derivado se forma por ataque nucleofílico del compuesto con el grupo amino, sobre el grupo carbonilo del carbamato, que está activado por la presencia de la *N*-hidroxisuccinimida (NHS). (Nimura y colaboradores, 1986).

Así el producto que resulta de la reacción entre **II** y la octilamina, responde a la fórmula $C_{20}H_{28}N_2O$, siendo el peso molecular de 312. Mientras que el producto resultado de la unión de **XVI** y la octilamina tiene una fórmula $C_{24}H_{31}N_3O_3$, siendo el peso molecular de 409.

Para el derivado con el reactivo **II**, el exceso de octilamina resultante del hecho que la reacción ha sido realizada con una proporción (**II**, octilamina)=1:1, p/p, equivalente a una relación molar (1:2'3), se elimina fácilmente mediante procesos de lavado, ellos también permiten la eliminación de la *N*-hidroxisuccinimida formada durante la reacción de derivatización. El mismo exceso molar se utiliza en la reacción del **XVI**, aunque los procesos de lavado de los derivados obtenidos no se pueden realizar por la insolubilidad en disolventes de mediana polaridad. En este caso el proceso de cristalización permite la purificación del producto final.

4.5. Aplicación de los reactivos al análisis de aminas

En base a los resultados obtenidos en el capítulo anterior por lo que hace referencia a la preparación de los derivados tipo urea, los compuestos que demostraron tener capacidad de permitir la obtención de este tipo de derivados, se escogieron para estudiar los distintos factores que pueden influir en la reacciones de derivatización, así como las variaciones en las respuestas cromatográficas de las ureas correspondientes.

4.5.1. Puesta a punto de los reactivos ii y xvi, para el análisis de aminas por HPLC.

Una de las propiedades de los reactivos de tipo carbamato, similar a los reactivos de tipo isocianato e isotiocianato, es su reactividad frente a aminas primarias y secundarias, por lo que pueden emplearse en la derivatización de las mismas.

Ya que en los estudios realizados en la derivatización de aminas por Nimura y colaboradores (1986) con varios tipos de alquilaminas primarias, se detectan algunos problemas de interferencias entre los picos correspondientes al exceso de reactivo y los picos de los derivados de urea formados a partir de ciertas alquilaminas de bajo peso molecular, la amina escogida para realizar las pruebas de derivatización fue la octilamina, amina comercial de tipo alifático, de un peso molecular adecuado según los trabajos anteriormente citados.

4.5.2. Propiedades de los derivados de urea.

4.5.2.1. Respuestas cromatográficas de las ureas III y XVII

Una vez se habían obtenido las ureas **III** y **XVII**, se procedió a estudiar cual era su respuesta cromatográfica, ya que ello habría de permitir conocer su posible uso como sistema de análisis.

La primera prueba que se realizó tenía como objetivo conocer la respuesta fluorescente de las ureas a distintas longitudes de onda de excitación y distintos filtros de emisión, así como la influencia de dos fases cromatográficas, una tamponada y otra sin tamponar en dichas respuestas. A partir de éste estudio se concluyó que la urea **III** daba una respuesta intensa tanto en el caso de utilizar la fase móvil no tamponada como la tamponada mientras que para la urea **XVII** solo era útil la fase no tamponada, dicha urea no presentaba por HPLC ningún pico asignable a la misma, cuando se utilizó una fase tamponada.

Las condiciones óptimas de longitud de onda de excitación y el filtro de emisión fueron: 290 y 389 nm, para la urea **III**, y de 360 y 389 nm para la urea **XVII** respectivamente.

Una vez se conocieron las mejores condiciones de las ensayadas, se procedió a estudiar la linealidad de sus respuestas y calcular del límite de detección. Para ello se preparó un rango de concentraciones para ambas ureas de 10^{-6} a 10^{-1} mg/ml y se procedió a su análisis cromatográfico empleando en cada caso los eluyentes escogidos. La detección se realizó conectando en serie un detector de UV de diodos y un detector de fluorescencia con los parámetros de detección escogidos anteriormente.

En la tablas 4.16 y 4.17., se pueden observar las respuestas obtenidas en cada caso. De las mismas cabe comentar que a partir de una concentración de 10^{-4} mg/ml la respuesta es la misma siempre, hecho que se explica porque, como se puede ver en las tablas, los reactivos presentan prácticamente al mismo tiempo de retención una impureza que distorsiona los resultados a las concentraciones de urea más bajas. Dichas impurezas no permiten que se conserve la linealidad en todo el rango de concentraciones ensayadas, linealidad que si se presenta a partir de una cierta concentración como queda reflejado en las figuras 4.19.y 4.20. En las mismas se hace patente que las respuestas fluorescentes de la urea **III** es bastante menor que su respuesta en el UV, tendencia que se invierte en el caso de la urea **XVII**.

Diluciones de la urea XVII*	ultravioleta** (233 nm)	fluorescencia** ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 389 \text{ nm}$)
(mg/ml)	($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)	(μV)
10^{-1}	310708'59	306759'70
10^{-2}	31642'86	31374'22
10^{-3}	3562'98	3375'48
10^{-4}	1474'31	1565'37
10^{-5}	1600'88	1598'48
10^{-6}	1514'48	1519'25
Blanco	14511	7490

*Diluciones de la urea XVII inyectadas. Volumen de inyección 20 μl .

**Promedio de dos inyecciones

Tabla 4.16.: Respuestas cromatográficas obtenidas a partir de las disoluciones de la urea XVII.

Diluciones de la urea III*	ultravioleta** (215 nm)	fluorescencia** ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 389 \text{ nm}$)
(mg/ml)	($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)	(μV)
10^{-1}	420275'9	24272'3
10^{-2}	39019'7	2442'8
10^{-3}	4072'4	262'9
10^{-4}	922'34	47'31
10^{-5}	1200'62	60'88
10^{-6}	943'03	51'48
Blanco	1123	943

*Diluciones de la urea III inyectadas. Volumen de inyección 20 μl .

**Promedio de dos inyecciones

Tabla 4.17.: Respuestas cromatográficas obtenidas a partir de las disoluciones de la urea III.

A partir de estos datos, y considerando la presencia de las impurezas comentadas en los reactivos de partida, se puede inferir unos límites de detección de 10 ng para ambas ureas cuando son analizadas por UV a una longitud de onda de 215 nm para la urea III y de 233 nm para la urea XVII y un límite de detección semejante para la urea XVII cuando es analizada por fluorescencia. Para la urea III el límite de detección en las condiciones utilizadas por fluorescencia es de 100 ng, 10 veces superior al UV. De todas maneras los valores de los límites de detección podrían verse mejorados considerablemente con una pureza mayor de los reactivos empleados.

