
Bioflavonóides e Quercetina: procedimento analítico por cromatografia em camada delgada para determinação de aflatoxinas

Leda Conceição Antonia LAMARDO, Luzia SHUNDO, Sandra Aparecida NAVAS, Myrna SABINO

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica

As aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente as espécies *flavus*, *parasiticus* e, eventualmente o *nomius*. *Aspergillus flavus* e *parasiticus* são os fungos economicamente mais importantes em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil, pois as melhores condições para a proliferação dos fungos e, conseqüentemente para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com temperaturas entre 25 a 30°C e umidade relativa entre 83-85%³.

A descoberta das aflatoxinas e suas propriedades carcinogênicas alertaram para inúmeras conseqüências tanto econômicas quanto para a saúde humana e animal, ocasionadas pela ocorrência natural dessas toxinas nos alimentos e rações. A partir desta descoberta, foram realizadas extensivas investigações no desenvolvimento de métodos analíticos para detectar e determinar micotoxinas em produtos agrícolas e fluídos biológicos. Pelo fato dessas substâncias ocorrerem em matrizes complexas, em níveis de ng/g, as etapas de extração, remoção de interferentes, bem como a separação desses analitos de substâncias análogas e sua identificação, tornaram-se procedimentos importantes numa técnica analítica. Diferentes matrizes requerem diferentes métodos e procedimentos para extração, limpeza, separação, quantificação e confirmação do analito que são descritos na literatura.

Geralmente, as micotoxinas são extraídas por diferentes misturas de água com solventes orgânicos, tais como o clorofórmio, metanol, acetonitrila e acetona. A limpeza pode ser realizada por extração em fase sólida, partição líquido-líquido e precipitação. As técnicas tradicionais de cromatografia, como a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são muito utilizadas para a separação e quantificação².

O desenvolvimento de métodos imunoquímicos, também conhecidos como métodos baseados em imunoafinidade, utilizam anticorpos micotoxinas específicas para a extração e limpeza da toxina dos extratos das

amostras. Os mais utilizados são o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e a coluna de imunoafinidade².

Vários tipos de matrizes são encaminhadas para a seção de Química Biológica para a avaliação da presença ou não das aflatoxinas. Por se tratar de um contaminante natural, esta toxina pode estar presente em diversos produtos, sendo que para alguns deles, existem poucas informações disponíveis quanto ao procedimento analítico, havendo a necessidade de adequar uma metodologia para a detecção e quantificação desta micotoxina e também avaliar sua eficiência.

Dentre estas matrizes podemos citar os bioflavonóides e a quercetina recentemente analisados neste laboratório. Os bioflavonóides são compostos naturais encontrados numa variedade de alimentos de origem vegetal, como por exemplo frutas e chás (principalmente em erva mate). Estudos demonstram apresentar atividades antioxidantes, sendo capazes de reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares e câncer¹.

A metodologia empregada consistiu na extração com água e clorofórmio, seguida de agitação e filtração. Para a quercetina (Figura 1), a separação e determinação foi realizada por CCD-bidimensional e quantificação visual. Para os bioflavonóides (Figura 2) foi introduzido uma etapa adicional de limpeza e extração por coluna de imunoafinidade, seguido de separação por CCD-bidimensional e quantificação visual. Para ambos, a confirmação da aflatoxina foi utilizada a reação com o Ácido Trifluoroacético (TFA).

O limite de detecção (LD) foi de 0,5 ng/g para aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, considerando a concentração mínima visualizada em CCD. Foi realizada uma recuperação para o nível de 2 ng/g para cada aflatoxina. Para a quercetina, a recuperação média foi de 80,0%, 103,0%, 82,0% e 84,5% e para os Bioflavonóides, a recuperação foi de 85,0%, 60,0%, 62,5% e 73,5% para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente.

| Quercetina | Bioflavonóides |
|--|---|
| <p>•extração: Pesar 5 g amostra Adicionar: 10 mL de água aquecida 50 mL de clorofórmio Agitar por 30 minutos no shaker Filtrar em papel de filtro qualitativo Recolher toda a fase clorofórmica e secar até resíduo para CCD</p> <p>•separação e determinação: CCD bidimensional (10x10 cm) 1ª fase móvel: clorofórmio/acetona (90:10) 2ª fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:30:10) Eluir o extrato com 200 µL de clorofórmio Cromatografar 40 µL</p> <p>•confirmação: solução de ácido trifluoroacético (TFA) em hexano (1+3)</p> <p>Figura 1. Representação esquemática do procedimento analítico para determinação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em Quercetina</p> | <p>•extração: Pesar 5 g amostra Adicionar: 10 mL de água aquecida 50 mL de clorofórmio Agitar por 30 minutos no shaker Filtrar em papel de filtro qualitativo Recolher toda a fase clorofórmica e secar até resíduo Ressuspender com 5 mL de metanol Adicionar 25 mL de tampão PBS Centrifugar e filtrar, caso ocorra turvação Passar pela coluna de imunoafinidade Lavar a coluna com água (10 mL x2) Eluir com 2 mL de metanol Secar até resíduo para CCD</p> <p>•separação e determinação: CCD bidimensional (10x10 cm) 1ª fase móvel: clorofórmio/acetona (90:10) 2ª fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:30:10) Eluir o extrato com 100 µL de clorofórmio Cromatografar 30 µL</p> <p>•confirmação: solução de ácido trifluoroacético (TFA) em hexano (1+3)</p> <p>Figura 2. Representação esquemática do procedimento analítico para determinação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em Bioflavonóides</p> |

REFERÊNCIAS

1. Fiander, H., Scheneider, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. **Cancer Lett.**, 156:17-24, 2000.
2. Trucksess, M.W. Rapid Analysis (Thin Layer Chromatographic and Immunochemical Methods) for Mycotoxins in Foods and Feeds. In: De Koe, W.J., Samsom, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M. ed. **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium**, Wageningen, The Netherlands, 2001, p.29-40.
3. WHO – World Health Organization – **Mycotoxins**, Geneve, [Environmental Health Criteria 11]. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme and the World Health Organization, Printed in the United Kingdom, 1979, p.21-85.