

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINARIA
CURSO DE POS-GRADUACAO EM MEDICINA VETERINARIA

DESENVOLVIMENTO DE FASE MOVEL PARA SEPARACAO DE
AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
EFICIENCIA UTILIZANDO COLUNA DE FASE NORMAL
EM SISTEMA DE COMPRESSAO RADIAL

GLORIA MARIA DIREITO

SOB A ORIENTACAO DO PROFESSOR
CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA

TESE SUBMETIDA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENCAO DO GRAU
DE MESTRE EM CIENCIAS EM PATO
LOGIA VETERINARIA, AREA DE
CONCENTRACAO EM PATOLOGIA ANI
MAL.

Itaguaí, Rio de Janeiro
1989

T
543.0894
D598d

DESENVOLVIMENTO DE FASE MOVEL PARA SEPARAÇÃO DE
AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
EFICIENCIA UTILIZANDO COLUNA DE FASE NORMAL EM SISTEMA
DE COMPRESSAO RADIAL

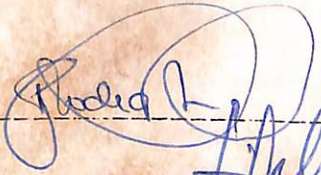
GLORIA MARIA DIREITO

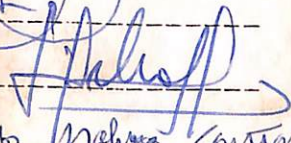
APROVADO EM:

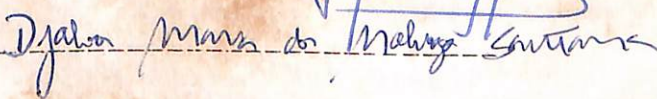
CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA

LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ

DJALVA MARIA DA NOBREGA SANTANA







BIOGRAFIA

GLORIA MARIA DIREITO, filha de Manoel Pereira Direito Filho e Maria da Glória Dias Direito, nasceu em 4 de setembro de 1961 na Cidade do Rio de Janeiro.

Concluiu o primeiro grau em 1976 na Escola Estadual Dr. Nelcy Noronha e o segundo Grau em 1979 no Colégio Estadual Erico Veríssimo, todos na Cidade do Rio de Janeiro.

Ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1981, graduando-se em janeiro de 1986.

Foi monitora da disciplina de Micologia da Área de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da U.F.R.R.J., no período de 11 de dezembro de 1984 a 31 de dezembro de 1985.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Clínica, em março de 1986, sendo Bolsista da CAPES/MEC.

Foi contratada como Professora Horista na função de Auxiliar de ensino, pelo Instituto de Biologia da U.F.R.R.J. no período de 02 de janeiro a 01 de fevereiro de 1989, para lecionar Imunologia na Área de Microbiologia e Imunologia.

SUMARIO

1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	04
3 - MATERIAL E METODOS.....	10
4 - RESULTADOS.....	14
5 - DISCUSSÃO.....	33
6 - CONCLUSOES.....	36
7 - BIBLIOGRAFIA.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA	1	- Efeito do fluxo da fase móvel Acetato de Etila e n-Hexano (2:1 v/v) na pressão da coluna e no tempo de retenção das aflatoxinas.....	18
TABELA	2	- Efeito do fluxo da fase móvel Acetato de Etila e n-Hexano (3:2 v/v) na pressão da coluna e no tempo de retenção das aflatoxinas.....	19
TABELA	3	- Efeito do fluxo da fase móvel Acetato de Etila e n-Hexano (3:2,5 v/v) na pressão da coluna e no tempo de retenção das aflatoxinas.....	20
TABELA	4	- Efeito do fluxo da fase móvel Clorofórmio e Isoctano (2:1 v/v) na pressão da coluna e no tempo de retenção das aflatoxinas.....	21
TABELA	5	- Valores de Fator de Capacidade, Seletividade, Eficiência e Resolução com as fases móveis: Clorofórmio:Isoctano (2:1 v/v), Diclorometano: n-Hexano: Acetonitrila: Etanol (75:25,5:3:2) e Acetato de Etila:n-Hexano (2:1, 3:2 e 3:2,5) com o fluxo de 4 mL/min.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	04
FIGURA 2 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel de Acetato de Etila e n-Hexano (2:1, v/v) a um fluxo de 1 mL/min.....	23
FIGURA 3 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel de Acetato de Etila e n-Hexano (3:2, v/v) a um fluxo de 1 mL/min.....	24
FIGURA 4 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel de Acetato de Etila e n-Hexano (3:2,5 -v/v) a um fluxo de 1 mL/min....	25
FIGURA 5 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel de Acetato de Etila e n-Hexano (2:1, v/v) a um fluxo de 4 mL/min.....	26
FIGURA 6 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel de Acetato de Etila e n-Hexano (3:2, v/v) a um fluxo de 4 mL/min.....	27
FIGURA 7 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel de Acetato de Etila e n-Hexano (3:2,5 -v/v) a um fluxo de 4 mL/min....	28
FIGURA 8 - Cromatograma da separação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel Clorofórmio: Isoctano (2:1 v/v) e um fluxo de 1 mL/mi.....	29
FIGURA 9 - Cromatograma da separação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ pela fase móvel de Diclorometano:n-Hexano: Acetonitrila:etanol (75,0:25,5:2,5:2,0, v/v).....	30
FIGURA 10- Cromatograma de separação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel Clorofórmio: Isoctano (2:1, v/v) a um fluxo de 4 mL/min.....	31
FIGURA 11- Cromatograma da separação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , pela fase móvel Diclorometano:n-Hexano: Acetonitrila:etanol (75,0:25,5:2,5:2,0, v/v a um fluxo de 4mL/min.....	32

SUMMARY

The Aflatoxins B1, B2, G1 e G2 were completely separated by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using a normal a normal phase column (Radial Pak Si 10), in a radial compression system. The mobile phase was ethyl acetate - n-Hexane in the proportions of 2:1, 3:2 e 3:2,5 by volume. The solvent flow rate varied from 1,0 to 4,0 ml/min. The components were detected at 365 nm. The parameters used for the evaluation of the three solvent systems were: Selectivity (α), capacity factor (k'), the number of theoretical plates (N), resolution (R) and Retention Time (RT). The mobile phase wich showed the best resolution and the best selectivity was the proportion 3:2,5 v/v at a flow rate of 4,0 ml/min, although the number of theoretical plates was less than 1000. The recycling of the mobile phase did not affect the reproductibility, the retention times, the base line alteration or the occurrence or interfering peaks.

