



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, SP

AVALIAÇÃO DO COMPOSTO ANTIOXIDANTE GLUTATIONA PRESENTE EM MELÃO UTILIZANDO A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

THAIS A.M.F. dos **SANTOS**¹; MARTA G. da **SILVA**²; VERA S. **NUNES da SILVA**³; GLAUCIA M.
PASTORE⁴; ENIELUCE S. B. **PARRA**⁵

RE 15212

RESUMO

O estudo foi direcionado para a implementação de metodologia analítica na quantificação do composto antioxidante glutationa reduzida e oxidada presente nas amostras de melões dos tipos Amarelo, Honey Dew White (Orange), Pele de Sapo (melão Verde), Gália e Cantaloupe, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foram testados parâmetros de extração dos compostos, pré-tratamento e derivatização, composição de fase móveis e pH, detectores, comprimentos de onda de detecção, colunas, armazenamento adequado dos analitos, visando a preservação e estabilidade dos mesmos.

Palavras-chaves: glutationa, melões, compostos antioxidantes, cromatografia líquida

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Biomedicina, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP, thaisalinee_@hotmail.com

² Colaboradora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP

³ Colaboradora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaboradora: Pesquisadora, FEA/UNICAMP, Campinas-SP

⁵ Orientadora: Assistente Técnico a Pesquisa, CCQA/ITAL, Campinas-SP, eni@ital.sp.gov.br



ABSTRACT

The study was directed to the implementation of analytical methodology in quantifying the reduced glutathione antioxidant compound and oxidized present in samples of melons Yellow types, Honey Dew White (Orange), Piel de Sapo (green melon), Gaul and Cantaloupe, through technical of High Performance liquid Chromatography (HPLC). Extracting parameters were tested compounds, pretreatment and derivatization, mobile phase composition, and pH detector, detection wavelength, column, adequate storage of the analytes in the preservation and stability thereof.

Key-words: glutathione, melons, antioxidant compounds, liquid chromatography

1 INTRODUÇÃO

A glutationa, um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cistenil-glicina) precursor dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, está largamente distribuída em tecidos de animais, plantas e microorganismos. É encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos¹.

A principal função da glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) é proteger as células e mitocôndrias da oxidação e danos peroxidativos, sendo considerados indicadores da capacidade da célula em manter a homeostase, também mantém os grupos tióis das proteínas, reduz ligações dissulfetos induzidas pelo estresse oxidativo, neutraliza radicais livres e reduz o peróxido de hidrogênio^{2,3}.

Quando em condições normais de glutationa reduzida, indica-se que o mecanismo de detoxificação pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência e a garantia da perpetuação de diversas espécies^{3,4}.

A diminuição nos níveis de GSH implica um aumento na susceptibilidade ao estresse oxidativo, que por sua vez pode resultar excesso de produção de espécies oxidantes ou da perda das defesas antioxidantes^{5,6}.

A glutationa também está relacionada com o metabolismo do ácido ascórbico e no transporte do cobre intracelular. Também é importante para a síntese de DNA, síntese de proteínas, síntese de prostaglandinas, para o transporte de aminoácidos e ativações enzimáticas^{3,4,7}.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é consequência da respiração aeróbica. Estas espécies podem causar danos estruturais a muitas biomoléculas, entretanto, a célula possui este sistema antioxidante que compreende algumas enzimas, dentre elas a glutationa peroxidase^{1,4}.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, SP

No Brasil, os principais cultivares de melão são do grupo Inodorus do tipo Amarelo. O fruto é consumido in natura, como ingrediente de saladas com frutas ou outras hortaliças, e na forma de suco^{8 9}.

Dentre os benefícios do melão, principalmente frutos com polpa de coloração salmão, são o suprimento total das exigências de vitaminas A e C, além de serem fontes significativas de outros nutrientes como açúcar, fibras, cálcio, iodo, potássio e fitoquímicos⁸, como por exemplo, a glutatona.

Para frutas e vegetais, ainda não há um método de referência definido para determinação de GSH. Entretanto, no decorrer dos anos, vários métodos foram introduzidos para determinação da GSH em amostras biológicas, principalmente a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, explorando os vários sistemas de detecção³.

