METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE FUMONISINAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

CELESTE M. LINO*, LILIANA J. G. SILVA, ANGELINA PENA

As fumonisinas são micotoxinas que ocorrem a nível mundial, principalmente em milho e seus derivados, e que podem afectar a saúde animal e humana. É assim essencial a análise de biomarcadores para avaliar a exposição animal e humana às referidas fumonisinas.

Este artigo revê as diferentes metodologias analíticas para a determinação destes biomarcadores, as próprias fumonisinas e o rácio esfinganina/esfingosina, em amostras biológicas, incluindo os diferentes procedimentos usados na extracção, purificação, derivatização, detecção e quantificação.

INTRODUÇÃO

As fumonisinas (FBs) são produzidas principalmente pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* [1]. Ambas as espécies são isoladas no milho, sendo a primeira a mais prevalente [2].

Existem diferentes séries de FBs estruturalmente relacionadas [3]. No entanto, a que se encontra em maior abundância é a fumonisina B₁ (FB₁), sendo também a mais tóxica, seguindo-se a FB₂ e a FB₃ [4].

A FB₁ é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico e 2S-amino-12-S,16R-dimetilo-3S,5R,10R,14S,15R-pentahidroieicoisano, em que os grupos hidroxilos em C₁₄ e C₁₅ estão esterifi-

cados com um grupo carboxilo terminal do ácido tricarboxílico. A FB₂ não possui o grupo hidroxilo em C₁₀, enquanto que a FB₃ não apresenta o grupo hidroxilo em C₅ (Figura 1) [5].

As fumonisinas são moléculas fortemente polares, solúveis em água e acetonitrilo e insolúveis em solventes orgânicos [5].

A contaminação de alimentos e rações com FBs tem sido associada a doenças várias, quer em animais quer em humanos. Lino *et al.* [5], num artigo de revisão, aludiram a estas patologias, sendo frequentemente citadas, entre outras [6-8], a leucoencefalomalacia equídea (ELEM), edema pulmonar (PPE) em suínos e a toxicidade renal em diferentes espécies. Têm sido epidemiologicamente relacionadas com

o cancro esofágico (EC) em humanos [9] e são suspeitas do aumento da incidência de defeitos no tubo neural (NTD) [10]. Com base nos dados actuais, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro classificou a FB₁ como possivelmente carcinogénica para o homem, incluindo-a no grupo 2B [11].

Uma forma de avaliar a exposição de populações às FBs consiste em calcular a respectiva ingestão diária estimada (EDI), através dos níveis de fumonisinas ingeridos nos distintos itens alimentares. Outra consiste em avaliar os níveis de FBs ou de outros biomarcadores seguros, como a proporção esfinganina/esfingosina (Sa/So) em amostras biológicas [12-15] uma vez que estas micotoxinas interferem no metabolismo dos esfingolípidos [5, 12] (Figura 2).

Fumonisina B1: R1= OH; R2= OH; R3= OH;
Fumonisina B2: R1= OH; R2= OH; R3= H;
Fumonisina B3: R1= H; R2= OH; R3= OH;

Figura 1 Fórmula estrutural das fumonisinas B₁-B₃

Figura 2 Modo de acção das fumonisinas

* Grupo de Bromatologia - Centro de Estudos Farmacêuticos, - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 3000-295 Coimbra, Portugal
cmlino@ci.uc.pt

Apesar dos resultados obtidos a partir do cálculo da ingestão diária serem úteis numa primeira etapa, estes revelam-se pouco precisos porque são baseados na análise de alguns alimentos e em tabelas relativas ao consumo através da dieta [16].

Os níveis reduzidos de FBs no plasma e o seu rápido declínio após a respectiva administração, bem como o insucesso de todos os estudos em detectar quantidades significativas de metabolitos circulantes, mostram que aqueles não são adequados para serem utilizados como biomarcadores na exposição de animais a estas toxinas. Contudo, a observação de que a FB₁ e a FB₂ inibem a enzima N-aciltransferase na biossíntese de novo de esfingolípido, levando a uma acumulação de esfingina, uma base esfingóide, e a um aumento do rácio esfingina-esfingosina sugere que esta proporção é um biomarcador com potencial e preferencial relativamente às FBs [5, 17]. Consequentemente torna-se fundamental desenvolver métodos eficientes para monitorizar a exposição humana com o uso de biomarcadores apropriados de forma a garantir a saúde humana [18, 19].

Na determinação de FBs em amostras biológicas, a grande maioria dos métodos referenciados envolve extracção, recorrendo a misturas de solventes polares, seguida de um processo de purificação com extracção em fase sólida (SPE) com colunas de fase reversa (C₁₈) [19, 20], cartuchas de troca iónica forte (SAX) [21, 22] e com resina polimérica não iónica Amberlite XAD-2 em mistura com SAX [13]. Na análise de Sa e de So as amostras são sujeitas a extracção, seguida ou não de um processo de purificação com extracção em fase sólida (SPE) com sílica gel [23, 14].

Após derivatização com orto-ftalaldeído (OPA), usado na maior parte dos casos [14, 21-23], ou outro agente de derivatização como o naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) [24], a detecção e quantificação de ambos os biomarcadores são efectuadas recorrendo, principalmente, a mé-

todos cromatográficos, sendo a cromatografia líquida (LC) com detecção fluorimétrica (LC-FD) [17, 19, 21, 23, 25] a mais utilizada. A detecção por espectrometria de massa (LC-MS) [9, 22] tem como vantagem não requerer derivatização. A cromatografia em camada fina (TLC) [19], os métodos imuno-histológicos [26] e os radioactivos [18] são também reportados, embora menos usados.