1 - INTRODUÇÃO

Com a descoberta das Aflatoxinas no início da década de 60 e a constatação de seu envolvimento com a etiologia da Doença X dos perús, que dizimou cerca de 100.000 aves na Inglaterra, deu-se início a uma nova etapa na história da Micotoxicologia. O interesse da comunidade científica internacional foi reforçado pela constatação de que as Aflatoxinas eram os mais potentes hepatocarcinógenos de origem biológica encontrados como contaminantes naturais de alimentos e rações. Ao exercerem influências negativas sobre a produtividade agropecuária e sobre a saúde humana, as Aflatoxinas passaram a ser as mais estudadas dentre as dezenas de micotoxinas conhecidas.

Com frequência, elas são encontradas em grande número de alimentos destinados ao consumo humano, incluindo produtos de origem animal, uma vez que ao serem ingeridas pelos animais, elas podem ser biotransformadas em outros compostos potencialmente tóxicos (CAMPBELL & HAYES, 1976).

Devido à importância destas micotoxinas para saúde pública foram criados, em muitos países, regulamentos que estabelecem limites máximos de aflatoxinas que podem ser tolerados nos alimentos destinados ao consumo humano.

Para a determinação destes níveis de contaminação, foram desenvolvidos muitos métodos analíticos com maior ou menor poder de detecção.

Biossinteticamente, as aflatoxinas são classificadas como bisfuranocumarinas derivadas de decacetídeos (SMITH & MOSS, 1985). Elas foram isoladas por NESBITT et al. (1962) e por HARTLEY et al. (1963) a partir de cultivos de *Aspergillus flavus*.

A determinação de aflatoxinas em produtos vegetais, em tecidos e fluidos biológicos e em subprodutos de origem animal baseou-se fundamentalmente em princípios físico-químicos que incluíram processos de separação por cromatografia em camada delgada (CCD) e visualização dos focos de fluorescência produzidos sob radiação ultravioleta. Entretanto os métodos de CCD são limitados em detectar quantidades tão pequenas de aflatoxinas como as que ocorrem em tecidos e fluidos biológicos. Além de baixo nível de detecção, os métodos de CCD também sofrem a interferência de outras substâncias que dificultam a detecção destas micotoxinas. Com a introdução da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) à determinação das aflatoxinas recebeu um significativo avanço quanto aos níveis de detecção e quantificação, principalmente à nível de traços. Este tipo de cromatografia tem, sobre a CCD, as vantagens de ser mais rápida, precisa e muito mais sensível, além de evitar a degradação das moléculas das aflatoxinas por não expô-las à luz e ao ar.

Embora a cromatografia líquida tenha sido aplicada amplamente para a determinação das aflatoxinas em produtos de origem vegetal, ela não tem se mostrado tão eficiente, para a detecção de aflatoxinas em tecidos e fluidos orgânicos. Isto

ocorre devido às baixas concentrações destas micotoxinas normalmente observadas em tecidos, bem como à produção de biotransformados geralmente mais polares, acarretando dificuldades na obtenção de um método eficiente para fase normal.

Apesar de existirem na literatura metodologias desenvolvidas especialmente para a separação das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em fase normal, os sistemas eluentes descritos possuem em sua maioria, um grande número de componentes, muitos deles bastante voláteis. Esta condição dificulta o preparo das fases móveis acarretando prejuízos na resolução, eficiência e reproduibilidade. Além disso, os sistemas de solventes utilizados em metodologias já estabelecidas, são compostos tóxicos e deletérios ao equipamento utilizado.

O presente trabalho teve por objeto desenvolver um sistema eluente que apresentasse boa resolução para a separação das aflatoxinas, fosse compatível com a coluna de fase normal (silica) e indicado para a utilização com detector de ultravioleta, além de apresentar baixa toxidez e menor ação corrosiva sobre os componentes metálicos do equipamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Numerosas técnicas têm sido desenvolvidas nas duas últimas décadas para extração, purificação, quantificação e confirmação das aflatoxinas em uma grande variedade de produtos.

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram primeiramente isoladas por NESBITT et al. (1962) e HARTLEY et al. (1963) que utilizaram a cromatografia em camada delgada de sílica gel e como sistema de solventes a mistura de clorofórmio e metanol (98:2, v/v). Nestas condições as aflatoxinas B₁ e B₂ apresentaram fluorescência azul esverdeada, sob radiação ultravioleta de comprimento de onda longo (365 nm).

As estruturas das aflatoxinas B₁ e G₁ foram determinadas por NESBITT et al. (1962), através da análise dos seus espectros de infra vermelho e ultravioleta, suas fórmulas moleculares sendo respectivamente $C_{17}H_{12}O_6$ e $C_{17}H_{12}O_7$, e pela espectroscopia de massa.

Utilizando métodos espectroscópicos ASAO et al. (1963) estabeleceram as estruturas das 4 aflatoxinas e suas semelhanças, confirmadas através da difração com raio X (Figura 1).

Com as estrutura químicas das aflatoxinas definidas, vários pesquisadores passaram a desenvolver sistemas de solventes para cromatografia em camada fina, a fim de melhorar a separação e

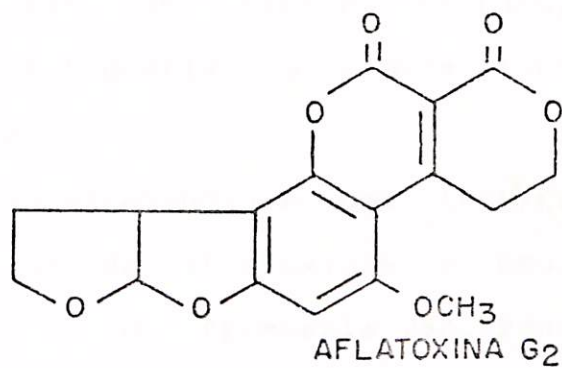
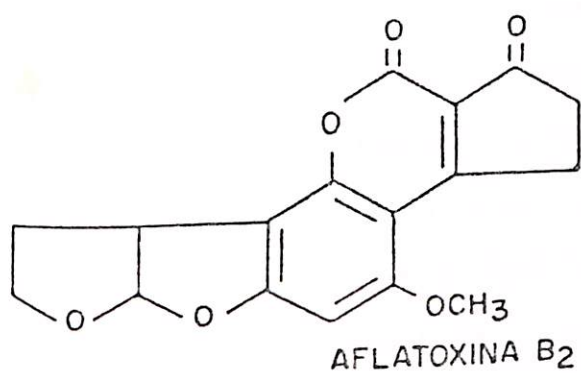
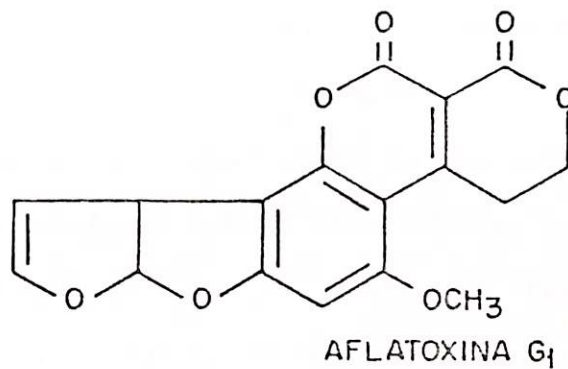
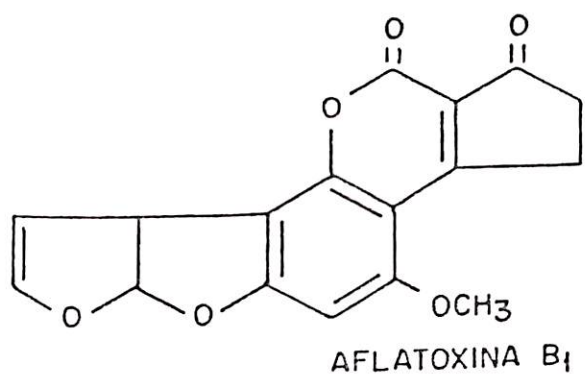


