

## 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 FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, respectivamente. Una vez analizados los contenidos las fracciones metánicas 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 FB<sub>2</sub>, entre las fracciones 25-35 (12%) aparece una mezcla de FB<sub>2</sub>-FB<sub>1</sub> y finalmente las fracciones 36-50 (30%) rinden básicamente FB<sub>1</sub>.

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 FB<sub>2</sub> y FB<sub>1</sub>, respectivamente. En ambos casos se recogieron un total de 40 fracciones. Para la fracción enriquecida con FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub>.

##### 4.1.1.3. Purificación mediante columnas de fase inversa (C<sub>18</sub>).

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

FB<sub>2</sub> y FB<sub>1</sub>, 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 FB<sub>1</sub> 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 FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub>), 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 FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>.

Así los extractos empleados fueron las fracciones obtenidas por ambos sistemas de elución tanto para la FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>. 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 FB<sub>2</sub> las fracciones 4-5 (2'5%) conteniendo básicamente FB<sub>2</sub>, 6-10 (13%) conteniendo FB<sub>2</sub> menos purificadas, debido a la presencia de más picos cromatográficos que en las fracciones anteriores. Para la FB<sub>1</sub> 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 FB<sub>1</sub>.

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 FB<sub>1</sub> y para la FB<sub>2</sub>, 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 (FB<sub>1</sub>extracto/FB<sub>1</sub>patrón) = 90% de contenido de la toxina en los extractos, mientras que para la (FB<sub>2</sub>extracto/FB<sub>2</sub>patrón) = 43% de contenido de la toxina frente a la respuesta del patrón.

## **4.2. Estudio del rendimiento de las extracciones de maíz con FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>**

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 FB<sub>1</sub> entre 4 a 5 µg/g y para la FB<sub>2</sub>, entre 1 a 2 µg/g.

Método	nº de muestras (n)	Contenido en FB <sub>1</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )	Contenido en FB <sub>2</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )
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

#### <sup>1</sup> Error típico.

Como que  $Pr > F$  (0'491) para la FB<sub>1</sub> y (0'433) para la FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub>, y la FB<sub>2</sub>.

**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 <sub>1</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )	Contenido en FB <sub>2</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )
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

#### <sup>1</sup> Error típico.

Como que  $Pr > F$  (0'482) para la FB<sub>1</sub>, y (0'222) para FB<sub>2</sub>, ambos valores son mayores que 0'05 ( $\alpha=0'5\%$ ) 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 FB<sub>1</sub>, 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 FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub> y la FB<sub>2</sub> 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 FB<sub>1</sub>. Mientras que en las muestras de 5 g, los picos obtenidos para la FB<sub>2</sub> 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	n° de muestras (n)	Contenido en FB <sub>1</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )	Contenido en FB <sub>2</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )
Shepard y col. (1990)			
Parcial	5	4'7 ± 0'63	1'6 ± 0'22
Final	5	6'0 ± 0'76	2'1 ± 0'27

### <sup>1</sup> Error típico.

Como que  $Pr > F$  (0'212) para la FB<sub>1</sub>, y la (0'214) para la FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub> y de 1'5 µg/g para FB<sub>2</sub>, que resultan ser inferiores a los valores finales obtenidos 6 µg/g de FB<sub>1</sub> y 2 µg/g de FB<sub>2</sub>, 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	n° de muestras (n)	Contenido en FB <sub>1</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )	Contenido en FB <sub>2</sub> (µg/g + SE <sup>1</sup> )
Scott y col. (1992)			
Parcial	3	4'7 ± 0'49	1'1 ± 0'36
Final	3	6'3 ± 0'72	1'3 ± 0'49

### <sup>1</sup> Error típico.

Como que  $Pr > F$  (0'154) para la FB<sub>1</sub> y de (0'743) para la FB<sub>2</sub>, 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 <sub>1</sub>	Contenido en FB <sub>2</sub>
1 g	(n)	(µg/g + SE <sup>1</sup> )	(gWg + SE)
Parcial	5	4'3 ± 0'89	1'7 ± 0'31
Final	5	4'9 ± 0'83	1'9 ± 0'34

#### <sup>1</sup> Error típico.

Como que  $Pr>F$  (0'608) para la FB<sub>1</sub>, y (0'537) para FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>.

