



## ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS NA DETERMINAÇÃO DE GLUTAMATO

Fernanda Nunes Vilanova<sup>1</sup>  
Dione Silva Corrêa<sup>2</sup>

### Resumo

Um método espectrofotométrico UV-Vis para quantificar Glutamato está sendo desenvolvido, alternativa para substituir métodos por HPLC, sendo o primeiro um equipamento mais robusto e economicamente mais viável. O aminoácido glutamato é derivatizado para acoplamento de um cromóforo, tornando-se possível a leitura na faixa do ultravioleta (UV), em 265 nm. A faixa de trabalho de 0,816 nmol.mL<sup>-1</sup> à 20,41 nmol.mL<sup>-1</sup> foi analisada, obtendo-se uma curva com linearidade de 0,997. As amostras de matrizes complexas como licores, quando derivatizadas, apresentam boa visualização no espectrofotômetro; os resultados indicaram aumento nas atividades dos neurotransmissores em ratos fêmeas *Wistar* induzidas a menopausa, através de ovariectomia, obtendo respostas positivas ao tratamento com omega 3, sendo o glutamato detectado na faixa de micromol. Entretanto encontram-se dificuldades em quantificar os níveis deste aminoácido, visto que o reagente de derivatização fenilisotiocianato absorve na mesma faixa do feniltiocarbamil. Tem-se avaliado o quanto é preciso de reagente PITC para acoplar, de acordo com a estequiometria da reação, sem o emprego de excesso deste reagente, que se tornou um interferente, o que tornaria possível subtrair o efeito do branco, otimizando o método; bem como viabilizar o uso de outros reagentes derivatizantes.

Palavras chave: L-glutamato; fenilisotiocianato; UV-Vis.

### 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 (GROPEN, SOBRAL, TOSI, 2008).

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. 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. (CUNNINGHAM et al., 1994; SHAH et al., 2002; BERGINK et al., 2004).

Diversas doenças neurodegenerativas estão relacionadas com as alterações nos níveis cerebrais de determinados aminoácidos neurotransmissores (LIPTON, 1994). Desta forma, a quantificação de glutamato em modelos animais pode oferecer uma ferramenta adicional para o desenvolvimento de novos fármacos. (SHAH, et al., 1999). Pouco se sabe

---

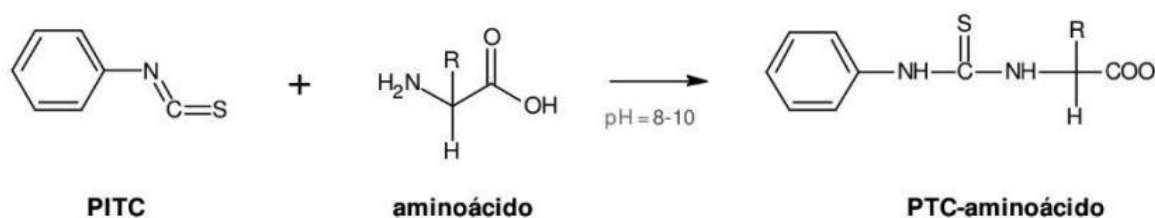
1 Aluno do curso de graduação Química Industrial – Bolsista PIBIC/FAPERGS – vilanova.fe@gmail.com

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

sobre como os fármacos produzem efeitos por todo o cérebro, ativando ou bloqueando a ligação neuronal através da abertura dos canais de íons pelos aminoácidos neurotransmissores (BARREIRO, 2008).

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 absorvância na região do ultravioleta / visível (ROWLEY, 1995) 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). O fenilisotiocianato (PITC), que também tem sido muito estudado nas análises de aminoácidos com derivatização em pré-coluna, possui a vantagem de reagir com aminas primárias e secundárias (HEINRIKSON; MEREDITH, 1984). O processo de derivatização consiste no acoplamento do derivativo feniltiocianato ao NH<sub>2</sub> do aminoácido, conforme a figura 1.

Figura 1: Derivatização de aminoácido.