Figura 1 - Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

consequentemente sua identificação e quantificação. Inicialmente o sistema de solventes foi a mistura Clorofórmio:Metanol (98:2, v/v) utilizado por NESBITT et al. (1962), posteriormente o metanol foi substituído por acetona tendo então as seguintes proporções: 90:10 v/v (ENGELBERCHT et al, 1965; EPPLEY, 1966) e 85:15 v/v (GENEST et al, 1963). As melhores separações foram obtidas por HANNA et al. (1968) a partir da utilização da mistura de solventes composta de Benzeno:Etanol:Água (46:35:15, v/v/v).

A utilização da cromatografia em coluna aberta tem importância na separação de aflatoxinas, principalmente a partir de extratos brutos, com o objetivo de obter-se extratos purificados para aplicação em cromatografia em camada fina preparativa e obtenção de toxinas puras.

A cromatografia à líquido de alta eficiência é uma técnica que vem sendo utilizada na análise de aflatoxinas e seus metabólitos desde o início da década de 70. Apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais no tocante à sensibilidade, especificidade, rapidez e exatidão. Os detectores mais utilizados para análise de aflatoxinas são os de ultravioleta e de fluorescência, sendo este último bastante sensível.

Muitos pesquisadores vêm se dedicando à procura de um sistema solvente adequado a uma boa resolução das aflatoxinas. SEIBER & HSIEH (1973) utilizaram clorofórmio e isoctano (2:1, v/v) como eluente e coluna sílica como adsorvente, a detecção foi a 254 nm. Seus cromatogramas indicaram uma má resolução entre B2 e G1 e entre G2 e P1.

PONS em 1976 conseguiu separar completamente as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ com um sistema solvente composto de clorofórmio saturado com água, ciclohexano e acetonitrila (27:7,5:1,0, v/v/v) e 1,5% de etanol, em coluna de sílica e com detecção a 360 nm.

PANALAKS & SCOTT (1977) estudaram a separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ utilizando coluna de sílica gel e a influência dos detectores de fluorescência e ultravioleta (U.V.) na detecção a níveis próximos a 1 ng. Estes pesquisadores empregaram coluna de vidro empacotada com o mesmo tipo de sílica da coluna analítica e conectaram-na ao detector de fluorescência. Assim, aumentou-se a sua sensibilidade, uma vez que as aflatoxinas exibem maior fluorescência quando adsorvidas em sílica. Quanto à fase móvel utilizada por estes autores, verificou-se que a utilização do sistema de solventes contendo clorofórmio saturado com água, ciclohexano e acetonitrila (250:75:10, v/v/v) apresentou alturas de picos mais elevadas quando comparado com o mesmo sistema de solventes adicionados de 2,5% de etanol.

Resultados semelhantes ao de PONS (1976) foram obtidos por WEI et al. (1980) na separação das aflatoxinas em fermentado de soja. Estes autores utilizaram o sistema de solventes clorofórmio saturado com água, ciclohexano, acetonitrila (25:7,5:1,0, v/v/v), coluna de sílica e detecção a 365 nm.

A metodologia para extração e isolamento das aflatoxinas B₁, P₁, Q₁ e M₁ de amostras de fígado e sangue de pacientes com hepatocarcinoma primário e de pacientes com síndrome de Rey, descrita por SIRAJ et al. (1981) inclui uma adaptação da extração destas amostras em cromatografia líquida para

quantificação destas aflatoxinas. Eles utilizaram como eluente uma mistura de clorofórmio saturado com água, ciclohexano, acetonitrila e isopropanol (75:25,5:3:2, v/v/v/v) e como adsorvente sílica. A detecção a 365 nm foi eficiente para quantificar níveis de nanograma.

AWE et al. (1981), trabalhando com análises de aflatoxinas em condimentos, utilizaram para separá-las de uma coluna de sílica e detecção por fluorescência como o proposto por PANALAKS & SCOTT (1977). A fase móvel utilizada foi a mistura de diclorometano saturado com água, ciclohexano, acetonitrila (25:7,5:1, v/v/v) com 0,5% de etanol, uma vez que a adição de 1,5% deste composto resultou em uma má resolução entre as aflatoxinas B1 e G1. O tempo de análise foi elevado para 45 minutos. Observaram, ainda, que a posição dos picos de G1 e B2 foram reversos, resultando na seguinte ordem de eluição: B1, G1, B2 e G2.

A aplicabilidade e reprodutibilidade do sistema de separação com compressão radial, foram relatadas por SHEPPHERD et al. (1982), que separaram as Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 em coluna de sílica e as detectaram a 365 nm. Extratos de amostras de fígado, soro sanguíneo e urina foram eluídos no sistema solvente clorofórmio saturado com água, ciclohexano, acetonitrila (75:22,5:2,5, v/v/v) com 2% de 2-propanol, ocorrendo separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, com um fluxo inicial de 2,0 mL/min nos primeiros 15 minutos de análise e com fluxo de 8 mL/min para a eluição da aflatoxina M1 nos trinta minutos seguintes. A reprodutibilidade foi eficiente por um período de três dias.

A aflatoxina B1 foi detectada em soro sanguíneo por TSUBOI et al. (1984), que utilizaram detector de fluorescência para dois sistemas solventes: clorofórmio saturado com água, ciclohexano, acetonitrila e 2-propanol (75:25,5:3:1,5, v/v/v/v) para coluna de sílica e água, metanol e acetonitrila (67:20:13, v/v/v) para coluna do tipo C¹⁸, sendo que neste último sistema a detecção foi precedida pela formação do hemiacetal B_{2a}.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters Associates, Inc., Miliford, M.A.) equipado com duas bombas modelo 510, injetor modelo U6K, módulo de compressão radial RCM 100 RCSS, detectores de fluorescência (modelo 420) e de absorbância Lambda-max (modelo 481) e integrador registrador (modelo 740), localizado no Centro Experimental de Micotoxicologia (CEM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.2 PADRÕES

Os padrões de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidos da Sigma Chemical CO., St. Louis (USA), foram diluídos e quantificados segundo a metodologia descrita no AOAC (1980), utilizando espectrofotômetro Spectronic 710 (Bauch & Lomb), protegidos da luz por papel alumínio e armazenados em freezer.