[Figura 4-19](#)

[Figura 4-20](#)

4.5.2.2. Efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad de las ureas III y XVII

Una vez comprobada la buena linealidad de la respuesta cromatográfica de ambas ureas se ha de proceder a estudiar el posible uso de los dos carbamatos precursores de las mismas en condiciones reales de análisis y cual es la influencia de distintos factores en los procesos de derivatización de las aminas. Previamente, pero es recomendable conocer cual es la estabilidad de las ureas formadas frente a factores como la temperatura y el pH, ya que estos parámetros han sido empleados como modificadores de la velocidad de reacción en otros carbamatos de succinimido (Nimura y colaboradores, 1986).

La estabilidad de los derivados obtenidos varía como parece lógico en función del pH. Así, la disolución de la urea III en la fase móvil conteniendo una disolución acuosa de NaH_2PO_4 0'1M ajustada a pH= 3'35, no afecta su respuesta cromatográfica, aunque ocasiona la aparición de nuevos picos cuando la urea está impurificada con reactivo inicial. ([Figura 4-21](#)).

Cuando las ureas se disuelven en una disolución acuosa de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0'1M de pH= 8'5, la urea **XVII** se descompone rápidamente mientras que la urea **III** es más estable, aunque al cabo de unas pocas horas se observa una disminución en la respuesta de la misma, hasta desaparecer a las 24 h. ([Figura 4-22](#)).

En el caso de la urea **III** si a la disolución acuosa de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0'1M se le adiciona un volumen equivalente de NaH_2PO_4 0'1M la estabilidad de la urea es mucho mayor. Hecho que confirma la dependencia de los valores de pH en la estabilidad de dicha urea. ([Figura 4-23](#)).

Otro factor que se tiene en cuenta para probar la estabilidad de los derivados, consiste en calentar a 60 °C en baño de arena, durante 15 min. Este tratamiento no provocó cambio en la respuesta cromatográfica de ninguna de las dos ureas.

4.5.3. Optimización de las condiciones de reacción.

Si bien se había comprobado que, en condiciones de concentración elevadas y mezclas casi estequiométricas de carbamatos y octilamina, las reacciones eran prácticamente completas a las 24 h, no se conocía cual era la evolución de las mismas en condiciones típicas de análisis en las que se emplea un exceso de reactivo frente a la amina.

4.5.3.1. Tiempo de reacción.

Los derivados preparados a partir de la mezcla de una disolución de **II** (0'5 mg/ml) y la octilamina presentan una respuesta en HPLC, que se van incrementando en un intervalo que va desde la preparación, hasta las cinco horas después de la reacción (Ver [figura 4-24](#)). A partir de las 5 h y hasta las 24h, se observa un ligero aumento de las respuestas. Por lo que respecta al reactivo **XVI**, como se puede observar en la tabla 4.18 las respuestas a las 3 y 24 h son equivalentes, aunque este caso se ha de tener en cuenta que solo se consiguió observar la formación de la urea cuando se empleo una concentración de 6 mg/ml de reactivo. Cuando la concentración de éste se disminuyó en ningún caso se observó por cromatografía de HPLC, la formación de la urea correspondiente.

[Figura 4-24](#)

mmol de XVII	respuesta cromatográfica	respuesta cromatográfica
	área (mV)	área (mV)
	3 h	24 h
5'7 10 ⁻¹	18'376	18'718
1,71	52'539	57'712
10'31	322'741	324'899

Concentración de XVI= 6 mg/ml.

Tabla 4.18. Influencia del tiempo de reacción en la formación de la urea **XVII**.

4.5.3.2. Adición de un tampón al medio de reacción

Aunque se había comprobado que un pH básico descomponía las ureas formadas, el hecho que la urea **III** presentara una cierta estabilidad frente a las disoluciones de tetraborato de sodio y que la misma había permitido acelerar la velocidad de la reacción en los estudios llevados a cabo por Takeda y colaboradores (1984) con carbamatos del mismo tipo que los aquí empleados, me llevó a ensayar la influencia de éste factor sobre el proceso de derivatización de la octilamina con el carbamato **II**.

[Figura 4-25](#)

Como se muestra en la figura 4.25 al realizar la reacción del carbamato **II** y la amina, añadiendo o no tetraborato de sodio se observa a tiempo cero una mayor respuesta para el caso de la prueba con la sal (los 1'5 μmol de urea teóricos dan casi la misma respuesta que los 3'3 μmol teóricos), aunque como era de esperar, se produce una pérdida en la respuesta a lo largo del tiempo en el caso del tratamiento a pH básico.

En la figura 4.26 se puede observar como al realizar la reacción a un pH ácido, el de la fase móvil de la cromatografía, no se obtiene una aceleración de la velocidad de la reacción a tiempo cero. Tampoco el efecto combinado de la introducción de un tampón básico seguido de la introducción de un volumen equivalente de la fase móvil (pH ácido) no produce tampoco un efecto claramente beneficioso al progreso de la reacción.

[Figura 4-26](#)

4.5.3.3. Efecto de la temperatura y del pH.

La temperatura era otro factor a considerar con objeto de acelerar la reacción de formación de las ureas. También Nimura y colaboradores, 1986, habían demostrado el efecto favorable de éste factor y como ya se ha comentado, ambas ureas presentan estabilidad a pequeños calentamientos. En la [Figura 4-27](#) se puede observar como el calentamiento a 60 °C en baño de arena, durante 15 minutos tiene efectos positivos sobre el tiempo de reacción, siendo las respuestas a tiempo cero, similares a las obtenidas a las 2 y 6 h.

Por lo que se puede concluir que un calentamiento suave de modo a no provocar una excesiva evaporación del disolvente, actúa aumentando la velocidad de la reacción, sin provocar un cambio en la estabilidad de los reactivos y productos.

Por lo que hace referencia al carbamato **XVI** en ninguna de las pruebas realizadas calentando, con concentraciones menores de reactivos que las indicadas en el apartado 4.5.2.1., se consiguió observar la formación de la urea correspondiente.

En la misma figura 4.27. nuevamente se indica el efecto del tampón de tetraborato sin calentar y calentando. En éste último caso no se observa la formación de derivado lo que indica que el calor ha acelerado más el proceso de descomposición que el de formación.

[Figura 4-27](#)

4.5.4 Efecto de la concentración de octilamina en la linealidad de las respuestas.

Una vez conocidas las condiciones más favorables para la obtención de las ureas correspondientes se procedió a estudiar si se obtenía una respuesta lineal al hacer reaccionar distintas concentraciones de octilamina con una misma concentración de cada uno de los carbamatos objeto de este estudio.

En la figura 4.28 podemos observar como al representar las cantidades de urea **III** teóricas frente a las respuestas detectadas, se obtiene una recta con un coeficiente de correlación de $R^2= 0'9838$ lo que demuestra que el reactivo se puede emplear para la cuantificación de esta amina dentro del margen de las concentraciones ensayadas.