Nenhum método analítico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta visível (UV-vis) foi relatado para determinação de glutamato. Esta técnica é reconhecida pelas vantagens relacionadas ao seu uso, sendo utilizada principalmente no controle de qualidade na indústria farmacêutica, que exige rapidez e confiabilidade nos resultados. Além disso, possui baixo custo operacional, sendo de fácil utilização e produz resultados de interpretação bastante simples. Paralelamente, a necessidade de proporcionar qualidade às medições químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Logo, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis, o mesmo deve passar por uma avaliação denominada validação.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o desenvolvimento e transferência de um método. a investigação e otimização dos métodos e práticas aplicadas (ALVES, 2010).

O principal objetivo do trabalho é desenvolver um método analítico rápido e confiável, por espectrofotômetro UV-Vis, em alternativa as técnicas de cromatografia líquida, para realizar as medidas de glutamato no líquido de roedores e comparar o nível deste neurotransmissor com o comportamento depressivo e ansioso de animais menopausados.

## METODOLOGIA

Uma solução padrão de Glutamato foi preparada pesando-se 25 mg de L-Glutamato avolumando-se até o menisco de um balão de 25mL com solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 mol.L<sup>-1</sup> . A

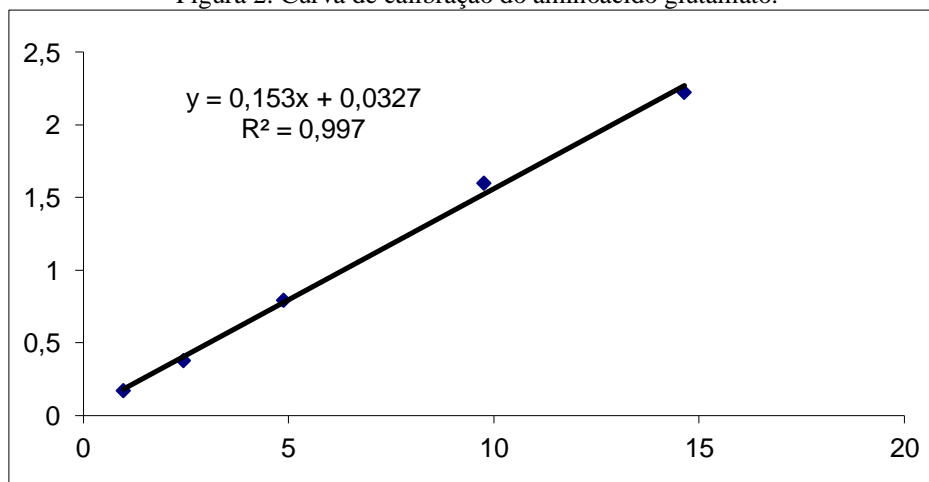
solução foi ultrassonicada por 5 minutos. Retirou-se uma alíquota de 60 µL da solução padrão e transferiu-se para um eppendorf, no qual foi seco em banho-maria a 37°C com fluxo de N<sub>2</sub>. A amostra seca e foi derivatizada conforme descrito previamente por Henrikson e Meredith, 1984. A reação foi feita misturando-se etanol, trietilamina, água destilada e fenilisotiocianato na proporção 7:1:1:1 foi chamada de solução derivatizante. Foram adicionados 60 µL de solução derivatizante, o qual reagiu por 20 minutos na ausência de luz. Novamente foi seco em banho maria, na mesma temperatura, com fluxo de N<sub>2</sub>. Na amostra seca foram adicionados 2mL de solução diluente, composta por uma solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5mmol.L<sup>-1</sup> com Acetonitrila na proporção 19:1 (v/v), e 8mL de água destilada. A partir dessa solução mãe de concentração 40,82 nmol.mL<sup>-1</sup>, foram obtidos a faixa de trabalho de 0,816 nmol.mL<sup>-1</sup> à 20,41 nmol.mL<sup>-1</sup>.