3.3 COLUNA

As separações das aflatoxinas foram obtidas em coluna analítica de fase normal (Radial Pak Si 10) com módulo de compressão radial (RCM 100) protegidas por pré-coluna de fase normal (Guard Pak RCSS Si).

3.4 SOLVENTES

Os solventes utilizados tanto na cromatografia quanto no preparo dos padrões foram de grau Uvasol* ou Lichrosolv* e submetidos à filtração, antes do uso, em filtro Millipore tipo GVWP 0047.

3.5 FASE MÓVEL

O sistema de solventes testado foi Acetato de Etila e n-Hexano nas proporções de 2:1, 3:2 e 3:2,5 volume/volume e comparado com os seguintes sistemas de solventes:

-Clorofórmio e Isoctano na proporção de 2:1, volume/volume segundo SEIBER & HSIEH (1973).

-Diclorometano, n-Hexano, Acetonitrila (25:7,5:1,0 - volume/volume) acrescida de 0,5% de Etanol segundo AWE et al. (1981).

3.6 PARÂMETROS DA AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO DAS AFLATOXINAS.

Os padrões foram eluídos pelas diferentes misturas de solventes e detectados por absorbância a 365 nm. Os parâmetros utilizados para avaliar os sistemas de eluição foram Seletividade (α), Fator de Capacidade (K'), Eficiência (N), Tempo de Retenção (TR) e Resolução (R).

A variação do fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min até 4,0 mL/min., com a monitoração simultânea da pressão na coluna.

A identificação dos picos foi feita por co-injeção dos padrões e por comparação dos tempos de retenção. Usou-se o tempo de retenção medido no momento da injeção até o aparecimento do

*Produtos MERCK do Brasil

ápice do pico. O termo usado para identificar esta medida foi Fator de Capacidade (K'), definido pela seguinte equação:

$$K' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

A resolução (R) descreve o grau ou magnitude da separação, quantificando a separação de um componente do outro. Os picos são considerados totalmente resolvidos quando R é maior que 1,5 e tido como adequado quando R é igual a 1,0 é definida matematicamente por:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{1/2 (W_1 + W_2)}$$

Fator de Separação, Fator de Seletividade ou simplesmente Seletividade (α) é um valor indicativo de onde saem dois picos, um em relação ao outro. É dada pela seguinte fórmula:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{V_2 - V_1}{V_1 - V_0}$$

A eficiência foi monitorada pela contagem do número de pratos teóricos. Esta medida é frequentemente usada como uma medida do desempenho de uma coluna ou uma medida do alargamento dos picos, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$N = 25 \left(\frac{V}{W} \right)^2$$

Nas fórmulas acima temos que:

V_0 - uma medida (em mm) de um componente não retido, desde o ponto de injeção até o aparecimento do ápice do pico.

V_n - é o valor (medido em mm) desde o ponto de injeção até o aparecimento do ápice de cada pico no cromatograma.

W_n - largura de cada pico, medida (em mm) por extrapolação na linha base do cromatograma.

3.7 RECICLAGEM DA FASE MÓVEL

Consiste no retorno do efluente do detector para o reservatório que contém a fase móvel.

4 - RESULTADOS

Os parâmetros avaliados na separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 encontram-se ordenados nas Tabelas e Figuras relacionadas a seguir:

4.1 - Variação da pressão do sistema Acetato de Etila:n-Hexano (2:1) e os respectivos tempos de retenção obtidos para as aflatoxinas - Tabela 1.

4.2 - Variação da pressão do sistema Acetato de Etila:n-Hexano (3:2) e os respectivos tempos de retenção obtidos para as aflatoxinas - Tabela 2.

4.3 - Variação da pressão do sistema Acetato de Etila:n-Hexano (3:2,5) e os respectivos tempos de retenção obtidos para as aflatoxinas - Tabela 3.

4.4 - Variação da pressão do sistema Clorofórmio: Isoctano (2:1) e os respectivos tempos de retenção obtidos para aflatoxinas - Tabela 4.

4.5 - Variação da pressão do sistema Diclorometano:n-Hexano:acetonitrila:etanol (75,0:25,5:2,5:2,0) e os respectivos tempos de retenção obtidos para as aflatoxinas - Tabela 5.

4.6 - Avaliação da resolução (R), seletividade (α), eficiência (N) e fator de capacidade (K') em função das fases móveis Clorofórmio:Isoctano (2:1), Diclorometano:n-Hexano:acetonitrila:Etanol (75,0:25,5:2,5:2,0) e Acetato de Etila:n-Hexano nas proporções de 2:1, 3:2 e 3:2,5, a um fluxo de 4,0 mL/min - Tabela 6.

4.7 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Acetato de Etila:n-Hexano na proporção 2:1, a um fluxo de 1 ml/min é mostrada na figura 2.

4.8 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Acetato de Etila:n-Hexano na proporção 3:2, a um fluxo de 1 ml/min é mostrada na figura 3.

4.9 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Acetato de Etila:n-Hexano na proporção 3:2,5 a um fluxo de 1 ml/min é mostrada na figura 4.

4.10 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Acetato de Etila:n-Hexano na proporção 2:1, a um fluxo de 4 ml/min é mostrada na figura 5.

4.11 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Acetato de Etila:n-Hexano na proporção 3:2, a um fluxo de 4 ml/min é mostrada na figura 6.

4.12 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Acetato de Etila:n-Hexano na proporção 3:2,5 a um fluxo de 4 ml/min, é mostrada na figura 7.

4.13 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Clorofórmio: Isoctano na proporção de 2:1, a um fluxo de 1 mL/min é mostrada na figura 8.

4.14 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Diclorometano: n-Hexano:acetonitrila:etanol na proporção 75,0:25,5:2,5:2,0, a um fluxo de 1 mL/min é mostrada na figura 9.

4.15 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Clorofórmio:Isoctano na proporção de 2:1, a um fluxo de 4 mL/min é mostrada na figura 10.

4.16 - Separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Diclorometano:n-Hexano:Acetonitrila:Etanol na proporção 75,0:25,5:2,5:2,0, a um fluxo de 4 mL/min é mostrada na figura 11.

O sistema de compressão radial foi escolhido por proporcionar praticidade no manuseio e nos processos de limpeza

da coluna, aumentando assim o seu tempo de vida útil.

Os sistemas de solventes foram trocados por novos após a centésima injeção de padrões, sem que fossem observadas alterações na linha base, nos tempos de retenção ou ainda o surgimento de picos interferentes.