Por lo que hace referencia a la reacción entre la octilamina y el carbamato **XVI**, se ha de comentar que en la concentraciones de amina de 1 mg/ml y 0'5 mg/ml y la elevada concentración de reactivo empleado provoca la aparición de un precipitado de urea con la consiguiente pérdida de señal cromatográfica. De igual manera la alta concentración de reactivo provoca que el efecto de interferencia de la impureza del mismo se deje de notar a concentraciones más elevadas que en el caso anterior. De todas maneras como se puede apreciar en la figura 4.29., la linealidad para las concentraciones intermediarias es también aceptable.

[Figura 4-28](#)

[Figura 4-29](#)

4.5.5. Aplicación de los reactivo al análisis de fumonisinas.

Se realizan varias reacciones de **II** y **XVI** con extractos conteniendo FB_1 y FB_2 , a diferentes concentraciones.

4.5.5.1. Análisis de los derivados obtenidos con las fumonisinas por TLC.

Mediante el análisis por TLC de las mezclas de reacción y revelado con *p*-anisaldehído al 0'5%, no se observan en ningún caso la desaparición de las manchas correspondientes a las fumonisinas o a los reactivos iniciales, ni tampoco la aparición de ninguna mancha que no esté presente en los distintos blancos de reacción. La inyección de estas muestras por HPLC empleando las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para el OPA y el AccQ.Fluor, no muestran ningún pico cromatográfico distinto del de los blancos, incluso 30 min después de realizarse la inyección.

5. Conclusiones

1. En lo que hace al estudio de la obtención y purificación de las fumonisinas los resultados nos proporcionan una buena perspectiva acerca de las modificaciones introducidas a lo largo de los procedimientos ensayados. Así el empleo de los extractos crudos a un pH ácido, antes de la purificación con la resina XAD-2, permite obtener una elución de las toxinas agrupadas prácticamente en los dos primeros lavados con metanol, empleando una menor relación (producto, fase estacionaria) y consecuentemente volúmenes de disolventes menores.

2. El empleo de columnas sucesivas de Sílica Gel 60, tipo "flash", permite la obtención con un menor tiempo de procesamiento, fracciones más limpias debido a la mayor resolución que se aplica al sistema. El número de fracciones necesarias para la elución del máximo porcentaje de las toxinas, también es menor.

3. En lo que respecta a las purificaciones por una columna de fase inversa, se comprobó que el empleo de una fase móvil acidificada frente a una no acidificada rinde mejores resultados a la hora de agrupar las distintas toxinas en un mismo número de fracciones menor.

4. Si bien con las columnas de fase inversa (C_{18}) no se llega a conseguir la purificación deseada, se propone realizar una nueva columna de Sílica Gel tipo "dry-flash", con la que se logran obtener las toxinas por separado a partir de las mezclas obtenidas de los procesos anteriores.

5. Finalmente después de todas las modificaciones ensayadas sobre los procesos de purificación se puede afirmar que, el análisis por HPLC de las fumonisinas obtenidas después de la última purificación indican una pureza del 40% para la FB_2 y del 90% para la FB_1 , respecto a los patrones (100%).

6. El sistema de extracción propuesto para el análisis del contenido de fumonisinas FB_1 y FB_2 sobre muestras de maíz, ha dado resultados no significativamente diferentes de los valores determinados para las muestras analizadas con los métodos empleados como referencia.

7. Así mismo en base éstos resultados se puede afirmar que el método propuesto permite una serie de ventajas respecto a los descritos hasta ahora. Así las cantidades de disolventes empleadas son mínimas, atendiendo la cantidad de muestra analizada. El tiempo empleado en los procesos de extracción y purificación es mucho menor comparando que ambos procesos se llevan a cabo en el mismo escenario. Este mismo ahorro de tiempo, espacio y materiales permite incrementar el número de repeticiones o de muestras analizadas, además con los modernos sistemas de vacío se pueden trabajar con varias columnas a la vez.

8. Se ha demostrado que, si bien en los tres métodos ensayados quedan aun fumonisinas por extraer después de la primera extracción, no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en ésta primera extracción y los valores finales.

9. También mediante los trabajos realizados se llegó a demostrar que el reactivo AccQ.Fluor, posee excelentes cualidades como método alternativo para la detección y cuantificación de las toxinas aminopolihidroxiladas, cuando se utiliza metanol como disolvente de las muestras a analizar.

10. Las respuestas cromatográficas por fluorescencia de los derivados obtenidos con el reactivo AccQ.Fluor, muestran cantidades detectables de hasta 3 y 7 ng para la FB_1 y FB_2 respectivamente. Así mismo los derivados presentan una muy alta reproducibilidad mediante inyecciones sucesivas, además de una estabilidad de hasta 48 h, con las mismas respuestas cromatográficas.

11. En el presente trabajo se han sintetizado los siguientes productos químicos.

N- (Quinolen-6-il)carbamato de succinimido **(I)**.

N- (2-naftilmetil)carbamato de succinimido **(II)**.

1-(2-naftilmetil)-3-octilurea **(III)**.

Ácido 4-aza-5-*terc*- Butóxido-5-oxo pentanoico **(IV)**.

N- {2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etil}carbamato de *terc* -butilo **(V)**.

Trifluoroborato de 2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etilamonio **(VI)**.

N- {2-[*N*- (2-Naftil)carbamoil]etil}carbamato de succinimido **(VII)**.

N- [2-(1-Naftiloxicarbonil)etil]carbamato de *terc* -butilo **(VIII)**.

Trifluoroborato de 2-(1-Naftiloxicarbonil)etilamonio (**IX**).
N- (3-Aminopropil)acetamida (**XI**).
Benzo[de]isoquinolina-1,3-diona (**XII**).
N-(1,3-dioxo-2-Propil-benzo[de]isoquinolil)acetamida (**XIII**).
Cloruro de 3[-2-(1,3-dioxo-1*H*,3*H* -Benzo[de]isoquinolil)propil]amonio (**XIV**).
2-(3-Aminopropil)benzo[de]isoquinolina-1,3-diona (**XV**).
N- {3-[2-(1,3-Dioxo-1*H*,3*H* -benzo[de]isoquinolil)propil]carbamato de succinimido (**XVI**).
1-[3-(1,3-Dioxo-1*H*,3*H* -benzo[de]isoquinolen-2-il)propil]-3-octilurea (**XVII**).

Los productos **II**, **III**, **V**, **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, **X**, **XVI** y **XVII** se han sintetizado por primera vez.

12. Con respecto a la preparación del ácido 4-aza-5-*terc* -butóxido-5-oxopentanoico (**IV**), para una misma pureza del producto, el método propuesto permite mejorar el descrito en la bibliografía.