Dentro deste contexto, o estudo foi direcionado para a avaliação e quantificação do composto antioxidante glutatona reduzida e oxidada pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em algumas variedades de melão tais como: melão Amarelo, Honey Dew White (Orange), Pele de Sapo (Verde), Gália e Cantaloupe.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras:

Foram analisadas 05 amostras de melões, do tipo inodoro e aromático. As amostras foram fatiadas e levadas ao liofilizador por 3 dias e após o processo, foram peneiradas; também foram utilizadas amostras de melões in natura, fatiadas e homogeneizadas em um mix, ambas armazenadas em geladeira para evitar degradação e fora do alcance de luz.

2.2 Método analítico:

O método empregado na determinação da glutatona em melão foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase estacionária empregada foi a ODS (octadecilsilicagel). Utilizou-se a cromatografia em fase reversa, uma vez que a derivatização com agentes marcadores gera adutos hidrofóbicos. Foram testados artigos contemplando detectores de UV (arranjo de diodos), utilizando o derivatizante DTNB – ácido nitrobenzóico, e Fluorescência com o uso do derivatizante OPA - orto-ftalaldeído^{3 4 6 10 11 12 13 14 15}.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos foram focados na separação e boa resolução dos analitos glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) e adotados, inicialmente, os artigos de BUWALDA¹¹ e BOLTER¹⁰ (aplicados em plantas). Foram utilizados na extração dos padrões analíticos 2mL sol.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, SP

3mM de tampão fosfato pH 6,9 + 0,1mL 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB). Agitou-se, aguardando 02 min para a reação, verificou-se pH~4,0. Filtrou-se em membrana de 0,45µm e injetou-se no cromatógrafo acoplado com detector de arranjos de diodo.

Foram injetados os padrões individuais de GSH, GSSG e a mistura dos dois analitos derivatizados e sem derivatização. Cromatogramas apresentaram-se ruins, de baixa resolução e difícil identificação.

Realizou-se novas extrações com alterações nos reagentes segundo artigo DERMIKOL⁵: 20µL de padrão + 230µL H₂O + 750µL sol 10mM OPA, agitou-se, aguardou-se 5min em temperatura ambiente, após adicionou-se 40µL de sol. 0,5M HCl, agitou-se, filtrou-se em membrana de 0,45µm e injetou-se no cromatógrafo acoplado com detector de fluorescência.

Alterações nas concentrações das fases móveis tamponadas, mudanças do solvente acetonitrila para metanol com novas tentativas de injeção. Ainda, mudanças no gradiente e vazão das mesmas. Muitas outras tentativas foram efetuadas, com inúmeras injeções e mudanças cromatográficas diversas. Sem apresentarem boa performance.

Enfim, uma análise com boa performance dos padrões de glutathiona reduzida e oxidada foi obtida. Picos separados e bem resolvidos extraídos com sol. H₃PO₄ 2% e sol. EDTA 0,3mM e sem o uso de derivatizantes foram injetados. Os picos dos analitos GSH e GSSG separados e bem resolvidos foram mostrados. Mais pesquisas foram efetuadas para otimização da análise visando melhorar a separação dos analitos. A troca da coluna por outra maior e alterações na concentração da fase móvel, foram os parâmetros adotados. Maior estabilidade foi observada nos extratos preparados com sol. H₃PO₄ 2%. Ficou evidenciada a importância do pH da fase móvel adotada (pH 2,50) e o comprimento de onda na detecção (200nm), que mostra a especificidade do método. Alterações mínimas deste comprimento de onda impossibilitam a detecção e quantificação dos analitos. Efetuou-se curva padrão para os analitos, como mostra a figura 1:

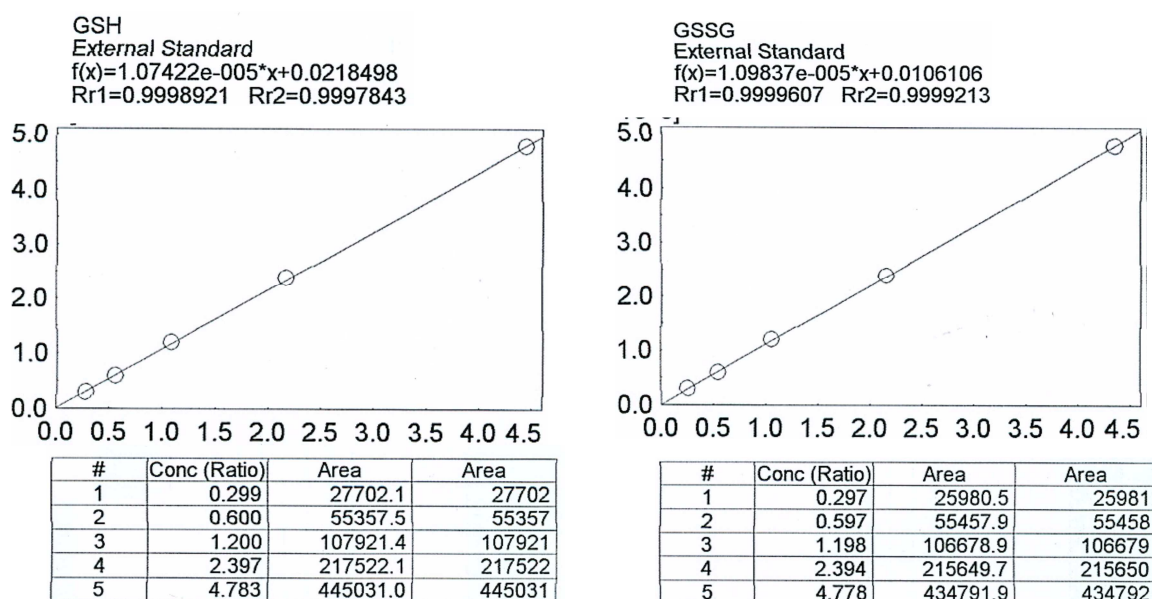


Figura 1. Curvas padrão dos analitos GSH e GSSG

Foi testada a estabilidade dos extratos dos analitos, injetando-se a mesma curva padrão por vários dias consecutivos. Após 17 dias, constatou-se perdas do analito GSH, principalmente, no ponto I da curva (ponto de menor concentração e mais instável), perda aproximada de 63%. Nos demais pontos, a perda ou degradação atingiu 17% mais ou menos. O analito GSSG é muito mais estável, degradou em torno de 4% em todos os pontos da curva, inclusive no ponto I (menor concentração).

A figura 2 mostra o cromatograma do ponto III (pto médio) da curva padrão

C:\LabSolutions\Data\Glutational\PAD_(GHS+GSSG)_pto III_(H3PO4 2%)_14_(22_12)-Kinetex_50uL-C.lcd

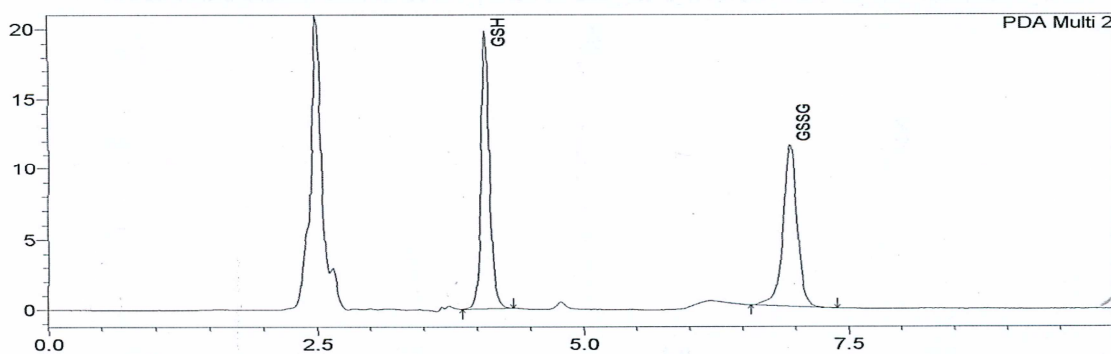


Figura 2. Cromatograma dos padrões analíticos de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG)

extraídos com sol. H_3PO_4 2% nas condições: HPLC detector diode array $\lambda = 200$ nm; coluna Kinetex C18, 250 x 4,6mm, 5 μm ; FM: H_2O acidificada pH 2,50; ACN (99:01% - v/v); vazão: 1,0 mL/min; volume inj. 20 μL .

Constatou-se que o uso da coluna maior e a diminuição da concentração de acetonitrila na fase móvel, contribuíram muito para a melhor separação dos analitos.

Verificou-se que em concentrações mais baixas os picos apresentaram baixa resolução, além da instabilidade, porém com boa separação dos analitos e em soluções mais concentradas, os picos são mais estáveis.

As amostras de melões liofilizadas e *in natura* (polpa) foram analisadas e os cromatogramas estão apresentados na figura 3.