Tabela 1 - Efeito do aumento do fluxo na pressão da coluna e no tempo de retenção das Aflatoxinas usando compressão radial e como sistema solvente o Acetato de Etila e n-Hexano (2:1).

FLUXO mL/min	PRESSAO psi	Tempos de retenção			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
1.0	205	11.1	13.6	15.1	19.2
1.5	310	7.3	9.1	10.1	13.0
2.0	365	5.5	6.8	7.6	9.8
2.5	381	4.4	5.4	6.1	7.8
3.0	573	3.3	4.5	5.0	6.4
3.5	657	3.1	3.9	4.3	5.5
4.0	743	2.7	3.4	3.8	4.8

Tabela 2 - Efeito do aumento do fluxo na pressão da coluna e no tempo de retenção das Aflatoxinas usando compressão radial e como sistema solvente o Acetato de Etila e n-Hexano (3:2).

FLUXO mL/min	PRESSAO psi	Tempos de retenção			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
1.0	199	15.5	19.2	22.0	28.8
1.5	293	10.5	13.2	14.9	19.5
2.0	375	7.8	9.9	11.2	14.6
2.5	463	6.3	7.9	9.0	11.7
3.0	545	5.2	6.5	7.4	9.7
3.5	625	4.3	5.4	6.1	7.9
4.0	721	3.7	4.7	5.3	6.9

Tabela 3 - Efeito do aumento do fluxo na pressão da coluna e no tempo de retenção das Aflatoxinas usando compressão radial e como sistema solvente o Acetato de Etila e n-Hexano (3:2,5).

FLUXO mL/min	PRESSÃO psi	Tempos de retenção			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
1.0	210	22.2	28.2	33.6	43.9
1.5	305	14.8	18.9	22.5	29.7
2.0	400	11.1	14.1	16.8	22.2
2.5	470	8.9	11.3	13.5	17.8
3.0	563	7.4	9.4	11.2	14.6
3.5	645	6.3	8.0	9.5	12.9
4.0	727	5.5	7.0	8.3	10.9

Tabela 4 - Efeito do aumento do fluxo na pressão da coluna e no tempo de retenção das Aflatoxinas usando compressão radial e como sistema solvente o Clorofórmio e o Isoctano (2:1).

FLUXO mL/min	PRESSAO psi	Tempos de retenção			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
1.0	276	14.1	18.5	26.4	37.1
1.5	420	9.9	13.4	18.7	25.9
2.0	568	7.6	10.3	14.3	20.0
2.5	712	6.5	8.4	11.7	17.6
3.0	850	5.3	7.2	10.0	14.0
3.5	1000	4.6	6.3	8.7	12.2
4.0	1196	4.0	5.4	7.5	10.5

Tabela 5 -Valores de Fator de capacidade(K),Seletividade(), Eficiência (N) e Resolução (R) das fases móveis:
 Clorofórmio: Isoctano (SEIBER & HSIEH,1973), Diclorometano:n-Hexano:Acetonitrila:Etanol (AWE et al, 1981) e Acetato de Etila:n-Hexano nas proporções 2:1, 3:2 e 3:2,5.

Fase Móvel	Fator de Capacidade (K')				Eficiência (N)	Resolução (R)	Seletividade (ALFA)
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2			
Clorofórmio Isoctano. 4 mL/min.	8,7	12,2	17,3	24,5	717,7	2,2	1,4
Diclorometano/n-Hexano/Acetonitrila Etanol. 4 mL/min.	2,1	2,4	2,7	3,2	610,6	0,6	1,1
Acetato Etila/n-Hexano 4 mL/min.							
2:1	5,6	7,2	8,1	10,7	1070	1,4	1,2
3:2	7,0	9,0	10,3	13,5	1036	1,5	1,2
3:2,5	11,3	14,6	17,6	23,4	959	1,7	1,3

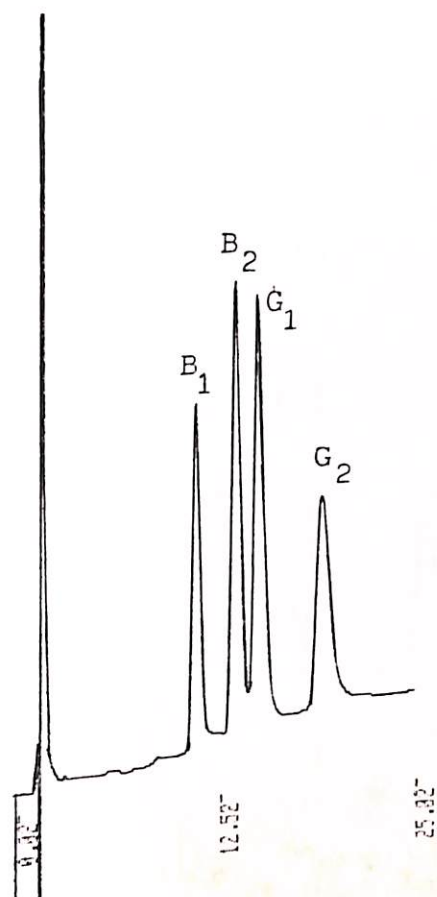


Figura 2 - Cromatograma da separação de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizando coluna de Sílica em sistema de compressão radial com fase móvel de Acetato de Etila/n-Hexano (2:1, v/v) a um fluxo de 1 mL/min.

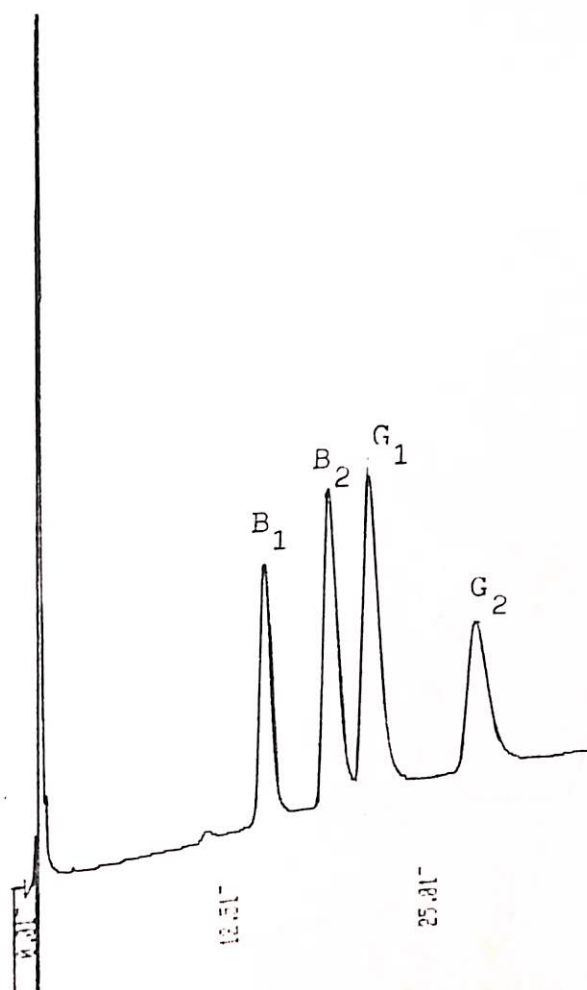


Figura 3 - Cromatograma da separação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizando coluna de Sílica em sistema de compressão radial com fase móvel de Acetato de Etila/n-Hexano (3:2; v/v) a um fluxo de 1 mL/min.

