



OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE/UV PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO

Meiriellen Pedreira¹, Alhean Oliveira²

Dione Silva Corrêa^{1,3}

Cursos de Química¹ e Eng. Químico²; PPGTA³ – ULBRA

INTRODUÇÃO

L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos.

Alterações nos níveis cerebrais de determinados aminoácidos neurotransmissores podem estar relacionadas com a patologia de doenças como Alzheimer, epilepsia e esquizofrenia. Desta forma, a quantificação de aminoácidos neurotransmissores em modelos animais pode oferecer uma ferramenta adicional para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, a identificação de mudanças nas concentrações desses aminoácidos em diferentes regiões cerebrais pode ser útil no monitoramento da eficiência de fármacos e no entendimento dos seus mecanismos de ação.

Existem diferentes métodos para a detecção do glutamato, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) é um método físico-químico de separação, bastante utilizado para a determinação de aminoácidos em amostras biológicas, em que os constituintes de determinada amostra interagem com um solvente (fase móvel), no qual é eluído por uma bomba de alta pressão através de uma coluna cromatográfica (fase estacionária). Sendo então, capaz de separar e analisar constituintes químicos em escala de minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

OBJETIVO

Otimizar a metodologia na dosagem do neurotransmissor glutamato, presente no líquor cefalorraquidiano de ratos submetidos ao modelo de nocicepção.

METODOLOGIA

O método de derivatização com PITC e posterior análise por CLAE/UV foi empregado para análise de glutamato. A reação de PITC com aminoácidos é relativamente rápida e específica em pH alcalino e temperatura ambiente. Há formação do feniltiocarbamil, composto derivatizado a partir da reação do fenilisotiocianato ao glutamato (Fig. 1)

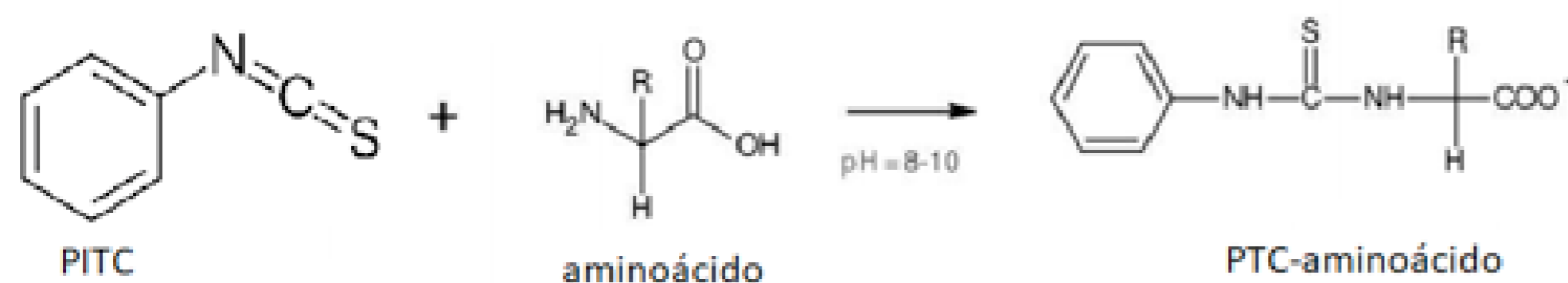


Figura 1: Derivatização de aminoácido glutamato

Foi empregado um sistema gradiente binário das fases móveis **A** (acetato de sódio 0,09M) e **B** (acetonitrila-água 60:40, V/V). O detector UV foi ajustado com comprimento de onda (λ) de 254 nm e sensibilidade de 0,01 AUFS. A eluição cromatográfica foi realizada com fluxo de 1 mL.min⁻¹, utilizando uma coluna Agilent C18 5 μ m (4,6x250 mm). Na tabela 1 são apresentadas as condições cromatográficas definidas para a identificação e quantificação.

O fluxograma a seguir, ilustra a metodologia empregada na derivatização e quantificação do glutamato:

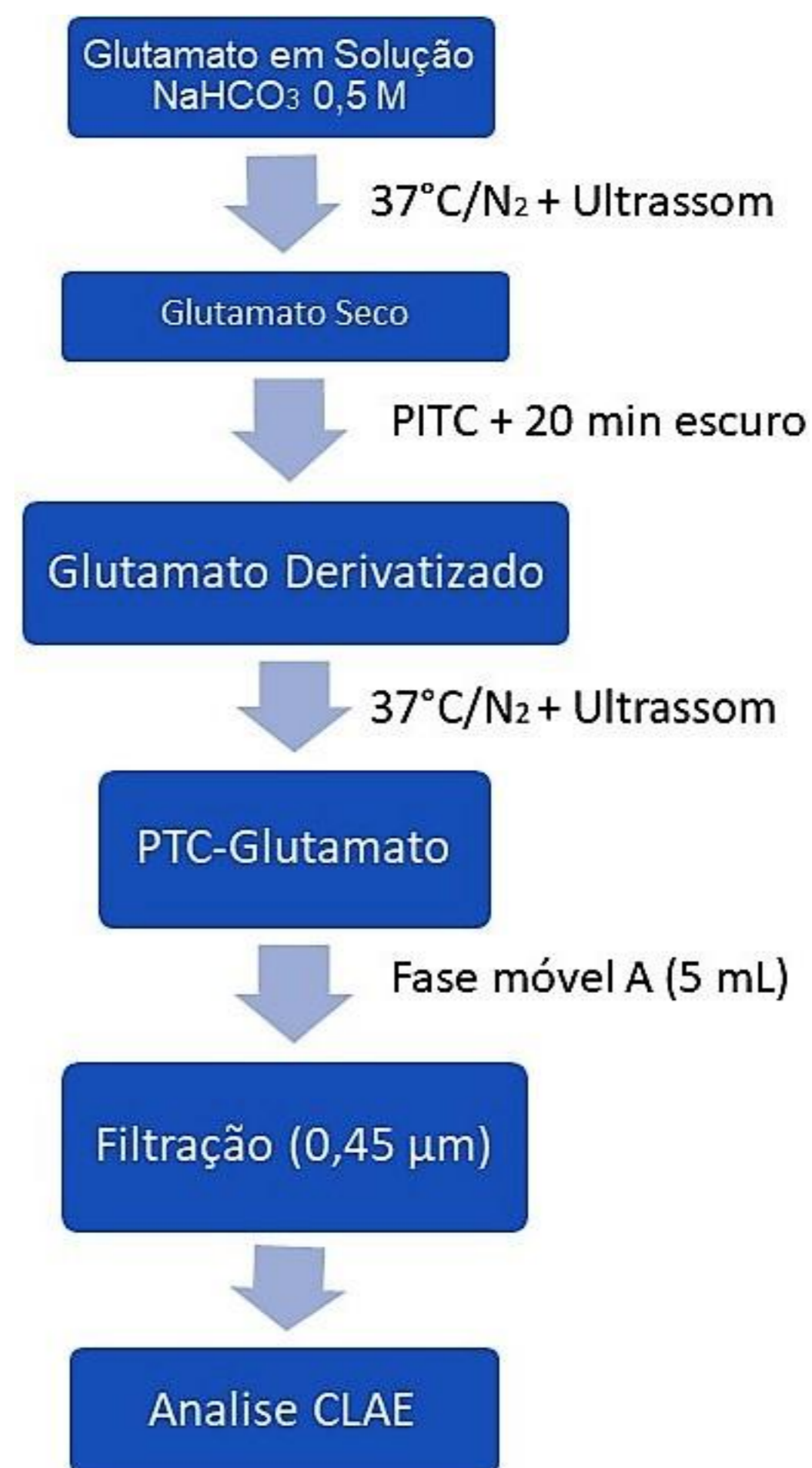


Tabela 1: Condições Cromatográficas

STEP	TIME	FLOW	% A	% B	CURV
0	0	1	0	100	-
1	2	1	50	50	0
2	2	1	80	20	1
3	6	1	100	0	1
4	2	1	95	5	1

RESULTADOS

Foi possível obter uma visão dos conceitos e técnicas instrumentais de separação para quantificar o glutamato através de um método analítico, pela concentração, e o padrão de referência utilizados (Fig. 2)

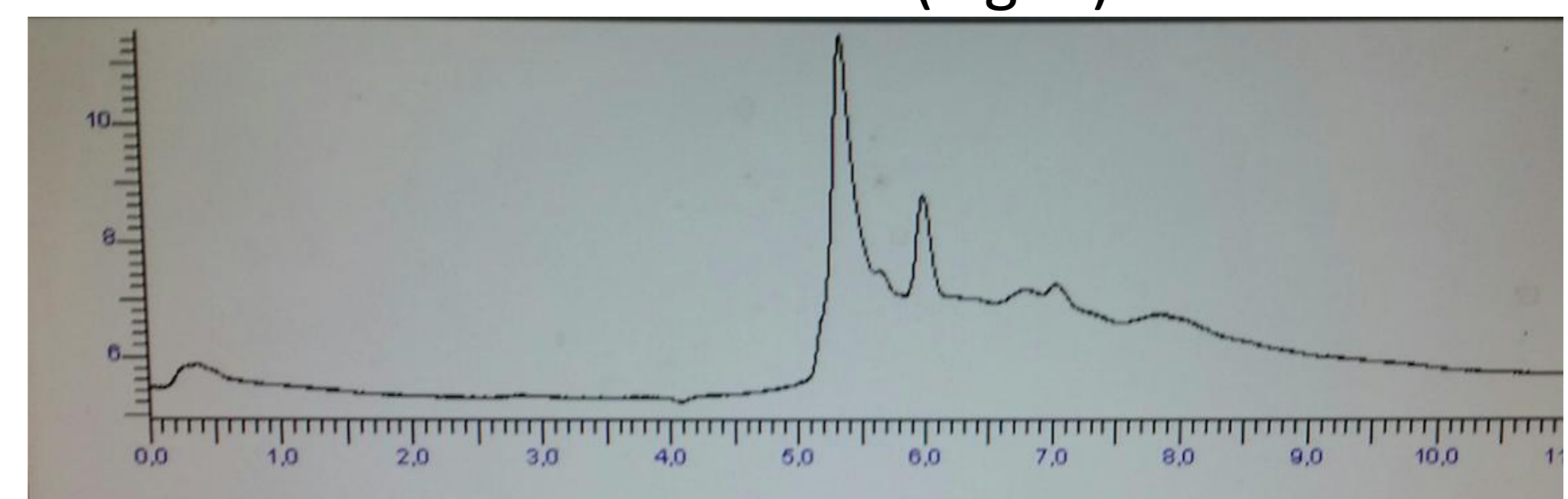


Figura2: Cromatograma do glutamato derivatizado

CONCLUSÃO

O método de CLAE-UV para a determinação do aminoácido glutamato no líquor de rato através da derivatização no comprimento de onda de 254nm, apresentou boa eficiência e sensibilidade na detecção do glutamato na escala de concentração na ordem de nmol/mL.

REFERÊNCIAS

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, [s.l.], v. 27, n. 5, p.771-780, out. 2004

VILANOVA, F.N; CORREA, D.S. **A espectrofotometria UV/Vis na determinação de glutamato.** 3º Colóquio Ulbra de Extensão, Pesquisa e Ensino. 3º Encontro Ulbra de bolsistas CNPq FAPERGS, 2017.