



DETERMINAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLUTAMATO POR CLAE/UV

Cassiano Machado¹
Fernanda Nunes Vilanova²
Dione Silva Corrêa³

Resumo

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa C₁₈ tem se mostrado grande aliada de pesquisadores para a quantificação de aminoácidos, por se tratar de um método analítico simples, rápido e de alta sensibilidade. Partindo deste ponto, neste trabalho utilizou-se do método CLAE/UV para a determinação do glutamato. O aminoácido sofreu derivatização com fenilsotiocianato, composto orgânico que tem facilidade em reagir com aminas primárias e secundárias, formando o produto composto espectral feniltiocarbamil que possui propriedades de absorção de luz na região do UV permitindo sua detecção a 254 nm. Foram empregadas ao todo três metodologias diferentes, com algumas alterações entre si, para a quantificação do aminoácido. Os resultados até então obtidos não foram considerados satisfatórios, devido a problemas como degradação e validade do reagente derivatizante. O método CLAE/UV mostrou-se promissor na determinação do glutamato. Os testes prosseguirão a fim de aperfeiçoar e validar esta metodologia para a quantificação do aminoácido glutamato no LCR.

Palavras chave: Glutamato; CLAE/UV; validação; fenilsotiocianato.

INTRODUÇÃO

Considerado o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, o Glutamato ou Ácido L-Glutâmico, é um aminoácido não essencial encontrado em abundância na natureza e produzido pelo nosso próprio organismo, estando diretamente relacionado a atividades cerebrais como memória e aprendizado. Devido à grande participação no SNC, em circuitos excitatórios no córtex, hipocampo por exemplo, o Glutamato se torna um alvo da medicina da neurociência, que com o avanço da tecnologia, busca encontrar e aperfeiçoar novas maneiras e novos tipos de anestésicos que sejam inibidores de dor. Para isso, a medicina tem empregado o uso do aminoácido não essencial em líquido cefalorraquidiano (LCR), visando o desenvolvimento de novos fármacos e analisando as funções desempenhadas por ele em diferentes regiões do cérebro.

A quantificação do glutamato no LCR não é simples, pois este aminoácido não apresenta características eletroativas e nem fluorescentes, sendo assim, não tendo absorbância na região do UV/Visível. Para a sua determinação, o aminoácido precisa passar por processo de derivatização em pré-coluna, seguido de uma análise qualitativa, sendo comumente usada separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV) em fase reversa (Coluna C₁₈). Esta técnica é amplamente difundida e com vasto campo de aplicação, encontrando-se como uma possibilidade para determinar aminoácidos, por ser um método analítico de alta

1 Aluno do curso de graduação de Química Industrial/ULBRA - Bolsista PROBIC/FAPERGS – cassianomachado2011@hotmail.com

2 Aluna do Curso de graduação de Química Industrial/ULBRA - Bolsista PROBITI/FAPERGS – vilanova.fe@gmail.com

3 Professora - Orientadora do Curso de Química e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA - dionecorrea@uol.com.br

sensibilidade, onde ocorre a separação de diferentes substâncias químicas de uma amostra. Essa separação ocorre na interação da amostra com duas fases do equipamento: a fase estacionária (coluna cromatográfica) e a fase móvel, solventes que fluem constantemente pelo sistema, carregando a amostra através da coluna. A leitura das substâncias na amostra é feita em um software conectado à CLAE e traduzida em forma de picos em um cromatograma, uma representação gráfica desta separação.

Dentre os reagentes derivatizantes para a análise de aminoácidos em pré-coluna, o fenilisotiocianato (PITC), é um dos mais estudados, pois tem como vantagem a possibilidade de reagir com aminas primárias e secundárias, havendo o acoplamento do reagente derivatizante ao NH_2 do aminoácido, em uma reação relativamente rápida que ocorre em 20 minutos em pH alcalino. O produto formado é um mono derivado feniltiocarbamil (PTC) que é visível no ultravioleta, sendo possível ser quantificado, separado e lido pelo método de CLAE-UV.

Este trabalho tem por objetivo geral testar a eficiência de um método analítico (CLAE/UV) para a determinação do glutamato liberado no líquido de rato após administração de uma substância algogênica como a formalina, bem como prosseguir nas tentativas de obter um método validado que esteja de acordo com as normas de órgãos públicos.

METODOLOGIA

Três metodologias foram testadas, variando o procedimento de derivatização, gradiente e fase móvel na CLAE.

