



APLICAÇÃO DA CLAE NA DETERMINAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLUTAMATO COMO MEDIADOR QUÍMICO NA DOR

Fernanda N. Vilanova, Bolsista PROBIC/FAPERGS

Dione S. Corrêa, Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia
Aplicada/ULBRA

Resumo

Com o avanço da medicina na neurociência cresce o interesse em desenvolver novos fármacos que atuem no sistema nervoso central para mediar ou inibir a dor. Desta forma, o presente estudo utilizou um método simples e eficiente para a quantificação do aminoácido glutamato pela técnica CLAE/UV no líquor de ratos tratados com uma substância que causa nocicepção, a formalina. Na determinação do aminoácido glutamato por CLAE/UV empregou-se coluna analítica em fase reversa C18. O aminoácido foi derivatizado com fenilisotiocianato para gerar o composto espectral feniltiocarbamil que possui propriedades de absorção de luz na região do UV permitindo sua detecção a 254 nm. Em trabalho prévio do grupo de pesquisa, foi possível construir a curva analítica, através da área do pico do cromatograma, obtendo a correlação linear no valor de 0,9991. Ainda estão sendo coletadas amostras, para adquirir mais credibilidade nos resultados, a fim de desenvolver um método de validação para o aminoácido.

Palavras-chave: Glutamato; CLAE/UV; derivatização.

INTRODUÇÃO

Com o constante avanço da medicina na neurociência, cresce o interesse em desenvolver novos fármacos que atuem no sistema nervoso central (SNC) para mediar ou inibir a dor, a principal queixa dos pacientes nos consultórios médicos na atualidade, dada a sensação desagradável de desconforto que provoca no ser humano, associada a um processo destrutivo, expressa por meio de reação orgânica e/ou emocional (GROPEN, SOBRAL, TOSI, 2008).

Os neurotransmissores são mediadores químicos que, após serem liberados em resposta à despolarização cálcio dependente, atuam sobre receptores localizados em células pós ou pré-sinápticas. Conforme esse critério, diversas substâncias podem ser consideradas neurotransmissores como, por exemplo, catecolaminas, indolaminas, acetilcolina, imidazolaminas, purina, peptídeos e aminoácidos; (BEAR et al., 2002). As pequenas moléculas dos aminoácidos são amplamente distribuídas no sistema nervoso central pelos neurotransmissores e aparecem em altas concentrações em todas as células, provavelmente devido a sua participação em processos bioquímicos, como a síntese protéica e o metabolismo intermediário. Os principais aminoácidos que atuam como neurotransmissores são: glutamato e aspartato (excitatórios) e ácido gamaaminobutírico (GABA), glicina, taurina (inibitórios) (BLOOM et al., 2006). Figura 1.

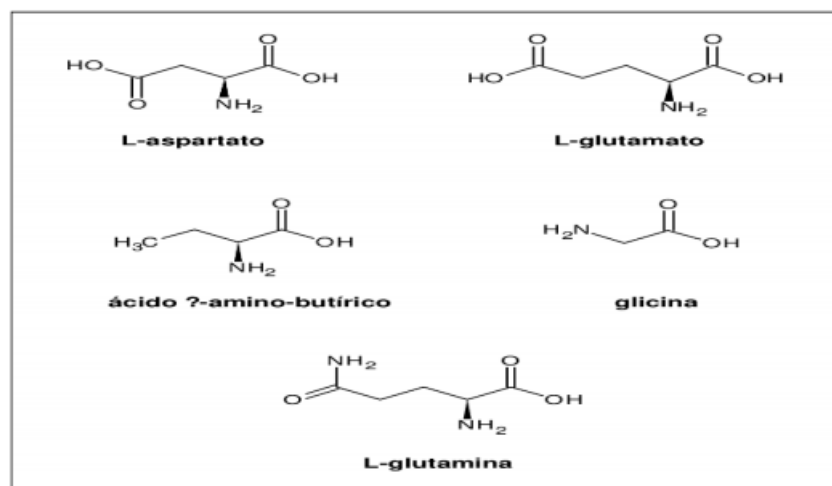


Figura 1: Estruturas de aminoácidos excitatórios, aminoácidos inibitórios e precursor de glutamato no SNC.