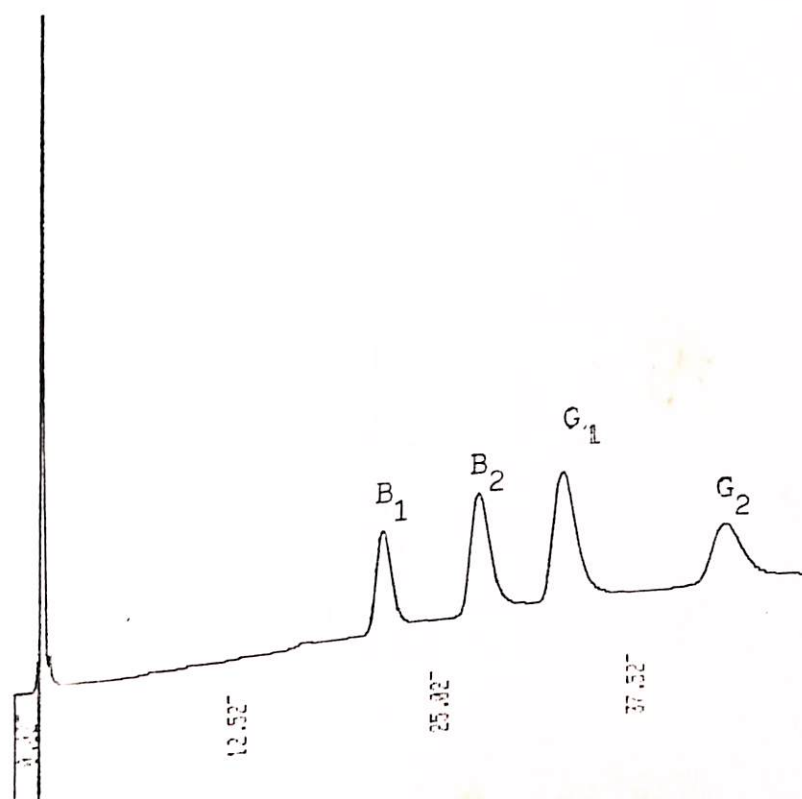


Figura 4 - Cromatograma da separação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizando coluna de Sílica em sistema de compressão radial com fase móvel de Acetato de Etila/n-Hexano (3:2,5; v/v) a um fluxo de 1 mL/min.

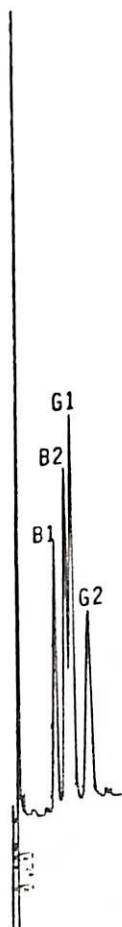


Figura 5 - Cromatograma da separação de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizando coluna de Sílica em sistema de compressão radial com fase móvel de Acetato de Etila/n-Hexano (2:1; v/v) a um fluxo de 4 mL/min.

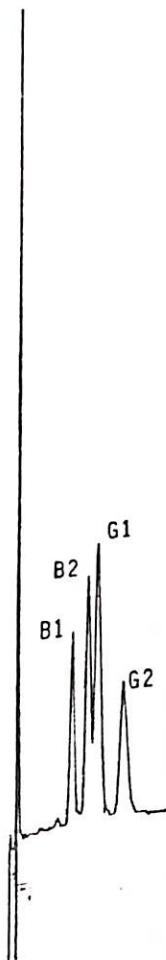


Figura 6 - Cromatograma da separação de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizando coluna de Sílica em sistema de compressão radial com fase móvel de Acetato de Etila/n-Hexano (3:2; v/v) a um fluxo de 4 mL/min.

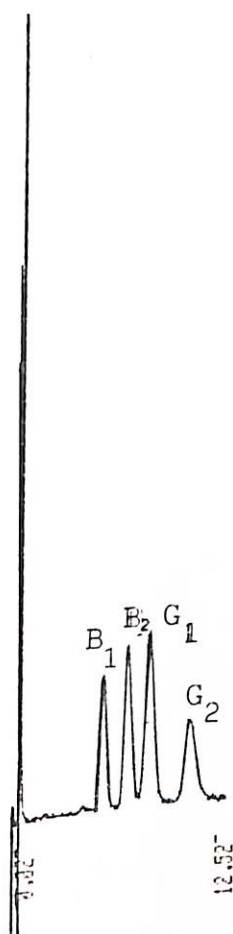


Figura 7 - Cromatograma da separação de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizando coluna de Sílica em sistema de compressão radial com fase móvel de Acetato de Etila/n-Hexano (3:2,5; v/v) a um fluxo de 4 mL/min.