Neste artigo são abordadas diferentes metodologias analíticas bem estabelecidas e validadas, aplicadas à extracção, purificação, derivatização, detecção, quantificação e confirmação de FBs e esfingina-esfingosina em amostras biológicas.

METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS

Em 1992, Shephard *et al.* [21] reportaram pela primeira vez um método para a determinação da FB₁ em fluídos biológicos, plasma e urina, de ratos macho BDIX. Até esta data a metodologia analítica usada na determinação da FB₁ restringia-se à sua quantificação em materiais de cultura, milho, rações e alimentos à base de milho.

EXTRACÇÃO

Em virtude de se tratar de moléculas fortemente polares, as FBs são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos [27]. Na extracção, nomeadamente para a desproteinização, os solventes de eleição são o metanol (MeOH) [9, 21, 22, 28] e o acetonitrilo (ACN) [9, 20]. Na remoção de lípidos recorre-se à utilização de hexano [9, 22].

Chelule *et al.* [19] determinaram a presença de FB₁ em fezes humanas, procedendo à extracção com EDTA, acidificação e centrifugação.

Os métodos analíticos previamente desenvolvidos para a determinação de FB₁ em amostras fisiológicas foram modificados por Shephard *et al.* [20] para tornar possível a determinação de FB₂. Esse objectivo foi atingido pelo uso de solventes de extracção

menos polares uma vez que esta micotoxina apresenta uma polaridade inferior à da FB₁.

Tal como a FB₁, a FB₂ é fortemente retida na matriz fecal e apenas por repetições sucessivas do processo extractivo é possível uma adequada recuperação analítica. O metanol simples não é indicado para ser utilizado como solvente de extracção na análise desta matriz, aumentando-se a eficiência extractiva com a utilização da mistura EDTA-MeOH [20]. Também a extracção de FBs a partir da matriz cabelo humano é complexa e morosa, para além de exigir pré-tratamento exaustivo da referida matriz [22].

PURIFICAÇÃO

A purificação é conseguida recorrendo à extracção em fase sólida (SPE) em fase reversa, usando sílica octadecilgada (C₁₈) [17, 19, 20, 28] ou troca aniónica (SAX) [9, 13, 17, 21, 22, 28] e ainda Amberlite XAD-2 [13].

Shephard *et al.* [21] efectuaram a purificação de urina e de plasma de ratos macho BDIX para determinar a presença de FB₁ com SPE, usando cartuchas SAX acondicionadas com MeOH e MeOH-H₂O, sendo a eluição efectuada com ácido acético (CH₃COOH) em MeOH. Após evaporação o resíduo redissolve-se em MeOH. Segundo estes autores, a urina contém elevadas concentrações de interferentes, o que obsta a purificação com cartuchas SAX. Assim, para obter recuperações e reprodutibilidade aceitáveis, pequenos volumes de urina devem ser diluídos diversas vezes antes de se iniciar a fase de purificação. Shephard *et al.* [20] procederam de forma semelhante na determinação de FB₂ em amostras animais, no entanto, com excepção da urina, o resíduo foi redissolvido em borato de sódio.

Shetty e Bhat [13] defendem que o método de Shephard *et al.* [21] não pode ser aplicado na análise de urina humana devido ao elevado número de interferentes, tendo usado um método mais sensível para determinar FB₁ neste fluído biológico. Para ultrapassar este inconveniente, o processo de purificação foi realizado em duas

etapas, com resina Amberlite XAD-2 e com cartuchas SAX, o que permitiu a ausência de picos interferentes aquando da análise cromatográfica sem comprometer a recuperação da FB₁. Estes autores defendem que, através da aplicação deste método, é possível detectar quantidades diminutas (limite de detecção, LOD, inferior a 8 ng/mL) de FBs em urina de indivíduos que consomem uma dieta contaminada.

As cartuchas SAX foram também escolhidas por Sewram *et al.* [22] na análise de FBs em cabelo humano, por Meyer *et al.* [9] na análise de tecidos de suínos, por Shephard e Snijman [17] na purificação de extractos de plasma e urina e por Sewram *et al.* [28] em extractos de amostras de pêlo de macacos vervet. Estes autores recorreram também à utilização de colunas C₁₈. Na purificação de extractos fecais, quer aquando da análise de FB₁ ou de FB₂ verifica-se a utilização de colunas C₁₈ [17, 19, 20].

Na Tabela 1 encontram-se sumariadas as condições cromatográficas utilizadas pelos vários autores.

Figura 3 Reacção de derivatização com OPA (A: OPA; B: fumonisinas; C: derivado OPA; D: MCE)

Shephard *et al.* [20, 21] realizaram uma derivatização pré-coluna adicionando 200 µL de OPA a 50 µL de resíduo redissolvido. O derivado OPA apresentou-se estável durante 4 minutos. Este método já havia sido usado na determinação de FB₁ em rações à base de milho. Assim, a utilização de OPA foi investigada com o objectivo de desenvolver uma metodologia analítica para quantificar FB₁ em amostras fisiológicas, tendo sido bem conseguida a separação do derivado OPA/FB₁.

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Tal como na determinação de fumonisinas em milho e em alimentos à base de milho [30], a cromatografia de alta eficácia (LC) é a técnica de separação

analítica para a determinação de FB₁ em amostras biológicas de rato usando colunas de sílica octaligada (C₈). Outras colunas analíticas de fase reversa, como C₁₈ têm sido usadas mais recentemente [9, 17, 19, 20, 22, 29].

