

Determinação do biomarcador de exposição à Aflatoxina B₁ (AFB₁-lisina) em soro por UPLC-MS/MS

Alessandra V. Jager¹ (PQ)*, Fernando G. Tonin¹ (PQ), Mauricio R. Trotta² (PG), Leandra N. Z. Ramalho² (PQ), Fernando S. Ramalho² (PQ), Daiane C. Sass¹ (PQ), Carlos A. F. de Oliveira¹ (PQ)

*e-mail: alejager@usp.br

¹ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, Brasil

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brasil

Palavras Chave: Aflatoxinas, AFB₁-lisina, UPLC-MS/MS

Introdução

As aflatoxinas são compostos carcinogênicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, que contaminam alimentos, originando riscos à saúde humana e perdas econômicas na produção animal. A exposição à aflatoxina B₁ (AFB₁), ocorre predominantemente através da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo milho, amendoim e derivados¹. Após a absorção a AFB₁ é oxidada por enzimas hepáticas microssomais a um epóxido altamente reativo, que subsequentemente reage com a albumina sérica para gerar o aduto AFB₁-lisina. Estudos em animais e humanos demonstraram que os metabólitos de AFB₁ encontrados em soro e urina apresentam relação de dependência com a dose ingerida e assim podem ser empregados como biomarcadores de exposição. A meia-vida do aduto AFB₁-lisina é comparável a da albumina, cerca de três semanas, portanto a exposição pode ser medida por um período de meses, sendo que exposições repetidas resultam em níveis elevados de AFB₁-lisina no soro. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico para a quantificação de AFB₁-lisina em soro por UPLC-MS/MS.

Resultados e Discussão

O padrão do aduto AFB₁-lisina foi sintetizado, purificado e caracterizado por UV-Vis, LC-MS/MS e RMN². As amostras de soro foram hidrolisadas empregando a enzima Pronase E (Sigma Aldrich) e o extraídas em coluna Oasis Max 30 mcg (Waters). As análises foram conduzidas em sistema Acquity I-Class equipado com coluna C₁₈ (BEH, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm) e acoplado a um Espectrômetro de Massas Xevo TQ-S (Waters). A eluição em gradiente foi otimizada com fase móvel composta por água e acetonitrila contendo 0.05% de ácido fórmico. O tempo total de corrida foi 2,5 min mantendo o fluxo em 0,6 mL/min. O detector operou em modo MRM utilizando ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo. A voltagem do cone, energia de colisão, voltagem do capilar, temperatura da fonte e de dessolvatação, assim como as transições de

quantificação (m/z 457.1 > 394) e confirmação (m/z 457.1 > 348) foram otimizadas para se obter melhor sensibilidade para o analito. O limite de quantificação foi estimado em 25 pg mL⁻¹ (sinal/ruído 10:1). A curva analítica foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) e pelo gráfico de resíduos e não apresentou desvios de linearidade. A precisão entre preparações (CV=20%, n=6) e a recuperação (70-80%) do método foram avaliadas em amostras de soro de rato fortificadas com solução padrão. O método foi testado na análise de amostras de soro de ratos que receberam dose oral de AFB₁ (Figura 1).

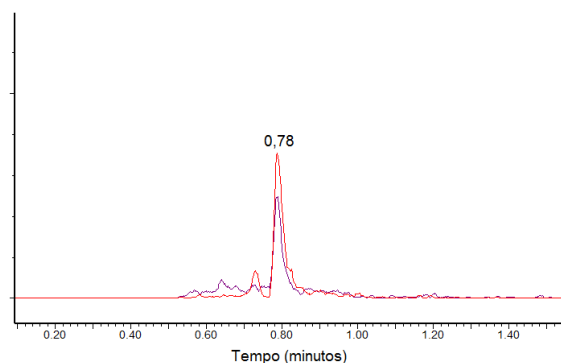


Figura 1. Cromatograma de uma amostra soro de rato analisada pelo método proposto.

Conclusões

O método desenvolvido é adequado para a quantificação de AFB₁-lisina em soro e será empregado em estudos de relações dose-resposta entre a concentração de AFB₁-lisina e alterações moleculares do carcinoma hepatocelular em modelo experimental e em humanos.

Agradecimentos

FAPESP

¹ Jager, A. V.; Tedesco, M. P.; Souto, P. C. M. C e Oliveira, C. A. F. *Food Control*. **2013**, *33*, 87.

² Sass, D. C.; Jager, A. V.; Tonin, F. G.; Ramalho, L. N. Z.; Ramalho, F. S. e Oliveira, C. A. F. *Toxin Reviews*, **2013**, *32*, 68.