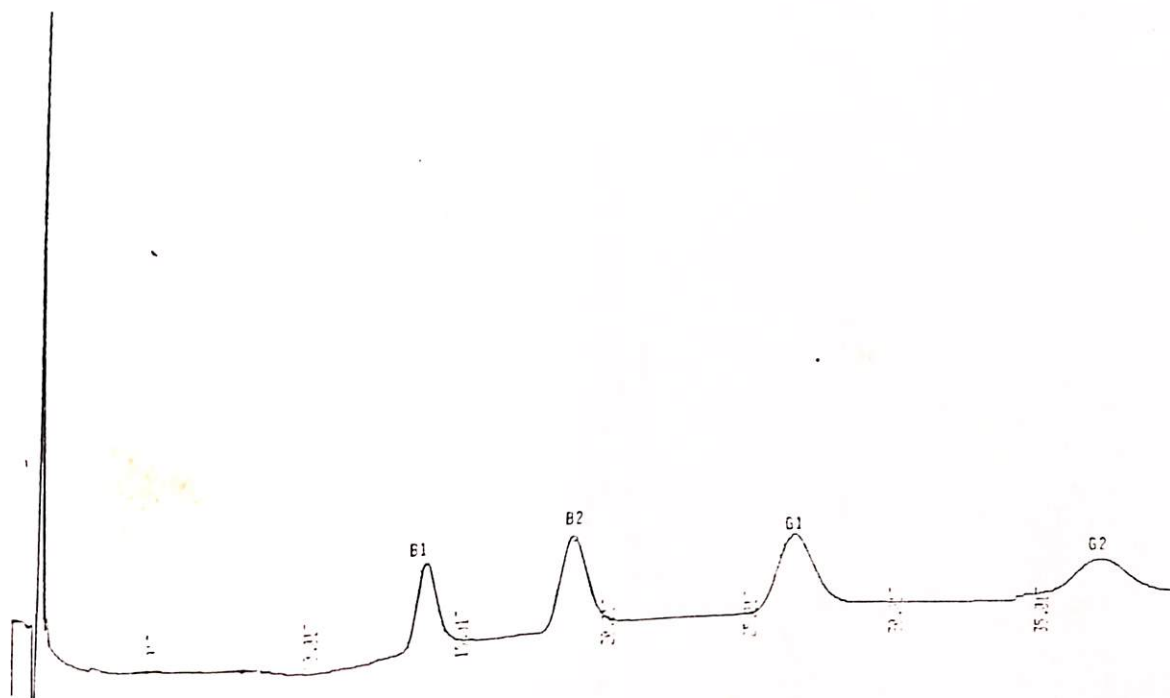


Figura 8 - Cromatograma da separação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel clorofórmio: Isoctano na proporção de 2:1 a um fluxo de 1 mL/min.

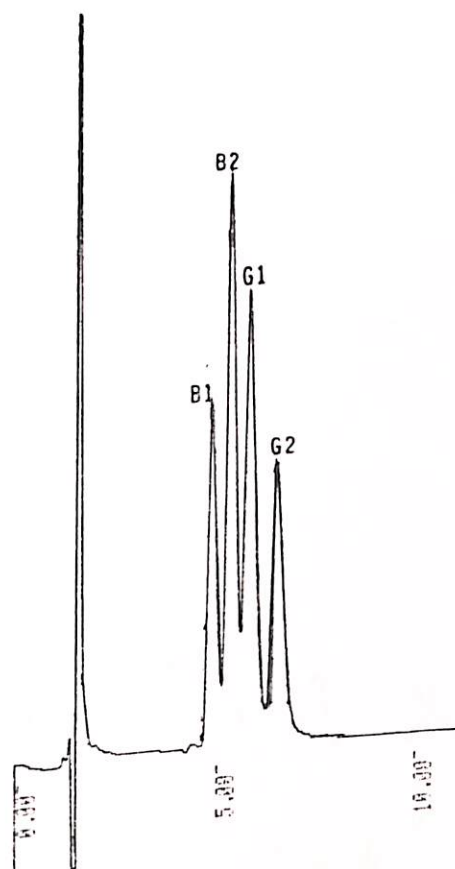


Figura 9 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Diclorometano:n-Hexano:Acetonitrila:etanol na proporção 75,0:25,5:2,5:2,0 a um fluxo de 1 mL/min.

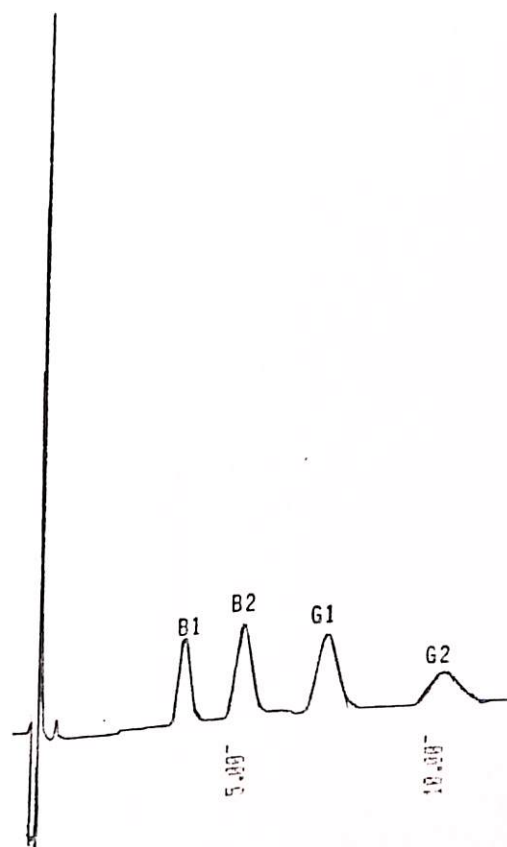


Figura 10 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Clorofórmio:Isoctano na proporção de 2:1 a um fluxo de 4 mL/min.



Figura 11 - Cromatograma da separação das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas com a fase móvel Diclorometano:n-Hexano:Acetonitrila:Etanol na proporção de 75,0:25,5:2,5:2,0 a um fluxo de 4 mL/min.

8335

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma fase móvel que fosse, ao mesmo tempo, compatível com coluna de fase normal, e que não apresentasse interferência no comprimento de onda usado para detecção das aflatoxinas por absorbância.

Na maioria dos métodos descritos foram usadas fases móveis que possuíam um grande número de componentes em sua composição (PONS, 1976; PANALAKS & SCOTT, 1977; WEI et al., 1980; AWE et al., 1981; SIRAJ et al., 1981; SHEPERD et al., 1982 e TSUBOI et al., 1984). Os solventes utilizados em maiores proporções são os de maior volatilidade, o que os incompatibiliza para a utilização, em nossas condições ambientais, conforme observado em nossos ensaios. Nessas metodologias, os sistemas de solventes apresentam ora compostos de grande toxicidade (por exemplo a acetonitrila) ora compostos que além de serem tóxicos, são também agressivos ao equipamento (por exemplo o clorofórmio).

O sistema solvente descrito por AWE et al. (1981), composto de diclorometano-ciclohexano-acetonitrila (25+7,5+1,0) com 0,5% de etanol absoluto, e testado por nós, embora apresentasse bons resultados no fluxo de 1 mL/min., quando se elevou o fluxo para 4 mL/min. apresentou baixos valores de resolução (0,6), de eficiência (610,6) e com seletividade de 1,1

(Tabela 5).

O sistema proposto por STEBER & HSIEH (1973), composto de clorofórmio e isoctano (2:1 v/v), quando testado por nós, apresentou pressão elevada na coluna (712 psi) para um fluxo de 2,5 mL/min., com tempos de retenção de 6,5; 8,4; 11,7 e 17,6 minutos para as quatro aflatoxinas testadas (Tabela 4). Com um fluxo de 4 mL/min., os valores de resolução (2,2) foram elevados, mostrando boa separação dos compostos, mas com pouca eficiência (717,7) e boa seletividade (1,1). Este fluxo acarretou aumento da pressão da coluna para 1.200 psi. Pela análise destes dados verifica-se que esta fase móvel dificulta a operação em fluxos mais elevados quando se pretende a redução dos tempos de retenção.