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 (C<sub>18</sub>) Novapak (0'39 x 15 cm) y un gradiente a partir de dos disoluciones, la primera una mezcla compuesta por una disolución acuosa de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 ( $\lambda_{ex}$ ) de 335 nm y un filtro de emisión ( $\lambda_{em}$ ) 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 FB<sub>1</sub> y de FB<sub>2</sub>. Las respuestas cromatográficas se deben a unas cantidades de toxinas inyectadas de 7'5 hasta 750 ng.

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

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

<sup>b</sup> Grados de libertad.

<sup>d</sup> Coeficiente de determinación.

**Tabla 4.6.:** Estudios de la linealidad de la respuesta de las FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> 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 FB<sub>1</sub> y de FB<sub>2</sub>. 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 <sub>1</sub> <sup>a</sup>		FB <sub>2</sub> <sup>a</sup>	
	X ± SD	X ± SD <sup>b</sup>	X ± SD	X ± SD <sup>b</sup>
0 <sup>c</sup>	16'5 ± 1'30		13'3 ± 0'85	
1 <sup>c</sup>	17'6 ± 1'10	18'1 ± 0'73	13'1 ± 1'10	12'5 ± 0'85
4 <sup>c</sup>	18'1 ± 0'73	15'8 ± 2'10	13'2 ± 1'10	12'7 ± 0'56
6 <sup>c</sup>	17'5 ± 0'50	15'8 ± 2'10	13'2 ± 0'75	12'7 ± 0'56
24 <sup>d</sup>	16'4 ± 0'65	17'2 ± 0'65	13'0 ± 0'29	13'5 ± 0'40
48 <sup>e</sup>	17'5 ± 1'80	17'3 ± 1'50	13'6 ± 0'80	13'4 ± 0'65

<sup>a</sup>(altura x 1000) de los picos medidas en mV.

<sup>b</sup> Reacciones a tiempo = 0 h, <sup>c</sup> inyecciones del día 1, <sup>d</sup> inyecciones del día 2, <sup>e</sup> inyecciones del día 3.

**Tabla 4.7.:** Estudios de estabilidad de los derivados de la FB<sub>1</sub>, y FB<sub>2</sub>, 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 (C<sub>18</sub>), Novapak (0'39 x 15 cm), la fase móvil consistió en un gradiente que empleaba dos disolventes: (A) (metanol, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0'1M)= 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 FB<sub>1</sub> y de FB<sub>2</sub>.

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

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

<sup>b</sup> Intercepción con el eje "y", medidas en µV.

<sup>c</sup> Grados de libertad.

<sup>d</sup> Coeficiente de determinación.

**Tabla 4.8.:** Estudios de la linealidad de la respuesta de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> 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 FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, 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 <sub>1</sub> <sup>a</sup>		FB <sub>2</sub> <sup>a</sup>	
	X ± SD	X ± SD <sup>b</sup>	X ± SD	X ± SD <sup>b</sup>
0 <sup>c</sup>	58'17 ± 1'72		54'85 ± 2'06	
1 <sup>c</sup>	60'33 ± 1'95	67'30 ± 3'22	56'43 ± 3'38	70'90 ± 3'32
6 <sup>c</sup>	50'43 ± 2'25	56'20 ± 2'70	49'37 ± 2'11	52'50 ± 1'06
24 <sup>d</sup>	54'13 ± 2'40	48'77 ± 2'65	47'53 ± 2'12	45'50 ± 1'83
48 <sup>e</sup>	50'50 ± 0'96	51'50 ± 0'44	46'97 ± 0'42	51'93 ± 1'62

<sup>a</sup> (áreas x 1000) de los picos medidas en mV

<sup>b</sup> Reacciones a tiempo = 0 h, <sup>c</sup> inyecciones del día 1, <sup>d</sup> inyecciones del día 2,

<sup>e</sup> inyecciones del día 3.