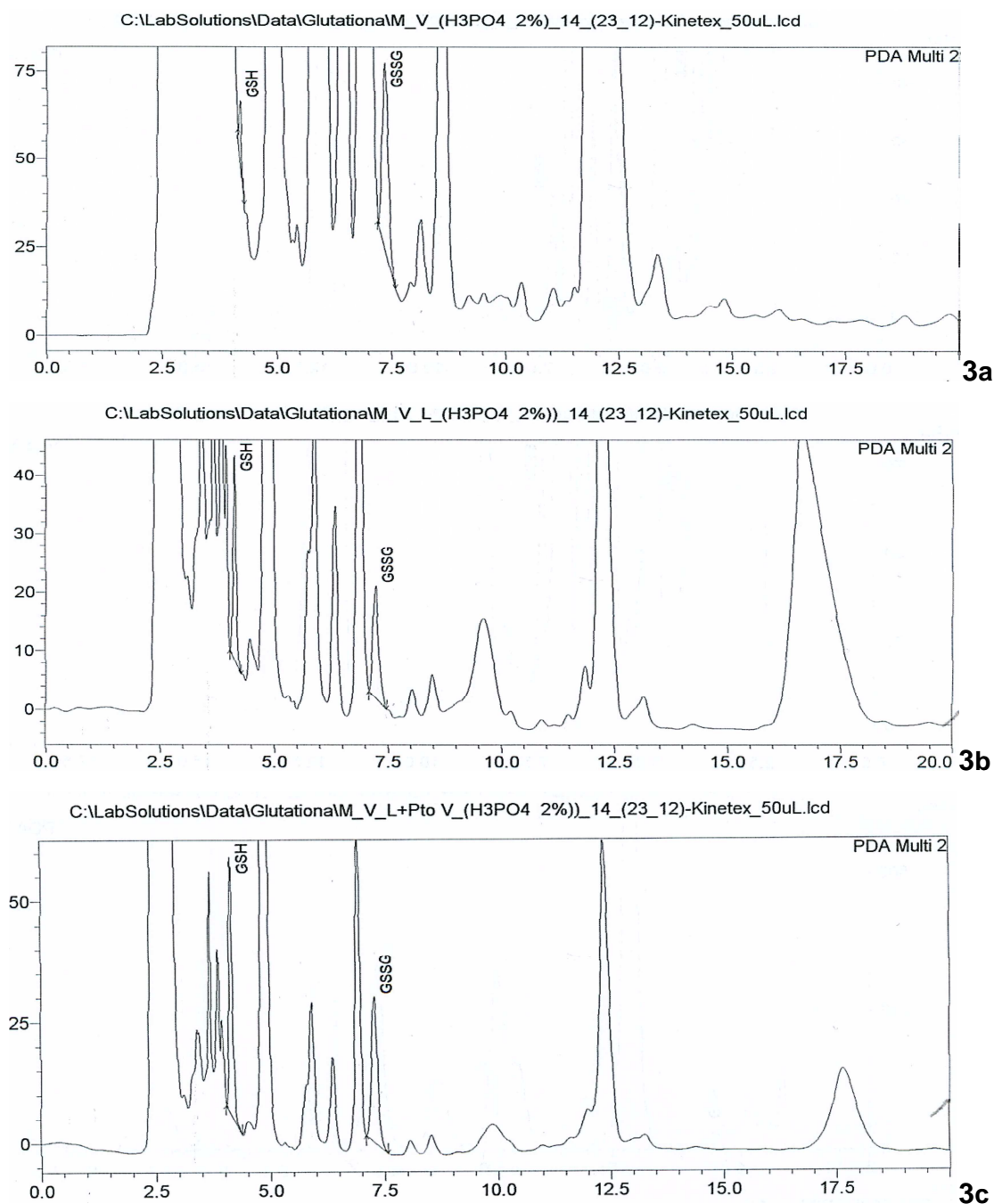


Figura 3. Cromatograma da amostra de melão Verde *in natura* (polpa) (3a), liofilizada (3b) e após adição de padrão (co-cromatografia) (3c) extraídas com sol. H_3PO_4 2% nas condições: HPLC detector diode array $\lambda = 200$ nm; coluna Kinetex C18, 250 x 4,6mm, 5 μm ; FM: H_2O acidificada pH 2,50; ACN (99:01% - v/v); vazão: 1,0 mL/min; volume injetado: 20 μL .