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes, padrão CLAE: acetonitrila, trietilamina, etanol, acetato de sódio tri-hidratado, fenilisotiocianato, L-glutamato, água deionizada Milli-Q, bicarbonato de sódio, acetato de amônia e metanol.

Para a composição da solução derivatizante, utilizou-se etanol, trietilamina, água deionizada Milli-Q e fenilisotiocianato (PITC) na proporção de (7:1:1:1) v/v/v/v.

Nos métodos 1 e 3 foram empregadas: fase móvel A, tampão (acetato de sódio tri-hidratado 0,23 M e 2,5% acetonitrila) pH 7,45 e fase móvel B, acetonitrila-água 60:40, v/v. No método 2, usou-se fase móvel A como solução de acetato de amônia 0,1M e fase móvel B mantendo acetonitrila-água 60:40, v/v com proporções maiores. A fase móvel foi sempre filtrada e degaseificada em ultrassom por 40 minutos antes da realização da análise.

Método 1

Preparo da solução padrão: consistiu na pesagem de 0,05 g de L-Glutamato, avolumou-se em balão volumétrico de 25 mL com solução de NaHCO_3 0,5 M. Para homogeneização, a solução foi deixada por alguns segundos no ultrassom, e em seguida transferida para um frasco, tendo seu pH devidamente testado.

Preparo da solução diluente, composta de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) à 10% de acetonitrila, na relação 190 μL Na_2HPO_4 : 10 μL ACN: pesagem de 0,0705 g de Na_2HPO_4 em balão volumétrico de 100 mL, posteriormente dissolvidos com água Milli-Q. Adicionou-se cerca de 6 mL de ACN, transferindo a solução para um frasco.

Foram coletados 60 μL da solução Padrão e 440 μL da solução de bicarbonato de sódio e depositados em um vial, obtendo-se a solução Trabalho. A partir desta solução foram coletados 60 μL , depositados dentro de um eppendorf, deixando-o em banho-maria à 37 °C sob fluxo de nitrogênio durante aproximadamente 10 minutos.

Preparo da solução derivatizante: foram adicionados dentro de um béquer de 10 mL, 350 μL de etanol, 50 μL de água Milli-Q, 50 μL trietilamina e 50 μL fenilisotiocianato, levando-o em seguida ao ultrassom.

Na amostra seca adicionou-se 60 μ L da solução derivatizante no eppendorf, colocando em volta um papel alumínio e o mantendo em ambiente escuro por 20 minutos, evitando o mínimo possível de contato com a luz. Ao término do tempo, repetiu-se a secagem.

A seguir coletou-se 2mL da solução diluente e adicionou-se ao eppendorf, transferindo para um balão volumétrico de 10 mL, completado com a solução diluente, dando origem à solução Mãe. Seguiram-se 6 diluições com suas respectivas concentrações, feitas em balões de 5mL, envoltos em papéis alumínio para evitar degradações, sendo completados com água Milli-Q, conforme a tabela à baixo.

Quadro 1: concentrações obtidas a partir da solução Mãe

Volume solução Mãe (mL)	Concentração (mol/mL)
0,25	2,44
0,5	4,88
1	9,76
2	19,52
2,5	24,40
3	29,28

A amostra foi submetida ao método CLAE com gradiente binário das fases móveis A e B, fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida total de 20 minutos, conforme a tabela 2:

Tabela 2: gradiente binário das fases móveis A e B.

TEMPO (min)	%A	%B
0	100	0
1	95	5
8	90	10
1	50	50
1	0	100
8	0	100
1	100	0
1	100	0

Método 2

Preparo da solução Padrão: pesou-se 15,1x10⁻⁴ g de L-Glutamato, dissolvido em 100 mL de ácido clorídrico 0,1 M, e em seguida estocados. Preparou-se em seguida, uma solução contendo etanol, água Milli-Q e trietilamina nas proporções (2:2:1 v/v/v). Com auxílio de uma micropipeta colocou-se em um eppendorf, 40 μ L da solução padrão de glutamato e 20 μ L da solução contendo EtOH, H₂O e TEA. O procedimento de secagem sobre fluxo de Nitrogênio obedeceu os mesmos critérios do primeiro método apenas com a temperatura de 60 °C. O processo de derivatização seguiu as condições anteriores.