Os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, presentes em concentrações elevadas no tecido cerebral, estão envolvidos em mecanismos como: plasticidade sináptica, memória, aprendizado, formação de redes neuronais durante o desenvolvimento; e em distúrbios neurológicos e psiquiátricos, tais como: isquemias, acidente vascular cerebral (AVC), epilepsias (convulsões), esclerose múltipla, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade em adultos, esquizofrenia, etc. Além da função de transmissão neuronal, estas substâncias são também precursoras de outras moléculas

importantes e estão envolvidas em importantes funções metabólicas, o glutamato correspondendo a 75% das transmissões excitatórias. (BERGINK et al. , 2004)

A determinação do aminoácido glutamato no líquido cefalorraquidiano (LCR) é de ordem micromolar a sub-micromolar. Para quantificar esses níveis com exatidão e precisão é necessário o emprego de ensaios altamente sensíveis e seletivos, visto que esta pequena molécula não apresenta características eletroativas e nem fluorescentes, ou seja, não há absorbância na região do ultravioleta / visível. Uma estratégia comumente empregada para determinação de aminoácidos é a derivatização em pré-coluna com posterior separação por CLAE em fase reversa (coluna C18) acoplado a detector UV ou fluorescência (SHAH et. al., 1999).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação, no qual os constituintes de determinada amostra interagem com um solvente (fase móvel), o qual é eluído por uma bomba de alta pressão através de uma coluna cromatográfica (fase estacionária) (COLLINS, 2006).

A análise de aminoácidos por CLAE com detecção no UV-visível é uma das técnicas mais utilizadas para análise metabólica de um material biológico que contenha proteínas, peptídeos ou mesmo aminoácidos livres, por ser um método qualitativo e quantitativo. A caracterização geralmente é feita comparando-se o perfil dos espectros de absorção no UV e o tempo de retenção (t_R), com os padrões autênticos ou com padrões específicos da amostra analisada. Para a análise de aminoácidos em uma determinada amostra biológica é necessário um preparo prévio que consiste normalmente em duas etapas sequenciais: hidrólise (digestão ácida do material) e derivatização que vai possibilitar, através do acoplamento com um cromóforo ou fluoróforo, a identificação do aminoácido em determinadas condições. Após essas etapas, o material é aplicado no sistema de cromatografia e o resultado é comparado com um padrão de aminoácido de concentração conhecida (HUBER, ALMEIDA e FATIMA, 2008).

O objetivo geral é avaliar um método analítico rápido e eficiente para a quantificação de glutamato liberado no líquido de rato após administração de uma substância alérgica como a formalina, bem como desenvolver um método de validação que esteja de acordo com órgãos como INMETRO e ANVISA.

METODOLOGIA

Os procedimentos foram conduzidos no Centro de Pesquisa em Produto e Desenvolvimento (CEPPED), na Universidade Luterana do Brasil (ULBRA /Canoas).

A metodologia empregada baseia-se nas referências bibliográficas consultadas, foi escolhido o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e derivatização do aminoácido Glutamato a fim de que pudesse ser detectado por CLAE-UV.

Os reagentes e solventes utilizados foram: acetonitrila, etanol, trietilamina, acetato de sódio, L-glutamato, água deionizada Milli-Q, bicarbonato de sódio, fenilisotiocianato.

As soluções preparadas para o processo foram:

Solução derivatizante: (etanol: trietilamina: água Milli-Q: fenilisotiocianato), na seguinte proporção (7:1:1:1 v/v/v/v).

Solução diluente: Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 5mM pH 7,4 (ajustar com Ácido Fosfórico). A relação foi de 190µL Na_2HPO_4 : 10µL AcCN.

Preparação da solução padrão: 20mg de glutamato ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$) 25mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,5 molar. Todos os processos são filtrados em filtro millipore 0,45 µm e desgaseificados em ultrassom.