Na fase móvel Acetato de etila e n-Hexano (2:1 v/v) submetida à variações de fluxo de 1,0 a 4,0 mL/min. observou-se um aumento da pressão de 205 para 743 psi e redução dos tempos de retenção da AFG1 de 15,1 para 3,8 minutos e da AFG2 de 19,2 para 4,8 minutos (Tabela 1).

Quando foi utilizada na proporção de 3:2 (v/v), com a mesma variação de fluxo, a pressão elevou-se de 199 para 721 psi, com diminuição dos tempos de retenção da AFB1 de 15,5 para 3,7 minutos; da AFB2 de 19,2 para 4,7 minutos, da AFG1 de 22,0 para 5,3 minutos e da AFG2 de 28,8 para 6,9 minutos (Tabela 2).

Semelhante comportamento foi observado com a proporção 3:2,5 (v/v), quando a pressão se elevou de 210 para 727 psi com redução dos tempos de retenção de 22,2 para 5,5 (AFB1), de 28,2 para 7,0 minutos (AFB2), de 33,6 para 8,3 minutos (AFG1) e de 43,9 para 10,9 minutos (AFG2) como demonstrado na Tabela 3. Com a

diminuição da polaridade da fase móvel obteve-se aumento dos tempos de retenção, proporcionando valores mais elevados para o Fator Capacidade (K'), como demonstrado na Tabela 5. A Eficiência (N) do nosso sistema variou de 950 (fase menos polar) a 1070 (fase mais polar). O menor valor de eficiência foi devido ao alargamento dos picos em função de uma maior interação das aflatoxinas com a coluna (Tabela 5).

A fase por nós desenvolvida, nas três proporções, ocasiona uma pressão muito inferior na coluna do que a encontrada, em nossos testes, com a fase de SEIBER & HSIEH (1973) a um fluxo de 4 mL/min.

Os resultados encontrados para Seletividade (α) de 1,2 para a fase móvel mais polar e de 1,3 para a proporção 3:2,5 demonstraram que a fase menos polar foi a melhor para a separação da mistura de aflatoxinas nas condições desenvolvidas no presente trabalho e quando comparadas com os índices de Seletividade obtidos com os sistemas de solventes descritos por SEIBER & HSIEH (1973) e AWE et al. (1981).

O emprego da reciclagem da fase móvel favoreceu, não só a utilização de fluxos altos, como também diminuiu o consumo de solventes, uma vez que no procedimento normal, o efluente do detector é descartado. Esse procedimento, como o descrevemos, foi possível com o detector de ultravioleta.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados confirmam que a utilização de um sistema de solventes menos corrosivo e com menor grau de toxicidade, permite obter separações adequadas de misturas de aflatoxinas.

A utilização do sistema de compressão radial permite uma elevação de fluxo sem que em contrapartida tenhamos um aumento exagerado da pressão na coluna. Além disso, temos uma melhor reprodutibilidade dos resultados e facilidade de manuseio e limpeza da coluna.

A fase móvel que melhores resultados apresentou com relação à separação das quatro aflatoxinas testadas, foi aquela contendo Acetato de Etila e n-Hexano na proporção de 3:2,5 v/v), embora o tempo de retenção tenha sido o dobro do observado na proporção 2:1 (v/v), que seria uma segunda opção de proporção a ser empregada.

Em face dos resultados obtidos com a proporção 3:2,5 não Justifica a diminuição da polaridade da fase móvel, uma vez que haveria perdas de separação. Pode-se trabalhar com um litro de fase móvel utilizando reciclagem para até 100 injeções sem que isto interfira no desenvolvimento dos cromatogramas. Uma vez que o detector de ultravioleta permite esse tipo de operação; esse processo também diminui o consumo de solventes, além de

proporcionar uma maior comodidade com relação aos cuidados que se deve ter para evitar o término da fase móvel durante uma análise.

7-BIBLIOGRAFIA

ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KARDER, M.M.; SHANG, S.B.; WICK, E.L. & WOGAN, G.N., 1963. Aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 85:1706-1707.

AWE, M.J. & SCRANZ J.L., 1981. High Pressure Liquid Chromatographic determination of Aflatoxins in spices. J. AOAC. 64(6):1377-1382.

AOAC, Natural Poisons, Chapter 26, in Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1980.

CAMPBELL, T.C. & HAYES, J.R., 1976. The role of aflatoxins metabolism in its toxic lesion. Toxicol. Appl. Pharmacol. 35:199-222.

ENGBERCHT, R.H.; AYRES, J.L. & SINNHUBER, R.O., 1965. Isolation and determination of AFB₁ in cotton seed meals. J. Assoc. Off. and Chem, 48:815.

EPPLEY, R.M., 1966. Notes on a Developer for the Thin Layer Chromatographic of Aflatoxins. J. Assoc. Off. and Chem. 47:473.

GENEST, C. & SMITH, D.M., 1963. A note on Detection of Aflatoxin in Peanut Butter. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46:817-818.

HANNA, K.L. & CAMPBELL, T.C., 1968. Note on a Rapid Thin Layer Chromatography method for the isolation of a AFB1. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46:1197.

HARTLEY, R.D.; NESBITT, B.F. & O'KELLY, J., 1963. Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature (LONDON) 198:1056-1058.

NESBITT, B.F.; O'KELLY, J.; SARGENT, K. & SHERIDAN, A., 1962. Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature (LONDON) 195:1602-1962

PANALAKS, T. & SCOTT, P.M., 1977. Sensitive silica packed flowcell for fluometric detection of aflatoxins by high pressure liquid chromatography. J. AOAC 60(3):583-589.

PONS, W.A. 1976. Resolution of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 by High-Pressure Chromatography. Journal of the AOAC, 59(1):101-105

SEIBER, J.M. & HSIEH, D.P.H., 1973. Application of high speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56(4):827-830.

SHEPHERD, E.C.; PHILLIPS, T.D.; HEIDELBAUGH, N.B. and HAYES, W.A., 1982. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins by using radial compression separation. J. AOAC 65(3):665-671.

SIRAJ, M.Y.; HAYES, A.W.; UNGER, P.D.; HOGAN, G.R.; RYAN, N.J. & WRAY, B.B., 1981. Analysis of aflatoxin in human tissues with high-pressure liquid chromatography. Toxicol. Appl. Pharmacol. 58:442-430.

SMITH, J.E. & MOSS, M.O., 1985. Mycotoxins: Formation analysis and significance. John Willey & Sons, Chichester Britain, 148 pag.

TSUBOI, S.; NAKAGAWA, T.; TOMITA, M.; SEO, T.; ONO, H.; KAWARMURA, K. & IWAMURA, N., 1984. Detection of aflatoxin B₁ in serum samples of male Japanese subjects by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography. Cancer Research, 44:1231-1234.

WEI, R.D.; CHANG, S.C. & LES, S.S., 1980. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin in soy sauce and fermented soybean paste. J. AOAC 63(6):1269-1274.