13. La desprotección del sistema BOC-amino mediante trifluoruro de boro en éter etílico permite preservar enlaces tipo ester y amidas que son fácilmente hidrolizables que presentan las moléculas **V** y **VIII**.

14. En la preparación de (quinolen-6-ilamino)carbamato de succinimido (**I**), las modificaciones introducidas en la técnica referida en los trabajos de Cohen y Michaud (1993), permiten un incremento de los rendimientos obtenidos y la obtención de un producto con punto de fusión más cortado.

15. Las aminas **VI** y **XV** han permitido la obtención de los derivados de la *N*-hidroxisuccinimida con los cuales a su vez se han llevado a preparar las correspondientes ureas asimétricas.

16. Se han estimado en 10 ng la cantidad de octilamina que se puede detectar por cromatografía líquido-líquido de alta resolución (HPLC) empleando, *N* -{3-[2-1,3-dioxo-1*H*,3*H* -Benzo[de]isoquinolil)propil]carbamato de succinimido (**XVI**) como reactivo de derivatización y detección por ultravioleta o por fluorescencia. Dicho derivado demuestra ser estable, al menos hasta 24 h después de preparado.

17. Se han estimado en 10 ng la cantidad de octilamina que se puede detectar por cromatografía líquido-líquido de alta resolución (HPLC) empleando, *N* -[2-(Naftalen-2-ilmetil)amino]carbamato de succinimido (**II**) como reactivo de derivatización cuando se emplea un detector ultravioleta y de 100 ng cuando el detector es de fluorescencia. Dicho derivado demuestra ser estable, al menos hasta 24 h después de preparado.

18. La buena linealidad observadas en la respuesta de los productos de reacción de la octilamina los dos reactivos *N* -[2-(Naftalen-2-ilmetil)amino] carbamato de succinimido (**II**) y *N* -{3-[2-1,3-dioxo-1*H*,3*H* -Benzo[de]isoquinolil)propil]carbamato de succinimido (**XVI**), permite proponer a los mismos como posible sistemas alternativos al análisis de compuestos que presenten grupos amino en la molécula.

19. Las pruebas realizadas con las fumonisinas B₁ y B₂ y los reactivos *N* -[2-(Naftalen-2-ilmetil)amino]carbamato de succinimido (**II**), *N* -{3-[2-1,3-dioxo-1*H*,3*H* -Benzo[de]isoquinolil)propil]carbamato de succinimido (**XVI**), no llevaron a la obtención de ningún derivado detectable.

6. Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K. y Vesonder, R.F. 1993. Isolation and purification of AAL toxin from *Alternaria alternata* grown on rice. *Toxicon*, 31, 3, 355-358.
- Abbas, H.K., Vesonder R.F, Boyette, C.D. y Petterson, S.W. 1993. Phytotoxicity of AAL-toxin and other compounds produced by *Alternaria alternata* to jimsonweed (*Datura stramonium*). *Can. J. Bot.*, 71, 155-160.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O, van Schalwyk, D.J. y Berhrend, Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1729-1733.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A. y Marasas, W.F.O. 1993. Evaluation of the extraction and purification procedures of maleyl derivation HPLC techniques for the quantification of the fumonisin B in corn cultures. *Mycotoxin Res.*, 9, 2-12.
- Azcona-Olivera, J.I., Abuozied, M.M., Plattner, R.D., Norred, W.P. y Pestka, J.J. 1992a. Generation of antibodies reactive with fumonisins B₁, B₂ and B₃ by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 169-173.
- Azcona-Olivera, J.I., Abuozied, M.M., Plattner, R.D. y Pestka, J.J. 1992b. Production of monoclonal antibodies reactive with fumonisins B₁, B₂ and B₃. *J. Agric. Food. Chem.*, 40, 531-534.
- Ashworth, P., Broadbelt, B., Jankowski, P., Kocienski, P., Pimm, A y Bell, R. 1995. A Synthesis of Jaspamide Based on 1,2-Metallate Rearrangements of a -Heteroalkenylmetal Derivatives. *Synthesis*, 199-206.
- Bacon, D.P. y Williamson, J.W. 1992. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologia*, 117, 65-71.
- Bhat, R.V. 1983. Mycotoxin health hazard in India. *Procc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, 17, 7-12.
- Bhat, R.V. 1991. Aflatoxins: suceses and failure of three decades of research. *En: B.R. Champ, E. Highley, A.D. Hocking y J.I. Pitt (Eds.) Fungi and Mycotoxins in Stored Products: Proceedings of an International Conference, Bangkok, Thailand (1991). Canberra ACIAR Proceedings N° 36.*
- Bennett J.W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicosis, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathologia*, 100, 3-5.
- Bennett, J.W. y Richard, J.L. 1992. High performance liquid chromatographic methods of analyses for fumonisins. Abs. 106th AOAC Int. Ann. Mtg., Aug. 31-Sept. 3, 1992, Cincinnati, OH, 143.
- Bennett, J.W. y Richard, J.L. 1994. Liquid Chromatographic Method for Analysis of the Naphthalene Dicarboxialdehyde Derivative of Fumonisin. *J. AOAC Int.*, 77, 2, 501-505
- Bertrán, M. 1995. Assaig d'nou reactiu: (naft-1-ilmetilamino)formiato de succinimido (SINF), per l'anàlisi de fumonisines via HPLC. *Treball Practic Tutorat. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de Lleida. Universitat de Lleida.*
- Betina, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. *Ed. Elsevier. Bratislava*, 350 pags.
- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G. y Vleggaar, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Commun.*, 743-745.
- Benz, G. 1991. Synthesis of amides and related compounds. *Miles Inc. West Haven, CT.USA*. 30, 382-392.
- Bol, J. y Knol, W. 1990. Biotechnological methods for detoxification of mycotoxins. *Proceedings IFF. Symposium, Braunschweig, 1990.*
- Bothast, R.J., Bennett, G.A., Vancauwenberge, J.E. y Richard, J.L. 1992. Fate of fumonisin B₁ in naturally contaminated corn during ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 233-236.
- Bottini, A.T., Bowen, J.R. y Gilchrist, D.G. 1981. Phytotoxins II. Characterization of a Phytotoxic Fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Tetrahedron Lett.*, 22, 29, 2273-2276.
- Bruno, A.M., Ivanovic, S. y Gaozza, C.H. 1994. Aplicaciones en Síntesis de monoacetil, diaminoalcanos. *An. Quim.*, 135-138.
- Caldas, E.D., Jones, A.D., Ward, B., Winter, C.K. y Gilchrist, D.G. 1994, Structural Characterization of Three New AAL Toxins by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 237-333.
- Carpino, L.A. 1972. New Amino-Protecting Groups in Organic Synthesis. *Accounts Chem. Res.*, 6, 191-195.
- Cawood M., Gelderblom, W.C.A., Vleggaar, R., Behrend, Y., Thiel, P.G. y Marasas, W.F.O. 1991. Isolation of Fumonisin Mycotoxins: A Quantitative Approach. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 11, 1958-1962.
- Cierco, O. 1995. Estudio de diferentes métodos de purificación de las fumonisinas. *Trabajo Práctico Tutorado. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de Lleida. Universitat de Lleida.*
- Chelkowski, J. y Lew, H. 1992. *Fusarium* species of *Liseola* section - occurrence in cereals and ability to