**Tabla 4.9.:** Estudios de estabilidad de los derivados de la FB<sub>1</sub>, y FB<sub>2</sub>, 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 FB<sub>1</sub> es tres veces mayor en el reactivo OPA y para la FB<sub>2</sub> 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 <sub>1</sub> (mm)	Altura del ruido de fondo* (mm)	Límite de detección FB <sub>1</sub> (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 FB<sub>1</sub> con los reactivos OPA y AccQ.Fluor. Relación (señal, ruido)= 3:1.

Reactivo	Altura del pico FB <sub>2</sub> (mm)	Altura del ruido de fondo * (mm)	Límite de detección FB <sub>2</sub> (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 FB<sub>2</sub> 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 <sub>B</sub> )	Coordenada y (b + 3S <sub>B</sub> )	Límite de detección FB <sub>1</sub> (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 FB<sub>1</sub> con los reactivos OPA y AccQ.Fluor.

Tipos de reactivo	Ordenada al origen (b)	Desvío estándar del blanco(S <sub>B</sub> )	Coordenada Y (b + 3S <sub>B</sub> )	Límite de detección FB <sub>1</sub> (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 FB<sub>2</sub> 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 <sub>1</sub> <sup>a</sup>		FB <sub>2</sub> <sup>a</sup>	
	Método Shephard <sup>b</sup>	Método AccQ.Fluor	Método Shephard <sup>b</sup>	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

<sup>a</sup> Concentraciones en µg/g, <sup>b</sup> 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 FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>.

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

E	AccQ20 <sup>c</sup>	2	1'20 ± 0'10	0'37 ± 0'01
E	AccQ40 <sup>d</sup>	2	ND	ND

<sup>a</sup> 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.

<sup>b</sup> Derivatizaciones según el apartado (3.3.1.2)

<sup>c</sup> Derivatizaciones según el apartado (3.3.2.5).

<sup>d</sup> Derivatizaciones según el apartado (3.3.2.6).

ND sin datos.

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

1: 1, v/v

E: (acetonitrilo, NaHCO, 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 FB<sub>1</sub>, 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)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.

#### **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  $\beta$ -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 *terc*-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 CF<sub>3</sub>COOH, 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 diluído 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 (C<sub>18</sub>)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<sub>3</sub> para neutralizar el exceso de ácido y seca con MgSO<sub>4</sub>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 esteres 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 [<sup>1</sup>H] 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 redisolver 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 Rf 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 frutas (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 24h 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<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O, siendo el peso molecular de 312. Mientras que el producto resultado de la unión de **XVI** y la octilamina tiene una fórmula C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 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 las 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 las 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)	( $\mu\text{V} \cdot \text{seg}$ )	( $\mu\text{V}$ )
$10^{-1}$	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  $\mu\text{l}$ .

\*\*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)	( $\mu\text{V} \cdot \text{seg}$ )	( $\mu\text{V}$ )
$10^{-1}$	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  $\mu\text{l}$ .

\*\*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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  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  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 0'1\text{M}$  de  $\text{pH} = 8'5$ , 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  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 0'1\text{M}$  se le adiciona un volumen equivalente de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 0'1\text{M}$  la estabilidad de la urea es mucho mayor. Hecho que confirma la dependencia de los valores de  $\text{pH}$  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  $60^\circ\text{C}$  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** ( $0'5 \text{ mg/ml}$ ) 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  $6 \text{ mg/ml}$  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)
	<b>3 h</b>	<b>24 h</b>
$5'7 \cdot 10^{-1}$	18'376	18'718
1,71	52'539	57'712
10'31	322'741	324'899

Concentración de XVI=  $6 \text{ mg/ml}$ .

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  $\text{pH}$  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  $\mu\text{mol}$  de urea teóricos dan casi la misma respuesta que los 3'3  $\mu\text{mol}$  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 intermedias 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.