Na maioria dos casos é usada eluição isocrática, sendo a fase móvel mais recorrente a mistura MeOH-NaH₂PO₄ [17, 19-21, 29]. Sewram *et al.* [22] e Meyer *et al.* [9] usaram eluição em gradiente. Assim, os primeiros autores, fizeram variar ao longo do tempo da corrida a proporção de H₂O-ACN-ácido fórmico. Os segundos autores empregaram os mesmos solventes, mas isoladamente e em mistura: A: ACN; B: H₂O; C: H₂O-ácido fórmico.

Como as FBs apresentam um comportamento iónico em solução, as separações em colunas de fase reversa são baseadas numa mistura de mecanismos de fase reversa e de troca iónica. Observa-se uma grande variação de selectividade entre as diferentes colunas. As FBs não eluem convenientemente da maior parte das

Tabela 1 Condições cromatográficas por LC para a determinação de bases esfingóides em amostras biológicas

Coluna analítica			Fase Móvel		Fluxo (mLmin ⁻¹)	λ (nm) OPA	Gama linearidade	Limite de detecção	Referência
Tipo	Comprimento d.i. (cm)	Tamanho da partícula (µm)	Eluição isocrática	Eluição em gradiente					
RP-C ₈	12,5	4,0 5	MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (66:34) ajustado a pH 3,4 com H ₃ PO ₄		1	Exc:335 Em:440	—	50 ng/mL	[21]
RP-C ₁₈	5	4,0 3	MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (72:28) ajustado a pH 3,4 com H ₃ PO ₄		1	Exc:335 Em:440	—	—	[17,20,29]
RP-C ₁₈	15	3,9	ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (50:50:1)		1	Exc:335 Em:440	—	< 8 ng/mL	[13]
RP-C ₁₈	15	3,9	MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (80:20) ajustado a pH 3,4 com H ₃ PO ₄		1	Exc:335 Em:440	—	50 ng/g	[19]
RP-C ₁₈	15	4,6 5		A-H ₂ O:ACN:Ác. fórmico (90:10:0,1) B-H ₂ O:ACN:Ác. fórmico (10:90:0,1)	0,7		LOQ=100 µg/L	25 pg	[22]
RP-C ₁₈	15	2,1 3,5		A-ACN B-H ₂ O C-H ₂ O:Ácido fórmico (95:5)	0,2		—	ND a 2 µg/kg	[9]

— Informação não disponível

DERIVATIZAÇÃO

O reagente de derivatização eleito na análise de FB₁ e de FB₂ em amostras fisiológicas é o orto-ftaldeído (OPA) [13, 17, 19-21, 29]. A reacção de derivatização dá-se entre o reagente derivatizante e a amina primária das fumonisinas, na presença de 2-mercaptoetanol (MCE) (Figura 3).

mais usada na determinação destas micotoxinas em amostras biológicas.

As fumonisinas, moléculas polares, solúveis em água e em solventes polares, são ideais para a detecção e a quantificação por LC em fase reversa. Em 1992, Shephard *et al.* [21] reportaram, pela primeira vez, metodologia

colunas de fase reversa quando são injectadas com sistemas de solventes neutros e não tamponizados. Para se conseguirem melhores resultados a fase móvel deve ser ácida, o que se consegue através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil [30]. A LC-FD é amplamente usada na aná-

lise de FBs em alimentos para consumo humano e animal, sendo também amplamente usada na análise das mesmas em amostras biológicas. A grande parte dos investigadores recorre ao detector de fluorescência, estabelecendo como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) 335nm e como comprimento de onda de emissão (λ_{em}) 440nm, uma vez que o agente de derivatização escolhido é o OPA [19-21, 29].

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) permite a análise directa e a confirmação das FBs [31]. Sewram *et al.* [22] e Meyer *et al.* [9] usaram a interface electro-spray na análise de FBs. Sewram *et al.* [22] optimizaram os parâmetros MS separadamente para a FB₁, FB₂ e FB₃. Uma energia de colisão de 32% foi usada para fragmentar os iões moleculares protonados e os iões resultantes de cada fumonisina foram monitorizados e usados como indicadores da presença destas micotoxinas em cabelo humano. A aplicação de LC-MS permitiu incrementar a especificidade da detecção.

No estudo de Meyer *et al.* [9] a FB₁ foi fragmentada e monitorizada tendo a sua identificação e quantificação sido feita com base nos tempos de retenção e área dos picos dos iões seleccionados (m/z 722, 388, 300) por comparação com um padrão externo.

A aplicação de técnicas de espectrometria de massa permite a obtenção de limites de detecção (LODs) na ordem dos 25pg em amostras de cabelo humano [22], 1 μ g/kg em tecido muscular e adiposo de suínos e 2 μ g/kg em tecido cardíaco de suínos [9]. Os autores que aplicaram detecção por fluorescência na análise de FBs em amostras biológicas reportaram LODs na ordem dos 50ng/mL para urina de ratos macho BDIX [21], 8ng/mL para urina humana [13] e 0,05 μ g/kg para fezes humanas [19].

Chelule *et al.* [19] também analisaram a presença de FB₁ em fezes humanas por cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica. A dissolução dos extractos secos foi efectuada com ACN-H₂O, o desenvolvimento com

butanol-H₂O-CH₃COOH e a revelação por pulverização com anisaldeído. A purificação insuficiente com C₁₈ levou ao aparecimento de interferências. O facto de algumas amostras serem positivas quando analisadas com TLC e negativas quando analisadas com LC, pode dever-se ao anisaldeído que não é específico para as FBs.