- produce fumonisins. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 10, 40-53.
- Chen, J., Mirocha, C.J., Xie, E., Hogge, L. y Olson, D. 1992. Production of mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *licopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3928-3931.
 - Cheng, S.J., Jiang, Y.Z., Li, M.H. y Lo, H.Z. 1985. A mutagenic metabolite produced by *Fusarium moniliforme* isolated from Lixian county, China. *Atherosclerosis*, 31, 9.
 - Chu, F.S. y Li, G.Y. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with incidence of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 846-852.
 - Cohen, S. y Michaud, D. 1993. Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N - Hydroxysuccinimidyl Carbamate and its Applications for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids. Via High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.*, 211, 279-287.
 - Cooker, R. 1995. Controlling Mycotoxins in Oilseeds and Oilseed Cakes. *Chem. Ind.*, 3 abril, 260-264.
 - Cole, R.J. y Cox, H. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. *Academic Press* New York, 987 pags. - Cole, R.J. 1986. Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. *Academic Press*, New York, 470 pags.
 - Colvin, B.M. y Harrison, L.R. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*, 117, 79-82.
 - Cvitaš, T. 1995. Expressing compositions of mixtures. *Chem. Int.*, 17, 4, 123-126.
 - De León, C. y Pandey, S. 1989. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. *Crop Sci.*, 29, 12-17.
 - Diaz, G.J y Boermans, H.J. 1994. Fumonisin Toxicosis in Domestic Animals: A Review. *Vet. Human Toxicol.*, 36, 6, 548-555.
 - Doko, M.B. y Visconti, A. 1994. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based foodstuffs in Italy. *Food Add. Contam.* (En prensa).
 - Durst, H.D. y Gokel, G.W. 1985. *Química Orgánica*. Editorial Reverté, Barcelona, 580 pags.
 - Foley, D.C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 68, 1331-1335.
 - Gelderblom, W.C.A. Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. y Thiel, P.G. 1991. Toxicity and Carcinogenicity of the *Fusarium* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis*, 12, 1247-1251.
 - Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M. Vleggaar, R y Kriek, N.P.J. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1806-1811.
 - Gelderblom, W.C.A., Semple, E., Marasas, W.F.O. y Farber, E. 1992. The cancer-initiating potential of the fumonisin B mycotoxin. *Carcinogenesis*, 13, 433-437.
 - Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O., Vleggaar, R., Thiel, P.G. y Cawood, M. 1992. Fumonisin: Isolation, Chemical Characterization and Biological Effects. *Mycopathologia*, 117, 11-16.
 - Gelderblom, W.C.A. y Snyman, S.D. 1992. Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Mycotoxin Res.* 7, 46-52.
 - Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E., Snyman, S.D., Vleggar, R. y Marasas, W.F.O. 1993. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxic.*, 31, 407-414.
 - Haliburton, J.C., Vesonder, R.F., Lock, T.F. y Buck, W.B. 1979. Equine leukoencephalomalacia (ELEM): a study of *Fusarium moniliforme* as an etiologic agent. *Vet. Human Toxicol.*, 21, 348-351.
 - Haliburton, J.C. y Buck, W.B. 1986. Equine leukoencephalomalacia (ELEM): An historical review. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 33, 75-79.
 - Hansen, T.J., Zabe, N.A. y Skipper, P.L. 1992. Immunoaffinity isolation of fumonisins B₁ and application to analysis in corn. Abstr. 106th AOAC Int. Ann. Mtg., Aug. 31-Sept. 3, 1992, Cincinnati, OH, 230.
 - Haschek, W.M., Motelin, G., Ness, D.K., Harlin, K.S., Hall, W. K., Vesonder, R.F., Peterson, R.E. y Beasley, V.R. 1992. Characterization of fumonisins toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117, 83-96.
 - Haslam, E. 1980. Recent Development in Methods For The Sterification and Protection of the Carboxyl Group. *Tetrahedron*, 36, 2409-2433.
 - Harrison, L.R., Colvin, B., Greene, J.T., Newman, L.E. y Cole, J.R. Jr. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisins B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 2, 217-221.
 - Hendrich, S., Miller, K.A., Wilson, T.M. y Murphy, P.A. 1993. Toxicity of *Fusarium proliferatum* -fermented nixtamalized corn-based diet fed to rats: effect of nutritional status. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1415-1418.
 - Hesseltine, C.W. 1976. En: J.V. Rodricks (Editor) Mycotoxins and Other Fungal Related Problems, *Advances in Chemistry Series* n° 149, Washington, 1.

