



DETERMINAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLUTAMATO POR CLAE/UV

Cassiano Machado¹, Fernanda Nunes Vilanova², Dione Silva Corrêa³

¹Aluno do curso de graduação em Química indústria – Bolsista PIBIC/FAPERGS – cassianomachado2011@hotmail.com

²Aluna do curso de graduação em Química Industrial – Bolsista PIBIC/FAPERGS – vilanova.fe@gmail.com

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

INTRODUÇÃO:

Para a quantificação do glutamato, é comumente usada derivatização, e posteriori separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV) em fase reversa (Coluna C18), técnica amplamente difundida com vasto campo de aplicação, por determinar aminoácidos de forma rápida e com alta sensibilidade.

Este trabalho tem por objetivo geral testar a eficiência de um método analítico (CLAE/UV) para a determinação do glutamato liberado no líquor 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.

Método 1:

Solução padrão: pesagem de 0,05 g de L-Glutamato, avolumado em balão volumétrico de 25 mL com solução de NaHCO₃ 0,5 M. Solução foi deixada por alguns instantes no ultrassom para homogeneizar.

Solução diluente, Na₂HPO₄ à 10% de ACN, na relação 190 µL : 10 µL: pesagem de 0,0705 g de Na₂HPO₄ em balão volumétrico de 100 mL, posteriormente dissolvidos com água Milli-Q. Adicionou-se cerca de 6 mL de ACN.

Solução derivatizante: em um béquer de 10 mL, adicionou-se 350 µL de etanol, 50 µL de água Milli-Q, 50 µL trietilamina e 50 µL fenilisotiocianato.

Secagem e derivatização da amostra: 60µL da solução Padrão e 440 µL da solução de NaHCO₃ 0,5 M foram depositados dentro de um viel, formando a solução Trabalho. 60 µL dessa solução foram depositados dentro de um eppendorf e mantidos em banho-maria à 37 °C sob fluxo de nitrogênio durante 10 minutos. Derivatizou-se a amostra e após 20 minutos sem contato com luminosidade, a mesma foi posta novamente em banho-maria com fluxo de nitrogênio.

Ao eppendorf com a amostra derivatizada, adicionou-se 2 mL de solução diluente, transferindo para balão volumétrico 10 mL, completado com a solução diluente, dando origem à solução Mãe. Seguiram 6 diluições com suas respectivamente concentrações, todas feitas em balões de 5mL, envoltos em papéis alumínio para evitar degradações, sendo completados com água Milli-Q.

Método 2:

Solução padrão: pesagem 15,1x10⁻⁴ g de L-Glutamato, dissolvido em 100 mL de ácido clorídrico 0,1 M.

Preparou-se solução contendo etanol, água Milli-Q e trietilamina nas proporções (2:2:1 v/v/v). Colocou-se em um eppendorf, 40µL da padrão de glutamato e 20µL da solução contendo EtOH, H₂O e TEA. Derivatização igual ao primeiro método. Secagem com fluxo de nitrogênio à 60 °C.

A amostra já derivatizada e seca 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.

Método 3:

Solução Estoque: Pesou-se 0,025 g de L-Glutamato para dissolver em um balão de 25mL com bicarbonato de sódio 0,5 M. Desta solução, adicionou-se 60 µL em eppendorf. Processo de secagem, com fluxo de nitrogênio, e derivatização foram mantidos os mesmos.

RESULTADOS:

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:

Os possíveis erros para a falha nos testes vão desde a validade dos reagentes utilizado, até o tempo de exposição das amostras às condições ambientes, além de fatores como condicionamento das soluções padrão ou estoque do aminoácido e falta de manutenção do equipamento. A tendência é de que os testes prossigam visando uma futura validação de método e sua utilização para determinar o glutamato em demais amostras. 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.

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.