Os ratos fêmeas foram submetidos a testes comportamentais e a medidas de líquido cefalorraquiano, a partir de experimentos que induziam a menopausa. Foram divididas em grupos onde parte foi submetida a ovariectomia, tratada com ômega 3 e água (placebo). Outra parte foi simulada a ovariectomia sem retirada do ovário, apenas manipulação do mesmo, para o estresse pós operatório, também uma parte tratada com ômega 3 e outra com água.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados até o momento mostram o máximo de absorvância do aminoácido derivatizado em comprimento de onda de 265 nm. A faixa de trabalho apresentada mostrou-se linear, conforme o gráfico dispersivo, apresentando regressão linear de 0,997, considerado satisfatório, conforme a figura 2. Ao realizar a leitura do branco verificou-se que há uma alta absorvância no mesmo comprimento de onda da amostra, dificultando a quantificação do aminoácido. Desta forma não sendo possível admitir que os descontos dos valores de branco sejam feitos, pois em uma absorvância há uma parcela de feniltiocarbamil e outra do fenilisotiocianato, não sendo possível a detecção destes separadamente. Entretanto concluiu-se que a análise qualitativa é eficiente, pois a amostra que é acoplada pelo cromóforo absorve mais e é proporcional a sua concentração, por isso obtém-se uma curva de calibração e também foi possível analisar amostras de líquido, pois se admite o mesmo erro sistemático para a curva de calibração e para as amostras. Os estudos que estão em processo visam concluir o quanto de reagente é preciso para derivatizar toda a amostra, para que o excesso não seja absorvido, dessa forma obtendo-se o valor de absorvância esse valor real de absorvância é possível descontar o branco e quantificar os teores de glutamato.

Figura 2: Curva de calibração do aminoácido glutamato.



Ao avaliar a robustez do método constatou-se que dentro das condições avaliadas como ausência de luz e presença de luz, conforme visto no teste de estabilidade, ou tempo de análise até 20 minutos com presença de luz, conforme a literatura. Foram verificadas, com intervalo de 20 minutos, as absorvâncias da concentração de  $4,08 \text{ nmol.mL}^{-1}$ , com ausência de luz, até 80 minutos desde a derivatização, observando-se que não há variação significativa entre as leituras. Ao expor a amostra a luz, rapidamente há uma diminuição de concentração pela degradação da amostra, concluindo que há degradação pela presença de luz.

Na dosagem de glutamato, o grupo falso operado apresentou quantidade significativamente maior desse neurotransmissor quando comparado aos demais grupos. Esse resultado sugere que o ômega-3 foi capaz de aumentar a quantidade do neurotransmissor glutamato, apenas no grupo falso-operado. Na dosagem de glutamato, sugere-se que o mesmo melhora a memória e cognição apenas em um dos grupos, os que foram tratados com ômega 3. Não foi capaz de inibir dificuldades de memória e cognição - sintomas típicos da menopausa - nos grupos que fizeram a ovariectomia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados parciais obtidos permitiram fazer uma análise qualitativa do aminoácido glutamato em amostras de liquor de roedores, podendo-se traçar a partir disto um perfil comportamental destes em relação à menopausa e ao uso de ômega 3.

O método empregado apresenta dificuldade em análises quantitativas, pois o reagente derivatizante empregado tem uma alta absorvância na mesma faixa do espectro, porém sendo viável a técnica por espectrofotômetro UV-Vis para a análise qualitativa.

Atualmente o projeto está focado em minimizar os efeitos do reagente, para enfim quantificar o aminoácido de forma confiável, dessa forma ao aplicar o cálculo de absorvância molar ao método desenvolvido, será possível relativizar qualquer resultado gerado em absorvância, gerando agilidade e flexibilidade ao setor de Desenvolvimento Analítico.

## REFERÊNCIAS

ALVES, L.D.; ROLIM, L.A.; FONTES, D. A. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no uv-vis. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 9, 1967-1972, 2010

BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, CARLOS A. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, 2ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2008.

CUNNINGHAM, M. D.; FERKANY, J. W.; ENNA, S. J. Excitatory amino acids receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Rev. Life Sciences**, v. 54, p. 135-148, 1994.

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.

HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino Acid Analysis by Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, 136, p. 65-74, 19

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **New England Journal Medical**, v. 330 , p. 22, 1994

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