- Hesseltine, C.W., Rogers, R.F. y Shotwell, O.L. 1981. Aflatoxin and mold flora in North Carolina in 1977 corn crop. *Mycologia*, 73, 216-228.
- Hiskey, R.G., Lowrie, M.B., Matl, V., North-Smith, J., Williams, B., Thomas, A.M. y Wolters, E.R. 1970. Sulfur-Containing Polypeptides. XIV. Removal of *tert*-Butoxycarbonyl Group with Boron Trifluoride Etherate. *J. Org. Chem.*, 36, 3, 488-490.
- Hopmans, E.C. y Murphy, P.A. 1993. Detection of fumonisins B₁, B₂ y B₃ and hydrolysed fumonisins B₁ in corn-containing food. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1655-1658.
- Houssin, R., Bernier, J.L. y Henichart, J.P. 1988. A Convenient and General Method for the Preparation of *tert*-Butoxycarbonylaminoalkanenitriles and Their Conversion to Mono-*tert*-Butoxycarbonylalkanediamines. *Syn. Commun.*, 259-261.
- Holcomb, M., Thompson, H. y Hankins, L. 1993. Analysis of FB₁ in Rodent Feed by Gradient Elution HPLC Using a Pre-Column Derivatization with FMOOC and Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 5, 764-767.
- IARC. 1993. Some Naturally Occurring Substance: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic in Amines and Mycotoxins. *Monograph 56*. International Agency for Research on Cancer, (IARC) Lyon, France.
- Iwaki, K., Nimura, H., Hiraga, Y., Kinoshita, T., Takeda, K. y Ogura, H. 1987. Amino Acid Analysis by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. Automatic Pre-column Derivatization with Activated Carbamate Reagent. *J. Chromatogr. A*, 407, 273-279.
- Javed, T., Bennett, G.A., Richard, J. L., Dombink-Kurtzman, M.A. Cote, L.M. y Buck, W.B. 1993. Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B₁ and moniliformin. *Mycopathologia*, 123, 171-184.
- Jackson, M.A. y Bennett, G.A. 1990. Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2296-2298.
- Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M. y Coetzer, J.A.W. 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 57, 269-275.
- King, S.B. y Scott, G.E. 1981. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 71, 1245-1247.
- Kivinen, P. 1972. "The Chemistry of Acyl Halides". *InterScience Publishers*, New York, 177-230.
- Kocienski, P.J. 1994. Protecting Groups. Eds. Oxford. Oxford., 253 pags.
- Kohmoto, K., Itoh, Y., Shimonura, N., Konoloh, Y., Otani, H., Kodama, H., Nishimura, B. y Nakatsuka, S. 1993. Isolation and Biological Activities of Host-Specific Toxins from Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathologia*, 83, 5, 495-501.
- Kometani, T., Fitz, T y Watt, D. 1986. Synthesis of Succinimides and Glutarimides from Cyclic Anhydrides. *Anal. Chem.*, 58, 12, 2372-2375.
- Korfmatcher, W.A., Chiarelli, M.P., Lay, J.O. Jr., Bloom, J., Holcomb, M. y McManus, K.T. 1991. Characterization of mycotoxin fumonisin B₁: comparison of thermospray, fast-atom bombardment and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 5, 463-468.
- Kraus, G.A., Applegate, J.M. y Reynold, D. 1992. Synthesis of Analogs of Fumonisins B₁. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 12-13.
- Krotz, L., Caram, J., Bruno, A.M. y Gaozza, C.H. 1991. Heterociclos derivados de la reacción del anhídrido 1,8-naftálico con 1,3-diaminopropano y 1,2-diaminoetano. Ensayos de citotoxicidad con interacción con ADN y propiedades redox. *An. Quím.*, nota. 87, 134-138.
- Le Bars, J., Le Bars, P., Dupuy, J., Boudra, H. y Cassini, R. 1992. Biotic and abiotic factors in fumonisin production and accumulation. Abstr. 106th AOAC Int. Ann. Mtg., Aug. 31-Sep. 3, Cincinnati, OH, 106.
- Ledoux, D.R., Brown, T.P., Weibking, T.S. y Rottinghaus, G.E.. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 330-333.
- Laurent, D., Lanson, M., Goasdue, N., Kohler, F., Pellegrin, F. y Platzer, N, 1990. Étude en RMN ¹H et ¹³C de la Macrofusine, toxine isolée de maïs infecté par *Fusarium moniliforme* Sheld. *Analisis*, 18, 172-179.
- Leslie, J.F., Plattner, R.D., Desjardins, A.E. y Klittich, C.J. 1992. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikori* (*Fusarium* Section *Liseola*). *Phytopathology*, 82, 341-345.
- Lew, H., Adler, A. y Edinger, W. 1991. Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Mycotoxin Res.*, 7, 71-76.
- Lillehoj, E.B. y Hesseltine, C.W. 1977. En: J.W. Rodricks, C.W. Hesseltine y M.A. Hehlman (Editores) *Mycotoxins in Humans and Health*. Pathotox, Park Forest. IL.
- Maddox, J. 1984. Natural history of yellow rain. *Nature*, (London), 309, 207.
- Marasas, W.F.O., van Rensburg, S.J. y Mirocha, C.J. 1979. Incidence of *Fusarium* species and the mycotoxins,

- deoxynivalenol and zearalenona, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *J. Agric. Food. Chem.*, 27, 1108-1112.
- Marasas, W.F.O., Jaskiewicz, K., Venter, F.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W. Thiel, P.G. y van der Lugt, J.J. 1988. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. Med. J.*, 74, 110-114.
- Marasas, W.F.O. 1988a Leukoencephalomalacia in a horse induced by FB₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55, 197-203.
- Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G. y van der Lugt, J.J. 1988b. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55, 197-203.
- Mattossian, M.K. 1989. Poisons of the past. *Yale University Press*, New Haven, CT., 230 pags.
- Miller, J.D. 1993. The toxicological significance of mixtures of fungal toxins. *Afr. Newsl. Occup. Hlth. Saf.*, 3, 32-38.
- Miller, J.D. 1995. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. *J. Stored Prod. Res.*, 31, 1, 1-16.
- Miller, J.C. y Miller, J. N. 1993. Estadística para Química Analítica. *Addison-Wesley Iberoamerican. S.A.* Wilmington, Delaware, EUA, 211 pags.
- Miller, J.D., Savard, M.E., Sibilia, A., Rapior, S., Hocking, A.D. y Pitt, J.I. 1993. Production of fumonisins and fusarins by *Fusarium moniliforme* from southeast Asia. *Mycologia*, 85, 385-391.
- Morita, S., Otsubo, K., Matsubara, J., Ohtani, T. y Uchida, M. 1995. An efficient Synthesis of a Key Intermediates Towards (S)-(-)-Nadifloxacin. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6,1, 245-254.
- Mirocha, C.J., Mackintosh, C.G., Mirza, U.A., Xie, W., Xu, Y. y Chen, J. 1992a. Ocurrence of fumonisin in storage grass in New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3196-3198.
- Mirocha, C.J., Gilchrist, D.G., Shier, W.T., Abbas, H. K, Wan, Y. y Vesonder, R.F. 1992b. AAL-toxins, fumonisins (biology and chemistry) and host-specificity concepts. *Mycopathologia*, 117, 47-56.
- Morrison, R.T. y Boyd, R.N. 1990. Química Orgánica. *Addison-Wesley Iberoamericana. S.A.* Barcelona, 432 pags.
- Mukhopadhyay, T., Roy, K., Coutinho, L., Rupp, R.H., Gangulli, B.N. y Fehlhaber, H.W. 1987. Fumifungin, a new antifungal antibiotic from *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863. *J. Antibiot.*, 40, 1050-1052.
- Murphy, P.A., Rice, L.G. y Ross, P.F. 1993. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 263-266.
- Nagasawa, T., Kuroiwa, K., Narita, K. y Isowa, Y. 1973. New Agents for *tert*- Butoxycarbonylation and *p*-Methoxybenzyloxycarbonylation of Amino Acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 46, 1269-1272.
- Nimura, N., Iwaki, K., Kinoshita, T., Takeda, K. y Ogura, H. 1986. Activated Carbamate Reagent as Derivatizing Agent for Amino Compounds in High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 52, 12, 2371-2375.
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Schackelford, D.D. y Desjardins, A.E. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2410-2412.
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Schackelford, D.D. y Desjardins, A.E. 1992. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. Moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 984-989.
- Nelson, P.E., Desjardins, A.E. y Plattner, R.D. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *A. Rev. Phytopathol.*, 31, 233-252.
- Norred, W.P., Bacon, C.W., Plattner, R.D. y Vesonder, R.F. 1991a. Differential cytotoxicity and mycotoxin content among isolates of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 115, 37-43.
- Norred, W.P., Voss, K.A., Bacon, C.W. y Riley, R.T. 1991b. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. *Food Chem. Toxicol.*, 29, 815-819.
- Norred, W.P. 1993. Fumonisin-Mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 38, 309-328.
- Northold, M.D., van Egmond, H.P. y Paulsch, W.E. 1979. *J. Food Protect.*, 42, 485.
- Ochor, T.E., Trevathan, L.E. y King, S.B. 1987. Relationship of harvest date and host genotype to infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme*. *Pl. Dis.*, 71, 311-313.
- Osweiler, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., Witte, S.T., Carson, T.L., Rice, L.G. y Nelson, H.A. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 53-59.
- Osweiler, G.D., Kehrl, M.E., Stabel, J.R., Thurston, J.R. Ross, P.F. y Wilson, T.M. 1993. Effects of fumonisins-contaminated corn screenings on growth and health feeder calves. *J. Anim. Sci.*, 71, 459-466.

