

## Determinação do biomarcador de exposição à Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>-lisina) em soro por UPLC-MS/MS

Alessandra V. Jager<sup>1</sup> (PQ)\*, Fernando G. Tonin<sup>1</sup> (PQ), Mauricio R. Trotta<sup>2</sup> (PG), Leandra N. Z. Ramalho<sup>2</sup> (PQ), Fernando S. Ramalho<sup>2</sup> (PQ), Daiane C. Sass<sup>1</sup> (PQ), Carlos A. F. de Oliveira<sup>1</sup> (PQ)

\*e-mail: alejager@usp.br

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

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

Palavras Chave: Aflatoxinas, AFB<sub>1</sub>-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 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ocorre predominantemente através da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo milho, amendoim e derivados<sup>1</sup>. Após a absorção a AFB<sub>1</sub> é oxidada por enzimas hepáticas microssomais a um epóxido altamente reativo, que subsequentemente reage com a albumina sérica para gerar o aduto AFB<sub>1</sub>-lisina. Estudos em animais e humanos demonstraram que os metabólitos de AFB<sub>1</sub> 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 AFB<sub>1</sub>-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 AFB<sub>1</sub>-lisina no soro. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico para a quantificação de AFB<sub>1</sub>-lisina em soro por UPLC-MS/MS.

### Resultados e Discussão

O padrão do aduto AFB<sub>1</sub>-lisina foi sintetizado, purificado e caracterizado por UV-Vis, LC-MS/MS e RMN<sup>2</sup>. 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 C<sub>18</sub> (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<sup>-1</sup> (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 AFB<sub>1</sub> (Figura 1).

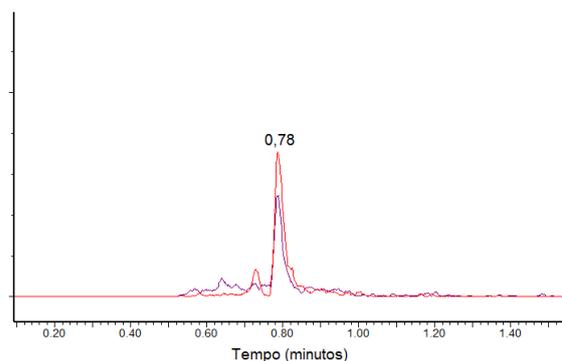


Figura 1. Cromatograma de uma amostra soro de rato analisada pelo método proposto.

### Conclusões

O método desenvolvido é adequado para a quantificação de AFB<sub>1</sub>-lisina em soro e será empregado em estudos de relações dose-resposta entre a concentração de AFB<sub>1</sub>-lisina e alterações moleculares do carcinoma hepatocelular em modelo experimental e em humanos.

### Agradecimentos

FAPESP

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

<sup>2</sup> 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.