Após a secagem, a amostra já derivatizada foi solubilizada em 1 mL de solução de acetato de amônio 0,1 M contendo 2,5% de acetonitrila e avolumada para balão de 10 mL. Para a fase móvel A, pesou-se 3,9 g de acetato de amônia para um balão volumétrico de 500 mL com água Milli-Q e adicionando 12,5 mL de acetonitrila à solução já no frasco. Na fase móvel B, manteve-se a proporção 60:40, alterando apenas a quantidade: 300 mL de

acetonitrila para 200 mL de água Milli-Q. A amostra foi submetida ao método CLAE com tempo de corrida adaptado para 21 minutos.

Método 3

Neste método foi preparada uma solução Estoque de 1mg/mL do aminoácido em NaHCO_3 0,5 M. Pesou-se 0,025g de L-Glutamato dissolvidos em balão de 25mL com bicarbonato de sódio 0,5M. A partir do Estoque, coletou-se 60 μ L e adicionou-se ao eppendorf. O processo de secagem-derivatização seguiu os mesmos critérios do método 1, sendo a amostra seca, derivatizada e armazenada em ambiente isento de luz por 20 minutos.

Foram adicionados 2 mL de solução diluente ao eppendorf e depositados em um balão volumétrico de 10 mL. Para a aplicação no método CLAE/UV, foi efetuada uma única diluição, coletando-se com o auxílio de uma seringa, 2,5 mL da solução presente no balão de 10 mL, transferiu-a para um balão de 5 mL e avolumou com a solução diluente, obtendo-se a concentração de 20,4 nmol/mL. O balão foi envolvido em papel alumínio para evitar contato com a luminosidade e a estocagem armazenada em temperatura inferior a 0 °C.

Para os dois últimos métodos testados, foi empregado o seguinte gradiente binário das fases móveis A e B com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 21 minutos:

Tabela 3: gradiente binário das fases móveis A e B para métodos 2 e 3.

TEMPO (min)	%A	%B
0	95	5
8	95	5
1	50	50
1	0	100
5	0	100
1	95	5
5	95	5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos cromatogramas obtidos em cada teste, notou-se que o pico referente ao aminoácido não se manteve constante nas análises dentro do emprego do mesmo método, indicando algum tipo de degradação. Nos métodos 1 e 3 o pico indicando o aminoácido foi registrado em torno de 6 minutos, porém seguido de oscilações oriundas de possíveis degradações da amostra. No método 2, o pico indicando o Glutamato foi registrado no tempo de 3 minutos, no entanto, foi seguido de um pico em 12 minutos, provável da degradação da amostra impossibilitando assim, a confirmação do aminoácido devido a semelhança entre os sinais.

CONCLUSÕES

A viabilidade do método CLAE-UV para a quantificação do glutamato não foi alcançada até o presente momento devido a possíveis interferências, que vão desde a validade dos reagentes utilizados, até o tempo de exposição das amostras às condições ambientes, além de fatores como condicionamento das soluções padrão ou estoque do aminoácido. Mesmo assim é comprovada a eficiência da reação de derivatização do glutamato com

fenilisotiocianato, comprovada por espectrofotometria UV, bem como a sua detecção pelo método de CLAE/UV como um método analítico rápido e de alta sensibilidade.

O trabalho deverá prosseguir com alterações nas metodologias até aqui empregadas, baseando-se em diversas referências bibliográficas como complemento, a fim de aperfeiçoar a técnica, visando uma futura validação de método e sua utilização para determinar o glutamato em demais amostras.

AGRADECIMENTOS

À orientadora professora Dra. Dione Silva Corrêa por sua disponibilidade, pela oportunidade e confiança proporcionada. À FAPERGS pelo apoio através da bolsa de iniciação científica. À bolsista Fernanda Nunes Vilanova por me orientar e receber no projeto. Ao CEPED e à ULBRA/Canoas pela disponibilidade do laboratório para esta análise.

REFERÊNCIAS

PERTILE, Fernando. **Aplicação da CLAE na Determinação do Aminoácido Glutamato como Mediador Químico na Dor**. 48 f.. Monografia – Química Industrial, Universidade Luterana do Brasil, 2014.

CHUST, B, Rafael. **Introdução Cromatografia de Líquidos (HPLC)**. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/article/3000458/pdf>. Acesso em: 29 Mai. 2017.

ALBARRACÍN, Sonia L.; BALDEÓN, Manuel E.; SANGRONIS, Elba; Petruschina, Alexandra C.; REYES, Felix G. R. **L-Glutamato**: un aminoácido clave para las funciones sensoriales y metabólicas. Disponível em: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222016000200002&lang=pt. Acesso em: 29 Mai. 2017.