- Peña, E. 1995. Aportacions a l'anàlisi de fumonisines en panis. *Treball Pràctic Tutorat*. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de Lleida. Universitat de Lleida.
- Pestka, J.J., Azcona-Olivera, J.I., Plattner, R.D., Minervini, F., Doko, M. y Visconti, A. 1994. Comparative Assesment of Fumonisin in Grain-Based Food by ELISA, GC-MS and HPLC. *J. Food Protect.*, 57, 2, 169-172.
- Park, D.L., Rua, S.M., Jr., Mirocha, C.J., Abed-Alla, E.A.M. y Weing, C.Y. 1992. Mutagenic potentials of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure. *Mycopathologia*, 117, 105-108.
- Planas, J. 1994. Servei de Protecció dels Vegetals. Generalitat de Catalunya. Lleida. Comunicació Personal.
- Plattner, R.D., Norred, W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A., Peterson, R., Schackelford, D.D. y Weisleder, D. 1990. A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia*, 82, 698-702.
- Plattner, R.D., Weisleder, D., Schackelford, D.D., Peterson, R. y Powell, R.G. 1992. A new fumonisin from solid culture of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117, 23-28.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscambe, B.F., Wheeler, K.A. y Tanboon Ek.P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. I Nuts and oilseeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 211-226.
- Pittet, A., Parisod, V. y Schellenberg, M. 1992. Ocurrence of fumonisins B₁ y B₂ in corn-based products from the Swiss market. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1352-1354.
- Prelusky, D.B., Rotter, B.A. y Rotter, R.G. 1994. Toxicology of mycotoxins. En: *Mycotoxins in Grain*, Miller, J.D. y Trenholm, H.L. Eagan Press, St. Paul, MN., 359-404 pags.
- Rapior, S., Miller, J.D., Savard, M.E. y ApSimon, J.W. 1993. Production *in vitro* de fumonisines ef fusarines par des souches européennes de *Fusarium moniliforme*. *Micro. Aliments. Nutr.*, 11, 327-333.
- Riley, R.T., An, N.Y., Showker, J.L., Yoo, H.S., Norred, W.P., Chamberlain, W.J., Wang, E., Merrill, A.H., Motelin, G., Beasley, V.R. y Haschek, W.M. 1993. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118, 105-112.
- Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. y Wilson, T.M. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leucencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3225-3226.
- Ross, P.F., Rice, L.G., Plattner, R.D., Osweiler, G.D., Wilson, T.M., Owens, D.L., Nelson, H.A. y Richard, J.L. 1991. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia*, 114, 129-135.
- Ross, P.F., Rice, L.G., Osweiler, G.D., Wilson, T.M., Nelson, H.A., Nelson, P.E., Richard, J.L. y Wilson, T.M. 1992. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. *Mycopathologia*, 117, 109-114.
- Ross, P.F., Ledet, A.E. y Owens, D.L. 1993. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 69-74.
- Ross, P.F. 1994. What are we going to do with this Dead Horses?. *J. AOAC Int.*, 77, 2, 491-494.
- Rottinghaus, G.E., Coatney, C.E. y Minor, H.C. 1992. A rapid, sensitive Thin Layer Chromatography Procedure for the Detection of Fumonisin B₁ and B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 326-329.
- Samson R.A. 1992. Mycotoxins: a mycologist's perspective. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30, Supplement 1, 9-18
- SAS Institute. 1988. *SAS Language Guide for Personal Computer*. Versión 6'03, SAS Institute, Cary, NC.
- Satchell, D.P.N. y Satchell, R.S. 1988. Substitutions in the Carboxylic Acids and estheres. Interscience Publishers. New York, 431 pags.
- Schade, J.E. y King, A.D. 1984. Analysis of the Major *Alternaria* toxins. *J. Food Protect.* 47, 12, 978-995.
- Schurleff, M.C. 1980. Compendium of Corn Disease. *American Phytopathology Society*, St. Paul, MN.
- Siler, D.J. y Gilchrist, D.G. 1982. Determination of host-selective phytotoxins from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologia*, 116, 97-104.
- Siler, D.J. y Gilchrist, D.G. 1983. Properties of host specific toxins produced by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in culture and tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.*, 23, 265-274.
- Scott, P.M. y Kanhere, S.R. 1980. Liquid Chromatographic Determination of Tenuazonic Acid in Tomato Paste. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63, 3, 612-621.
- Scott, P.M. y Lawrence, G.A. 1992. Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. AOAC Int.*, 75, 5, 829-834.
- Scott, P.M. 1993a. Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 257-270.
- Scott, P.M. 1993b. Mycotoxins. General Referee Reports. *J. AOAC Int.*, 76, 1-7.
- Scott, P.M. y Lawrence, G. A. 1993c, Stability and Problems in determination of fumonisins in foods. *J. AOAC*