Também Shephard *et al.* [20] usaram TLC para analisar a pureza radio-química da ¹⁴C-FB₂ isolada a partir de culturas de *F. moniliforme* marcadas com carbono radioactivo.

Em 1996, Prelusky *et al.* [18] aplicaram métodos radioactivos para o estudo da distribuição de resíduos de derivados ¹⁴C em amostras biológicas de suínos Yorkshire alimentados com FB₁ marcada. Para medir a radioactividade das amostras, estas foram analisadas através dum procedimento de combustão de oxigénio. As medições feitas por contagem de cintilação líquida (LSC) foram corrigidas para eficiência de combustão, diluição, extinção, fundo e eficiência de contagem. O limite de detecção em tecidos foi de aproximadamente 46ng/g.

As características hidrofílicas das FBs conduzem à sua rápida excreção dos tecidos animais. Métodos mais sensíveis são necessários para a visualização directa de FBs *in situ*. Uma técnica capaz de identificar as FBs antes da sua excreção seria útil para a sua detecção em tecidos e poderia explicar a origem de algumas lesões. Alguns métodos imuno-histoquímicos têm sido avaliados. A técnica da avidina-biotina-peroxidase consiste numa combinação de técnicas anatómicas, imunológicas e histoquímicas que permite a localização de antígenos específicos em estruturas de tecidos definidas. Foi desenvolvida uma reacção específica entre a FB₁-anticorpo monoclonal e o sistema avidina-biotina-peroxidase para demonstrar a presença de FBs em células hepáticas e renais de aves, tendo permitido melhorar o diagnóstico patológico de lesões agudas e sub-agudas [26]. Através da utilização de anticorpos monoclonais anti-FB₁ e do sistema avidina-biotina-peroxidase, o fígado e rins de frangos Leghorn brancos, aos quais foi administrada FB₁ e FB₂, foram analisados por Buim *et*

al. [26] com o objectivo de detectar e conhecer a distribuição de FBs. Desta reacção resulta um complexo electro-nodenso que pode ser analisado ao microscópio óptico ou electrónico.

METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO Sa/So

A medição directa de FBs em amostras biológicas não é um bom indicador da exposição, nomeadamente humana, às FBs uma vez que estas micotoxinas são eliminadas pouco tempo após a ingestão [32]. A estrutura química das FBs assemelha-se largamente com a da esfingosina e a da esfingani-na (Figura 4), inibindo a enzima ceramida sintetase, uma enzima chave no metabolismo dos esfingolípido, levando à acumulação de esfinganina e à redução dos níveis de esfingolípido complexos [23].

EXTRACÇÃO

Em 1994, Riley *et al.* [23] reportaram, pela primeira vez, metodologia analítica complexa e morosa [14] para a determinação do rácio Sa/So a partir de soro, urina e tecidos animais diversos. Após extracção com CHCl₃-MeOH, incubação a 37°C, adição de CHCl₃ e H₂O alcalinizada e centrifugação, a fase orgânica, após secagem e evaporação, é submetida a um processo de hidrólise alcalina com o objectivo de clivar os acilglicerolípido e hidrolisar os lisoesfingolípido libertando, assim, a esfingosina. A detecção de Sa livre é complexa já que a eficiência extractiva por vezes é baixa, podendo esta limitação ser problemática quando o seu conteúdo é da ordem de pmol/g, observando-se também variações intra e interindividuais na quantificação da Sa e da So. Nesta situação a utilização do padrão interno Sa C:20 simplifica a quantificação. O seu uso é, no entanto, desnecessário quando, para se detectar a inibição da Sa N-aciltransferase induzida pelas FBs, se utiliza a elevação do rácio Sa/So e não as bases esfingóides isoladamente [14, 23, 25, 33].

A metodologia de Riley *et al.* [23] foi seguida por outros autores [32-36], embora com algumas modificações,

nomeadamente no que diz respeito à adição de NH_4OH à amostra [14, 32].

Numa tentativa de melhoramento do processo anterior, alguns autores optaram pelo recurso à hidrólise ácida com a finalidade de libertar as bases esfingóides a partir dos esfingolípidos complexos [37].

Na determinação de Sa e So em soro de ratos BDIV e de humanos alguns autores optam pelo acetato de etilo [38, 39] que permitiu reduzir o tempo dispendido no processo extractivo e obtenção de recuperações mais elevadas. Não obstante, a sensibilidade deste método na análise de soro humano não é completamente satisfatória [38].

baixas sensibilidades, recorre-se ao aumento do volume da amostra. Assim, Qui e Liu [25] e Garren *et al.* [39] extraíram 2 mL de urina de indivíduos do género feminino e 40-60 mL de urina de indivíduos do género masculino.

PURIFICAÇÃO

A grande maioria dos autores não recorre à purificação dos extractos [23-25, 32-35, 37, 38, 39, 42]. Porém outros optam por SPE com uma minicolumna de sílica gel [14, 43], que permite reduzir o tempo de análise comparativamente com os que recorrem à hidrólise alcalina. A eluição das bases esfingóides é efectuada com $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ e o resíduo foi redissolvido em $\text{MeOH-H}_2\text{O}$.

repouso após a adição do agente derivatizante.

Tal como a extracção, o processo de derivatização reportado por alguns autores [23, 32, 33] é também complexo, uma vez que, após adição de OPA, envolve a centrifugação.