Os dados preliminares evidenciam a possível presença dos analitos, sendo que a amostra liofilizada apresentou picos de maior intensidade em relação à amostra *in natura*. Porém, são necessários estudos mais conclusivos para determinar as concentrações de GSH e GSSG presentes nas amostras.

Outra extração foi efetuada de acordo com artigo SCHOTT²: 0,5mL de tampão Tris-HCl 0,5M + 130µL de cada padrão 20mM + 350µL de DTNB 10mM em sol. 0,5M de KH₂PO₄, pH 8,0. Agitação por 1 min das soluções a 4°C e após 5min de repouso (geladeira) a 4°C a mistura foi acidificada com 100µL de sol. H₃PO₄ 7M e centrifugada a 6000 rpm por 10min a 4°C. Extração da amostra de melão Cantaloupe também foi efetuada.

De acordo com citação do artigo HUBER³, o derivatizante DTNB converte a GSH para GSSG, como mostram os cromatogramas apresentados na figura 4.

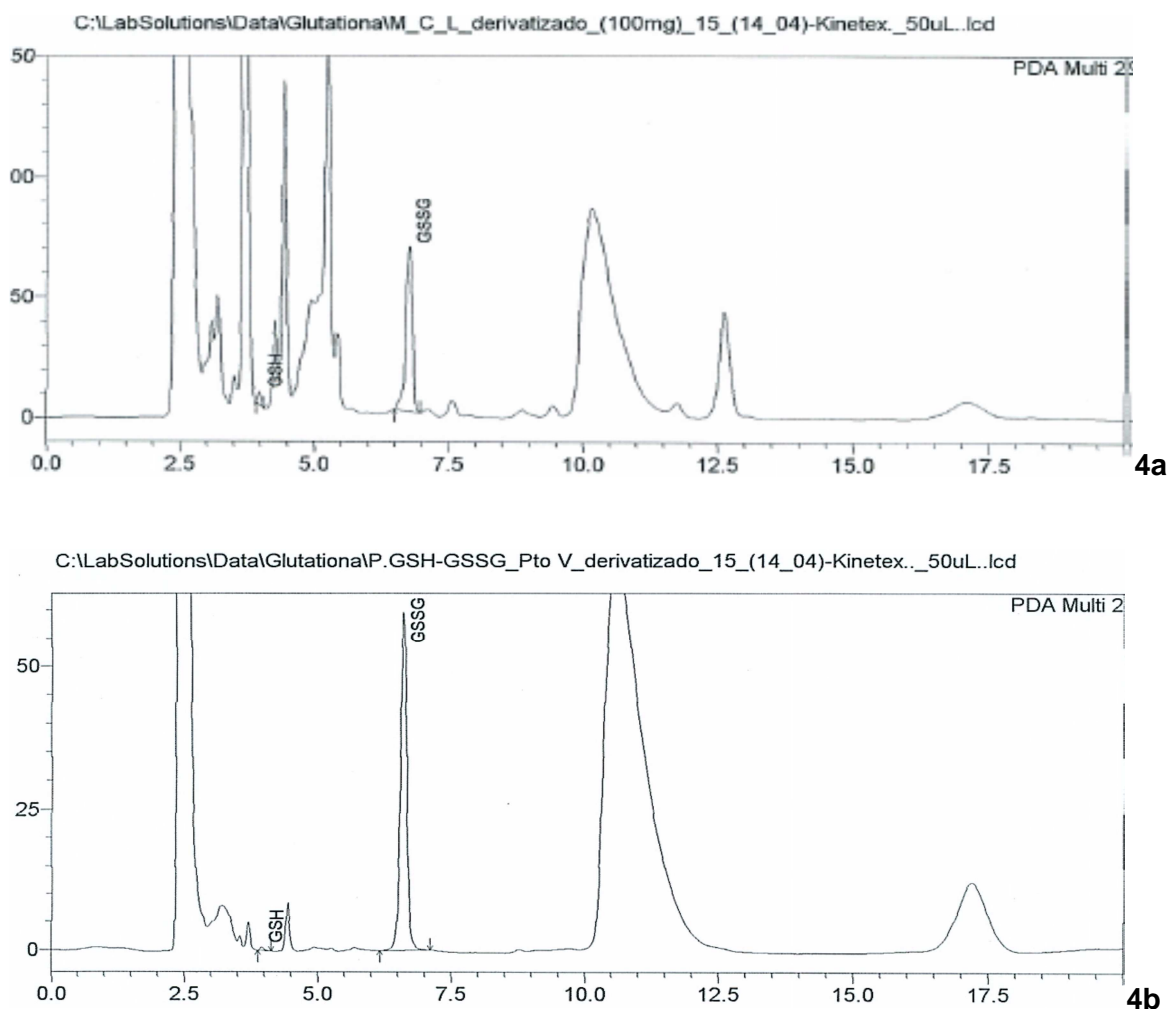


Figura 4. Cromatograma da amostra de melão liofilizada Cantaloupe (4a) e da mistura dos padrões GSH e GSSG (4b) extraídas com sol. H₃PO₄ 2% nas condições: HPLC detector diode array $\lambda = 200$ nm; coluna Kinetex C18, 250 x 4,6mm, 5µm; FM: H₂O acidificada pH 2,50; ACN (99:01% - v/v); vazão: 1,0 mL/min; volume injetado: 20 µL



4 CONCLUSÃO

Os métodos analíticos empregados evoluíram de forma significativa no decorrer do estudo, entretanto, faz-se necessário a continuação da pesquisa para obtenção de um método validado e otimizado para a determinação do antioxidante glutatona em amostras de melão.

5 AGRADECIMENTOS

À CNPq - PIBIC pela bolsa de iniciação científica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HÖEHR, N. F.; JUNIOR, L. R.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do stresse oxidativo. **Quím. Nova**, 24 (1), p.111-119, 2001.
2. SCHOTT, K. L.; CHARÃO M. F.; VALENTIN, J.; CASSOL, J.; GARCIA, S. C. POMBLUM, V. J.; BOHRER, D. Influência de desproteinizantes ácidos na quantificação da glutatona reduzida eritrocitária por CLAE-UV. **Quím. Nova**, vol. 30, n. 3, 592-596, 2007.
3. HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, Vol. 31, No. 5, 1170-1179, 2008
4. NETO, A. S. S. R. Dissertação: Glutathione, envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e detoxificação de drogas. Univ. Fernando Pessoa, Porto, 2010
5. DEMIRKOL, O.; ADAMS, C.; ERCAL, D. Biologically important thiols in various vegetables and fruits. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 8151-8154, 2004.