- Int.*, 76, 1-5.
- Scott, P.M. y Lawrence, G.A. 1994. Stability and Problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J. AOAC Int.*, 77, 541-545.
 - Shephard, G.B., Sydenham E.W., Thiel, P.G. y Gelderblom, W.C.A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.*, 13, 2077-2087.
 - Shephard, G.B., Thiel, P.G. y Sydenham, E.W. 1992. Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B-Bio. Med. Appl.*, 574, 299-304.
 - Shephard, G.B., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W. y Vleggaar, R. 1993. Isolation and Determination of AAL phytotoxins from corn cultures of the fungus *Alternaria alternata* f. sp *lycopersici*. *J. Chromatogr. A*, 64, 95-100.
 - Staab, H.A. 1962. Synthesen mit heterocyclischen Amidinen (Azoliden). *Angew Chem.*, 74, 12, 407-423.
 - Stack, M.E., Misleve, P.B. Roach, J.A.G. y Pohland, A. 1985. Liquid Chromatographic Determination of Tenuazonic Acid and Alternariol Methyl Ester in Tomatoes and Tomato Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 4, 640-642.
 - Streitweiser, A. y Heathcock, C.H. 1987. Química Orgánica. Edit. Interamericana. Barcelona. Mc Graw-Hill, 600 pags.
 - Sydenham, E.W., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G. y Marasas, W.F.O. 1990a. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 285-290.
 - Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., van Schalkwyk, D.J. y Koch, K.R. 1990b. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, southern Africa. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1900-1903.
 - Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G. Marasas, W.F.O. y Stockenström, S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2014-2018.
 - Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Stockenström, S. y Shephard, G.S. 1992. Ca(OH)₂ treatment: its influence on fumonisins B₁ in corn. Abstr. VII Int. IUPAC Symp. Mycotoxins Phytotoxins, Nov.8-11, 1992, Mexico City, Mexico, 43.
 - Sydenham, E.W., van Der Westuizen, L., Stockenström, S., Shephard, G.S. y Thiel, P.G. 1994. Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. *Food Addit. Contam.*, 11, 1, 25-32.
 - Takeda, K., Sawala, I. Suzuki, A. y Ogura, H. 1983. A convenient Synthesis of Peptide using Oxallates. *Tetrahedron Lett.*, 24, 41, 4451-4454.
 - Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. y Nieuwenhuis, J.J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1089-1093.
 - Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. y Gelderblom, W.C.A. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117, 3-9.
 - Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. y van Schalkwyk, D.J. 1993. Liquid chromatographic method for determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: a collaborative study. *J. AOAC Int.*, 76, 1, 500-508.
 - Ueno, Y., Aoyama, S., Sekijama, M., Masuda, M., Kim, D.J., Hasegawa, R. e Ito, N. 1992. Enhancement of GST-P-positive liver cell foci development by nivalenol, a trichothecene mycotoxin. *Carcinogenesis*, 13, 433-437.
 - vanMiddlesworth, F., Dufresne, C., Wincott, F.E., Mosley, R.T. y Wilson, K.E. 1992a. Determination of the relative and absolute stereochemistry of sphingofungins A, B, C and D. *Tetrahedron Lett.*, 3, 297-300.
 - vanMiddlesworth, F., Giacobbe, R.A., Lopez, M., Garrity, G., Bland, J.A., Bartizal, K., Fromtling, R.A., Polishook, J., Zweerink, M., Edison, A.M., Rozdilsky, W., Wilson, K.E. y Monighan, R.L. 1992b. Sphingofungins A, B, C and D; a new family of antifungal agents. 1. Fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*, 45, 861-867.
 - Visconti, A. y Doko, M.B. 1994. Survey of Fumonisin Production by *Fusarium* Isolated from Cereal in Europe. *J. AOAC Int.*, 77, 2, 546-550.
 - Vesonder, R.F., Labeda, D.P. y Peterson, R.E. 1992. Phytotoxic activity of selected water-soluble metabolite of *Fusarium* against *Lemna minor* L. (Duckweed). *Mycopathologia*, 118, 185-189.
 - Vesonder, R.F., Gasdorf, H. y Peterson, R.E. 1993. Comparison of Citotoxicities of *Fusarium* Metabolite AAL-toxin to cultured Mammalian Cell Lines. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 473-477.
 - Velázquez, C., vanBloemendal, C., Sanchis, V. y Canela, R. 1994. Derivation of Fumonisin B₁ y B₂ with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 6, 1535-1537.
 - Voss, K.A., Plattner, R.D., Bacon, C.W. y Norred, W.P. 1990. Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain

- MRC 826 culture material. *Mycopathologia*, 112, 81-92.
- Voss, K.A., Norred, W.P. y Bacon, C.W. 1990. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme*- contaminated corn, culture material and ammoniated culture material. *Mycopathologia*, 117, 94-104.
 - Volhardt, K.P.C. y Schore, N.E. 1995. Química Orgánica. Ediciones Omega. Barcelona. 1166 pags.
 - Wang, E.P., Ross, P.S., Wilson, T.M., Riley, R.T. y Merrill, A.H. 1992. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.*, 122, 1706-1709.
 - Wasserman, H.H, Robinson, R.P. y Carter, C.G. 1983., Total Synthesis of (±)-Chaenorbine. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 1697-1698.
 - Watanabe, Y., e Imai, K. 1982. *J. Chromatograp. A*, 239, 723-732.
 - Weibking, T.S., Ledoux, D.R. y Bermúdez, A.J. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing Known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. *Poult. Sci.* 72, 456-466.
 - WHO. 1979. Environmental Health Criteria, 11. Mycotoxins. *World Health Organization*. Ginebra.
 - Wicklow, D.T. 1994. The mycology of stored grain an ecological perspective. En: *Mycology of stored grain ecosystems* (Ed Dekker), New York 550 pags.
 - Widstrom, N.W. 1979. *J. Environ. Qual.*, 8, 124.
 - Wilson, B.J. y Maronpot, R.R. 1971. Causative fungal agent of leukoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.*, 88, 484-486.
 - Wilson, T.M., Maronpot, R.R., Hildebrandt, P.K. 1973. Equine leukoencephalomalacia. *JAVMA*, 163, 10-12.
 - Wilson, D.M. y Nuovo, G.J. 1974. *Appl. Microbiol.*, 26, 1094.
 - Wilson, T.M., Ross, P.F. y Rice, L.G. 1990. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 2, 213-216.
 - Wilson, T.M., Ross, P.F., Owens, L.G., Rice, S.A., Green, S., Jenkins, J. y Nelson, H.A. 1992. Experimental reproduction of *ELEM*. *Mycopathologia*, 117, 115-120.
 - Yoshigawa, T., Yamashita, A. y Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for humans and animals health. Editorial Pathotox Publisher, Park Forest, IL.

7. Espectros

[Figura 7-1](#)

[Figura 7-2](#)

[Figura 7-3](#)

[Figura 7-4](#)

[Figura 7-5](#)

[Figura 7-6](#)

[Figura 7-7](#)

[Figura 7-8](#)

[Figura 7-9](#)

[Figura 7-10](#)

[Figura 7-11](#)

[Figura 7-12](#)

[Figura 7-13](#)

[Figura 7-14](#)

[Figura 7-15](#)

8. Fórmulas

[Figura 8-1](#)

[Figura 8-2](#)

[Figura 8-3](#)

[Figura 8-4](#)

[Figura 8-5](#)

[Figura 8-6](#)

[Figura 8-7](#)

[Figura 8-8](#)

[Figura 8-9](#)

[Figura 8-10](#)

[Figura 8-11](#)

[Figura 8-12](#)

[Figura 8-13](#)

[Figura 8-14](#)

[Figura 8-15](#)

[Figura 8-16](#)

[Figura 8-17](#)