Yoo *et al.* [37] desenvolveram um processo de derivatização simplificado, ressuspendendo o resíduo de bases esfingóides livres em tampão da fase móvel seguido de adição de OPA. Relativamente às bases esfingóides dos esfingolípidos complexos, o resíduo é redissolvido em etanol seguido de diluição em tampão da fase móvel e adição de OPA.

Solfrizzo *et al.* [14] recorreram a um processo de derivatização com OPA mais simples. O método de extracção e de derivatização proposto por estes autores demora, na sua totalidade, 2 horas por oposição ao método de Riley *et al.* [23] que necessita de 9 horas para a sua execução.

A derivatização com OPA é usada rotineiramente na medição dos níveis de bases esfingóides, uma vez que o facto de apresentar boa resolução no modo de fase reversa permite uma quantificação reprodutível. A reacção ocorre com o grupo amina primário das bases esfingóides, formando-se um fluoróforo isoindole, na presença de MCE. Contudo, por vezes, os derivados OPA são instáveis à temperatura ambiente, podendo esta instabilidade ser parcialmente explicada pela desintegração das estruturas isoindole e, por outro lado, pela oxidação experimentada ao longo do tempo pelo MCE. Deste modo, metodologia mais sensível e estável é fundamental na análise de pequenas quantidades de amostra ou amostras com conteúdo reduzido de bases esfingóides [24]. Com o objectivo de aumentar a referida estabilidade, alguns autores optam pela refrigeração o que permite que os derivados permaneçam estáveis durante 24 horas [37, 40].

Cho *et al.* [24] obviaram este problema usando NDA. O princípio desta derivatização é a reacção do NDA, a 60°C , na presença do ião cianeto, com o grupo amina das bases esfingóides,

Figura 4 Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisina B₁

Shephard e Westhuizen [40] adaptaram o método que Solfrizzo *et al.* [14] usaram para a determinação do rácio Sa/So na urina, para procederem à análise no soro, defendendo que a determinação de bases esfingóides nesta matriz permite ultrapassar o obstáculo levantado pelos baixos níveis de Sa presentes na urina de indivíduos do género masculino. Após desproteinização do soro com MeOH, centrifugação, mistura com H_2O e NH_4OH , a extracção foi efectuada com CHCl_3 . Esta metodologia foi seguida na análise do rácio Sa/So em plasma e urina de populações rurais da África do Sul expostas a FBs [41].

Para obviar o problema das baixas concentrações de Sa livre na urina nos indivíduos do género masculino [14, 39], o que inevitavelmente origina

Embora para a generalidade das matrizes tal purificação seja adequada, para o soro humano verifica-se a necessidade de proceder a uma hidrólise alcalina dos eluídos para eliminação de interferências que ainda permaneciam no eluído. Esta metodologia foi aplicada a plasma e urina de humanos por Westhuizen *et al.* [41].

DERIVATIZAÇÃO

Na análise de Sa e de So em amostras biológicas, o agente de derivatização mais usado é, à semelhança do que sucede com as FBs, o ortoftaldeído (OPA) na presença de MCE [14, 23, 25, 32-35, 37, 38, 39, 42, 43] (Figura 3).

Os volumes de OPA empregues são diversos, bem como os tempos de

formando-se um derivado 1-ciano-2-
-alquil-benzoisindole (CBI), uma es-
trutura altamente fluorescente (Figura
5). Comparativamente à derivatização
com OPA, a fluorescência dos deriva-
dos OPA diminui 36,8% [24]. Situação
análoga foi verificada por Lino *et al.*
[44] na análise de amostras de milho
e seus derivados. A intensidade da
fluorescência, apresentada pelo NDA
é também maior [24].

No que concerne às colunas analíticas,
todos os procedimentos para LC uti-
lizam colunas de fase reversa C_{18} para
separar as bases esfingóides, já que es-
tas permitem uma eficiência elevada na
análise dos derivados OPA, permitindo
também uma pressão reduzida e boa
estabilidade [14]. Em relação à escolha
das dimensões da coluna observa-se
alguma disparidade (Tabela 2).

Figura 5 Reacção de derivatização com NDA

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A cromatografia líquida (LC) é a técnica
analítica de separação mais usada. A
razão desta popularidade, além de re-
sidir na sua elevada sensibilidade, na
sua capacidade para efectuar deter-
minações precisas e de separar espé-
cies não voláteis, deve-se sobretudo
ao facto de possuir uma grande apli-
cabilidade a substâncias com inte-
resse primordial para a indústria e na
investigação científica [45].

Em 1991, Wang *et al.* [42] reportaram,
pela primeira vez, o mecanismo pelo
qual as FBs inibem a biossíntese de
novo dos esfingolípidos. O uso de LC
permitiu analisar a massa das bases
de cadeia longa.

A cromatografia líquida com detecção
por fluorescência (LC-FD) tem sido
usada por inúmeros investigadores
para determinar a quantidade relativa
de So e Sa livres no soro, urina e tec-
idos variados [14, 23, 25, 32, 33, 37,
38, 39, 41-43].

Dois tipos de eluição são usados,
isocrática [23, 24, 32-34, 37, 40, 41] e
gradiente [14, 25, 35, 38, 39, 43]. Em
ambas as eluições o solvente mais uti-
lizado é o metanol, verificando-se, no
entanto, variações nas misturas utiliza-
das (Tabela 2). Outros autores recorrem
ao acetonitrilo [24]. Solfrizzo *et al.* [14]
não registaram diferenças nos cromato-
gramas usando uma fase móvel em cuja
composição entrava ou não tampão
fosfato de potássio. Consideram que
este tampão, usado por Riley *et al.* [23],
entre outros autores, não é necessário
já que os derivados OPA-Sa e OPA-So
não possuem grupos ionizáveis, ao con-
trário do que sucede com as FBs.