Evaporação, derivatização e diluição do aminoácido Glutamato: Transferiu-se uma alíquota de 50 µL da solução padrão para um balão volumétrico de 25mL com uma solução de bicarbonato de sódio 0,5M. A concentração da solução obtida foi de 108 nmol/mL e pH aproximadamente 8. Uma alíquota de 50 µL desta solução foi colocada em um eppendorf e

evaporada em banho-maria a 37° C, sob atmosfera de gás nitrogênio. A solução derivatizante (20 µL) foi então adicionada ao eppendorf da solução padrão, homogenizada e mantida 20 minutos em local isento de luz. A seguir foi evaporada em banho maria a 37° sob atmosfera de nitrogênio. Dessa forma obteve-se o glutamato (derivatizado e seco) e adicionou-se 800 µL da solução diluente. Foram preparadas seis concentrações, diluídas com água Milli-Q, para a construção da curva analítica. Para a construção da curva analítica foram injetados 20µL de cada amostra, em duplicata, o tempo de corrida foi de 15 minutos.

A coluna utilizada foi Ascentis C18, 5µm com dimensões de 25cm X 4,6 mm. Preparou-se a seguinte fase móvel:

-Fase móvel A: Solução Tampão: acetato de sódio trihidratado 0,23M e 2,5% de AcCN, pH 7,45, ajustado com ácido acético. (940:60, Tampão/ AcCN).

-Fase móvel B: Acetonitrila e água Milli-Q (60:40 v/v). Ambos são filtrados e degaseificados no Ultrassom por 40 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados alcançados até o presente momento mostram que a resposta do detector foi diretamente proporcional as concentrações de glutamato diluídas na faixa de 2µg/mL a 0,333 µg/ml, a seguinte equação da reta $y = 61204x + 84045$ e coeficiente de correlação igual a 0,9991 foram obtidos. Mostrando eficiência na detecção do aminoácido derivatizado e um coeficiente de correlação próximo a 1. Entretanto foram notados dois pontos de diluição fora da proporcionalidade, que serão repetidos para ampliar a faixa de trabalho.

Atualmente os dados ainda estão sendo coletados, a fim de dar continuidade para um possível método de validação, aumentando o número de amostras e realizando as análises em triplicata com o objetivo de aumentar a credibilidade dos resultados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o trabalho realizado previamente, já 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 utilizada. A metodologia empregada na derivatização do aminoácido glutamato com fenilisotiocianato levou a formação com êxito do derivado feniltiocarbamil deste aminoácido tornando possível sua identificação por CLAE-UV. A preparação da amostra para quantificação e o método empregado, que apresenta um curto tempo de análise, torna esta técnica adequada para análise de outros aminoácidos excitatórios e inibitórios que participam de diversas funções metabólicas, não apenas a dor, mas também distúrbios como a menopausa.

A partir das técnicas utilizadas e leituras de referência, será possível determinar o glutamato em diferentes amostras, bem como efetuar a validação do método.

AGRADECIMENTOS

À orientadora prof^a. Dra. Dione Silva Corrêa pela orientação, disponibilidade, confiança e o conhecimento proporcionado. À FAPERGS pelo auxílio através de bolsas de iniciação científica. À disponibilidade do laboratório CEPPEP, na ULBRA Canoas.

Referências

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências, **Desvendando o sistema nervoso central**, 2^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

BLOOM, F. E. **Neurotransmission and the Central Nervous System**. In: BRUNTON, L. L.; J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). *Godman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11^a ed. New York: Mcgraw-Hill, p. 317-339, 2006.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J. G. M.; WESTENBERG, H. G. M.; **Glutamate and Anxiety**. European Neuropsychopharmacology, v. 14, p. 175-183, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. **Fundamentos de cromatografia**. Editora Unicamp. v.1, p. 465, 2006.

GROPEN, C.; SOBRAL, D.C.; TOSI, D.D.T. **Dor em Pacientes com Sequela de acidente vascular cerebral (AVC)**. As Bases Clínicas do Diagnóstico Neurofuncional e Tratamento de Reabilitação. Brasília: Medbook Press, 2008.

SHAH, A. J.; CRESPI, F.; HEIDBREDER, C. **Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value**. Journal of chromatography, v. 781, p. 151-163, 2002.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. **Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos**. Ver. Química Nova, v.31, n.5, 1170-1179, 2008.