6. KUSMIEREK, K.; BALD, E. Reduced and total glutathione and cysteine profiles of citrus fruit juices using liquid chromatography. **Food Chemistry**, 106, p. 340-344, 2008.
7. YILMAZ, O.; KESER, S.; TUZCU, M.; GUVENC, M.; ÇETINTAS, B.; IRTEGUN, S.; TASTAN, H.; SAHIM, K. A practical HPLC method reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. **J. of Animal and Veterinary Advances**, 8 (2), p. 343-347, 2009.
8. RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. Sistema de Produção de Melão. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 2010.
9. CARVALHO, A. D. F.; OLIVEIRA, V. R.; TOSTA, A.L.; MADEIRA, N. B.; RAGASSI, C. F. Avaliação de híbridos experimentais de melão amarelo no distrito Federal em sistema de plantio direto. **Hort. Bras.**, n. 2, 2622-2629, 2010.
10. BOLTER, C.; BRAMMALL, A.; COHEN, R.; LAZAROVITS, G. Glutathione alterations in melon and tomato roots following treatment with chemicals which induce disease resistance to Fusarium wilt. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 42, p. 321-336, 1993.
11. BUWALDA, F.; de KOK, J.; STOLEN, I.; KUIPER, P. J. C. Cysteine, γ -glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. **Physiologia Plantarum** 74: 663-668. Copenhagen, 1988.
12. PARONI, R.; VECCHI, E.; CIGHETTI, G.; ARCELLONI, C.; FERMO, I.; GROSSI, A.; BONINI, P. HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total, oxidized and protein-bound glutathione in blood, plasma and tissue. **Clin. Chem.** 41/3, p.448-454, 1995.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, SP

13. RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; HERNÁNDEZ, L. E.; ABADIA, J.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A. Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homoglutathione by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts. **Analytical Biochemistry**, 356, p. 254-264, 2006.
14. TORRES, M. A.; NETO, P. C. Determinação do índice redox de glutathiona, um biomarcador de contaminação marinha em algas, utilizando HPLC acoplado a um detector eletroquímico flow-trough. **Revista Analytica**, n. 30, p. 96-104, 2007.
15. NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; ROLL, J. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorimetric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. **Analytical Biochemistry**, 179, 236-241, 1989.