A lavagem da coluna com ACN [33] ou
MeOH [14] entre cada injeção é impor-
tante para impedir a eluição de picos in-
terferentes.

Os fluxos adoptados variam, sendo o
mais utilizado o de 1 ml/min. O mesmo
acontece com os comprimentos de onda
de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em})
que variam de acordo com o reagente
de derivatização empregue (Tabela 2).

Diversos métodos de LC-FD estão
disponíveis para a análise de Sa e
de So. No entanto, as interferências
provenientes dos diferentes compo-
nentes das amostras dificultam uma
quantificação precisa e exacta das
bases esfingóides. Adicionalmente,
estes procedimentos são morosos e
complexos, requerendo a execução
de inúmeros passos [46].

A espectrometria de massa (LC-MS)
é uma ferramenta eficiente permitindo
elevadas selectividade e sensibilidade
[45], tendo também bastante aplica-
bilidade na análise de FBs [12, 31, 47,
48].

Seefelder *et al.* [45] reportaram meto-
dologia analítica rápida e precisa para
a determinação de Sa e de So em cul-
turas celulares do epitélio renal huma-
no usando cromatografia líquida com
ionização por *electrospray* e detecção
por espectrometria de massa (LC-ESI-
MS). A separação cromatográfica
foi realizada numa coluna analítica
de fase reversa C_{18} usando gradiente
binário de ácido trifluoroacético (TFA)
em H_2O e de TFA em MeOH (fluxo
de 200 μ L/min). A ionização por *elec-
trospray* foi efectuada com uma vol-
tagem de 3,5kV e a 200°C, tendo o N_2
sido usado como sheath e como gás
auxiliar. O detector de massa modo
selected ion monitoring (SIM), detec-
tou iões positivos $[M+H]^+$ de So (m/z
300), Sa (m/z 302) e PSO (m/z 318).
A aplicação deste método permitiu um
LOD de 10 pg para a So e de 25 pg
para a Sa.

A cromatografia em camada fina (TLC)
e métodos radioactivos têm sido usa-
dos. Através destas técnicas foi pos-
sível verificar que a disrupção do me-
tabolismo dos esfingolípidos seria um
evento crítico em doenças associadas
ao consumo de FBs [42]. Na análise de
lípidos as células expostas a FBs du-
rante 0-4 dias foram depois colocadas
num meio com $[^{14}C]$ serina na presença
ou ausência de FBs. Após incubação
de 2 a 16 horas, as células foram reti-
radas do meio e os lípidos extraídos e
sujeitos a uma hidrólise ácida. A Sa e a
So resultantes foram então separadas
por TLC em placas de sílica gel, desen-
volvidas com $CHCl_3$ -MeOH- NH_4OH ,
e o perfil radioactivo determinado por

Tabela 2 Condições cromatográficas por LC para a determinação de bases esfingóides em amostras biológicas

Coluna Analítica				Fase móvel		Fluxo (mLmin ⁻¹)	λ(nm)		Gama de linearidade	Limite de detecção	Referência
Tipo	Comprimento (cm)	d.i. (mm)	Tamanho partícula (μm)	Eluição isocrática	Eluição gradiente		OPA	NDA			
RP-C ₁₈	10	8	4	MeOH (89-90%): tampão fosfato potássio 0,005M (10-11%), pH 7,0		2	Exc: 335-340 Em: 440-255		–	–	[23, 37]
RP-C ₁₈	10	8	4	MeOH: tampão fosfato potássio (0,005M) (93:7) pH 7,0		2	Exc: 335-340 Em: 440-255		–	–	[33]
RP-C ₁₈	15	4,6	5		A-MeOH:H ₂ O (9:1), 13min B-MeOH, 5min	1	Exc: 335 Em: 440		–	–	[14, 43]
RP-C ₁₈	25	4,6	5		A-K ₂ HPO ₄ (0,07M):MeOH (1:9) B-MeOH	1	Exc: 340 Em: 355		–	–	[38]
RP-C ₁₈	15	4,6	5	MeOH:H ₂ O (90:10)		1,5	Exc: 340 Em: 355		–	0,02 (rácio)	[40]
RP-C ₁₈	15	4,6	5	MeOH:H ₂ O (91:9)		1	Exc: 340 Em: 355		–	–	[41]
RP-C ₁₈				MeOH: tampão fosfato potássio (5mM) (91:9), pH 7,4					–	–	[34]
RP-C ₁₈				MeOH:H ₂ O (91:9)		2			–	–	[32, 36]
RP-C ₁₈	15	3,9	4		A- 0,07M K ₂ HPO ₄ -MeOH (1:9) B- MeOH	1	Exc: 335 Em: 440		0,1 a 0,3 ng	♀: 0,15ng/mL ♂: 0,005ng/mL	[25]
RP-C ₁₈	15	4,6		ACN:H ₂ O (87%) ACN:H ₂ O (90%)		1	Exc:340 Em:455	Exc:252 Em:483	0,1 pmol	10 a 50 pmol	[24]
RP-C ₁₈	25	4,6	5		A - K ₂ HPO ₄ (0,07M) : MeOH(1:9) B- MeOH	1	Exc: 335 Em: 440		–	–	[39]

– Informação não disponível

scanning radiométrico e contagem de cintilação, sendo as bases esfingóides visualizadas com ninhidrina.

Na medição da actividade relativa da So N-acetiltransferase em hepatócitos intactos as células foram incubadas com FB₁ e depois com [3H]-So. Os lípidos foram então extraídos e as [3H]-ceramidas da [3H]-So foram separadas usando TLC com placas de sílica desenvolvidas em éter dietílico-MeOH e visualizadas com vapor de iodo e a quantidade de material marcado determinada por contagem de cintilação [42].

Os resultados obtidos por Yoo *et al.* [37] foram confirmados por TLC. Assim, os lípidos obtidos na hidrólise ácida e não derivatizados foram separados em placas de sílica gel desenvolvidas com CHCl₃-MeOH-NH₄OH e as bases Sa e So visualizadas recorrendo a vaporização com ninhidrina.

CONCLUSÕES

Métodos sensíveis e confiáveis para a determinação de fumonisinas e do rácio Sa/So, biomarcadores para as fumonisinas em diferentes matrizes biológicas, são de absoluta necessidade para avaliar o grau de exposição humana e animal.

Atendendo à complexidade das técnicas extractivas e de purificação disponíveis,

são desejáveis outras incursões no sentido de aumentar a especificidade e, simultaneamente, minorar os custos e a morosidade.

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

Espera-se que, com o desenvolvimento científico, a LC-MS se torne numa técnica mais sensível, menos onerosa e, em consequência, mais disponível para efectuar estes estudos, já que permite a análise directa de extractos, sem recurso à derivatização, e a respectiva confirmação. Espera-se ainda que a metodologia permita cada vez mais uma quantificação precisa e exacta de biomarcadores para que a avaliação da exposição seja o mais fiável possível.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FCT e POCTI (FEDER) a bolsa de doutoramento SFRH/BD/19382/2004 concedida a Liliana J. G. Silva.

REFERÊNCIAS

[1] C.P. Woloshuk, W. Shim, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 1607-1612.

- [2] P.M. Scott, G. A. Lawrence, *J. Food Protection* **58** (1995) 1379-1382.
- [3] J.-A. Seo, Y.-W. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 1331-1334.
- [4] R. Labuda, D. Tančinova, K. Hudec, *Ann. Agric. Environ. Med.* **10** (2003) 61-66.
- [5] C.M. Lino, L.J.G. Silva, A.S. Pena, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* **99** (2004) 181-192.
- [6] K.A. Voss, R.T. Riley, W.P. Norred, C.W. Bacon, F.I. Meredith, P.C. Howard, R.D. Plattner, T.F.X. Collins, D.K. Hansen, J.K. Porter, *Environ. Health. Perspectives* **109** (suppl. 2) (2001) 259-266.
- [7] M.R. Carratù, T. Cassano, A. Coluccia, P. Borracci, V. Cuomo, *Toxicology Letters* **140-141** (2003) 459-463.
- [8] E.E. Creppy, P. Chiarappa, I. Baudrimont, P. Borracci, S. Moukha, M.R. Carratù, *Toxicology* **201** (2004) 115-123.
- [9] K. Meyer, K. Mohr, J. Bauer, P. Horn, M. Kovács, *Food Add. Contam.* **20** (2003) 639-647.
- [10] M.E. Stack, *J. AOAC Int.* **81** (1998) 737-740.
- [11] IARC (International Agency For Research On Cancer) in IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans **82** (2002) 301-366. IARC, Lyon, France.
- [12] T. Cirillo, A. Ritieni, F. Galvano, R.A. Cocchieri, *Food Add. Contam.* **20** (2003) 566-571.
- [13] P.H. Shetty, R.V. Bhat, *J. Chromatography B* **705** (1998) 171-173.
- [14] M. Solfrizzo, G. Avataggiato, A. Visconti, *J. Chromatography B* **692** (1997) 87-93.
- [15] P.C. Turner, P. Nikiema, C.P. Wild, *Mutation Research* **443** (1999) 81-93.

- [16] H. Crews, G. Alink, R. Andersen, V. Braesco, B. Holst, G. Maiani, L. Ovesen, M. Scotter, M. Solfrizzo, R. van den Berg, H. Verhagen, G. Williamson, *British Journal of Nutrition* **86** (suppl. 1) (2001) s5-s35.
- [17] G.S. Shephard, P.W. Snijman, *Food Chem. Toxicol.* **37** (1999) 111-116.
- [18] D.B. Prelusky, J.D. Miller, H.L. Trenholm, *Food Add. Contam.* **13** (1996) 155-162.
- [19] P.K. Chelule, N. Gqaleni, A. A. Chuturgoon, M.F. Dutton, *Biomarkers* **5** (2000) 1-8.
- [20] G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, *J. Chromatography A* **692** (1995) 39-43.
- [21] G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, *J. Chromatography* **574** (1992) 299-304.
- [22] V. Sewram, N. Mshicileli, G.S. Shephard, W.F.O. Marasas, *Biomarkers* **8** (2003) 110-118.
- [23] R.T. Riley, E. Wang, A.H. Merrill, *J. AOAC Int.* **77** (1994) 533-540.
- [24] Y.-H. Cho, H.-S. Yoo, J.-K. Min, E.-Y. Lee, S.-P. Hong, Y.-B. Chung, Y.-M. Lee, *J. Chromatography A* **977** (2002) 69-76.
- [25] M. Qiu, X. Liu, *Food Add. Contam.* **18** (2001), 263-269.
- [26] M.R. Buim, A.P.F.R.L. Bracarense, I.G. Guimarães, O. Kawamura, Y. Ueno, E.Y. Hirooka, *Nat. Toxins* **7** (1999) 279-282.
- [27] C.R. Pozzi, J.R.P. Arcaro, I.A. Júnior, H. Fagundes, B. Corrêa, *Ciência Rural* **32** (2002) 901-907.
- [28] V. Sewram, J.J. Nair, T.W. Nieuwoudt, W.C. Gelderblom, W.F. Marasas, G.S. Shephard, *J. Anal. Toxicol.* **25** (2001) 450-455.
- [29] G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, P.W. Snijman, *Food.Chem.Toxic.* **33** (1995) 591-595.
- [30] R.D. Plattner, *Nat. Toxins* **7** (1999) 365-370.
- [31] W. Xie, C.J. Mirocha, J. Chen, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 1251-1255.
- [32] S. Ribar, M. Mesarié, M. Baumen, *J. Chromatography B* **754** (2001) 511-519.
- [33] G.S. Shephard, L. Westhuizen, P.G. Thiel, W.C.A.; Gelderblom, W.F.O. Marasas, D.J. Schalkwyk, *Toxicon* **34** (1996) 527-534.
- [34] E. Wang, W.P. Norred, R.T. Riley, F.I. Meredith, A.H.Jr. Merrill, *J. Nutrition* **129** (1999) 214-220.
- [35] C.C. Abnet, C.B. Borkowf, Y.-L. Qiao, P.S. Albert, E. Wang, A.H. Merrill, S.D. Mark, Z.-W. Dong, P.R. Taylor, S.M. Dawsey, *Cancer Causes and Control* **12** (2001) 821-828.
- [36] S.T. Tran, J.D. Bailly, D. Tardieu, S. Durand, G. Benard, P. Guerre, *Chemico-Biological Interactions* **146** (2003) 61-72.
- [37] H.-S. Yoo, W.P. Norred, R.T. Riley, *Toxicology in vitro* **10** (1996) 77-84.
- [38] M. Castegnaro, L. Garren, D. Galendo, W.C.A. Gelderblom, P. Chedule, M.F. Dutton, C. P. Wild, *J. Chromatography B* **720** (1998) 15-24.
- [39] L. Garren, D. Galendo, C.P. Wild, M. Castegnaro, *Food Add. Contam.* **18** (2001) 850-856.
- [40] G.S. Shephard, L. Westhuizen, *J. Chromatography B* **710** (1998) 219-222.
- [41] L. Westhuizen, N.L. Brown, W.F.O. Marasas, S. Swanevelder, G.S. Shephard, *Food Chem. Toxicol.* **37** (1999) 1153-1158.
- [42] E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley, A.H.Jr. Merrill, *The Journal of Biological Chemistry* **266** (1991) 14486-14490.
- [43] M. Solfrizzo, S.N. Chulze, C. Mallmann, A. Visconti, A. Girolamo, F. Rojo, A. Torres, *Food Add. Contam.* **21** (2004) 1090-1095.
- [44] C.M. Lino, L.J.G. Silva, A.S. Pena, *Anal. Bioanal. Chem.* **384** (2006) 1214-1220.
- [45] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, In *Principles of Instrumental Analysis* 5th; Brace College Publishers; Hartcourt, Philadelphia, 1998, p.725.
- [46] W. Seefelder, G. Schwerdt, R. Freudinger, M. Glekle, H.-U. Humpf, *J. Chromatography B* **780** (2002) 137-144.
- [47] S.M. Musser, R.D. Plattner, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 1169-1173.
- [48] D. Royer, H.-U. Humpf, P.A. Guy, *Food Add. Contam.* **21** (2004) 678-692.

CURIOSIDADES HISTÓRICAS

Destilação, *Alchemiae Gebri Arabis* ..., 1545.

«A coisa primordial na alquimia é que se pode realizar trabalhos práticos e conduzir experiências, quem não faz trabalhos práticos nem faz experiências nunca dominará a alquimia».

Jābir ibn Hayyān, conhecido pelo seu

nome latinizado Geber, o pai da alquimia árabe, escreveu 22 tratados alquímicos. Desenvolveu métodos básicos que descreveu nos seus livros, nomeadamente técnicas de purificação e separação como fusão, sublimação, cristalização fraccionada, filtração - destilação sem fogo ou *destillatio per filtrum* - calcinação e destilação (simples, fraccionada e por arrastamento de vapor). Desenvolveu ainda vários instrumentos para o seu trabalho alquímico, nomeadamente o alambique com que destilou o espírito do vinho, o al kohl.

Ao estudar várias reacções químicas notou que numa reacção química estão envolvidas quantidades bem determinadas dos reagentes. A descoberta dos ácidos clorídrico e nítrico é atribuída por muitos historiadores a Geber que os teria descoberto destilando vários sais na presença de ácido sulfúrico - Zayt al-Zaj, ou óleo de vi-

tríolo. A ele também é creditada a descoberta do ácido cítrico (existente em limões e outros citrinos), ácido acético (vinagre), ácido tartárico (do resíduo de fabricação de vinho), o uso de dióxido de manganês na fabricação de vidro - um processo ainda hoje utilizado - e a introdução de termos químicos como ál-cali (alcalino).

Na Idade Média, os seus tratados de alquimia, como o *Kitab al-Kimya*, o Livro da Composição Alquímica, traduzido por Robert de Chester em 1144, e o *Kitab as-Sab'een* introduzido por Gerard de Cremona nos finais do século XII, influenciaram profundamente os alquimistas europeus. Marcelin Berthelot traduziu ainda outros livros de Jābir ibn Hayyān sob os títulos de Livro do Reino, Livro das Balanças e Livro do Mercúrio Oriental.

PS