

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE GLUTAMINA

Giovanna Valério da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Marcos Luciano Bruschi (Orientador), e-mail: giovanna_valerio@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Farmácia/Maringá, PR.

Farmácia (4.03.00.00-5), subárea Farmacotecnia (4.03.01.00-1)

Palavras-chave: glutamina, espectrofotometria, CLAE

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologias analíticas para a determinação de L-glutamina por espectrofotometria e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para validação das metodologias, foram determinados: especificidade, linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez. As concentrações avaliadas foram na faixa de 0,02 a 0,8 mg/mL. Foi possível constatar por intermédio da avaliação dos parâmetros, que a metodologia por CLAE foi a melhor, visto que demonstrou maior sensibilidade, reprodutibilidade e eficiência para determinação de glutamina.

Introdução

A glutamina é o principal aminoácido encontrado no plasma e no tecido muscular, sendo considerado um L- α -aminoácido não essencial. Apesar da grande reserva muscular de glutamina, os estoques endógenos podem reduzir-se, durante insultos catabólicos tais como grandes cirurgias, queimaduras extensas, câncer, septicemia e inflamação (CRUZAT et al., 2009). A demanda metabólica excede a sua capacidade de síntese, sendo necessária a suplementação pela dieta devido a sua redução nos níveis plasmáticos. Os benefícios da suplementação da glutamina podem ser o aumento da síntese de glutathiona, potencializando as defesas antioxidantes; o aumento da síntese de proteínas da resposta inflamatória; a preservação da função imune, servindo de fonte energética para linfócitos e precursores de citocinas. Estudos comprovam que a suplementação oral de glutamina, promove diminuição no tempo do paciente em ventilação mecânica, no uso de nutrição parenteral e da permanência do paciente internado, reduzindo o número de infecções e conseqüentemente a queda da mortalidade (SCALISE et al., 2016). Essa suplementação exige a administração de produtos contendo glutamina com um rígido controle de qualidade, que depende da quantificação da substância na formulação. Dentre os métodos utilizados para essa análise, podem ser citadas a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (COLLINS, 2006). Assim, o

objetivo do presente projeto foi desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação de L-glutamina.

Material e métodos

Reagentes e matérias-primas

Metanol (grau de pureza 99.90%, CLAE; J.T. Baker[®]); L-glutamina (grau de pureza ≥ 99 %, padrão primário, Sigma – Aldrich[®]); Água ultra-purificada obtida em sistema Milli-Q Plus (Millipore[®]); Ninhidrina; Fosfato de sódio monobásico; Fosfato de sódio dibásico.

Desenvolvimento e validação do método por CLAE

Foi desenvolvido um método de análise por CLAE, no qual como fase móvel utilizou-se água:metanol (90:10 ; V/V) em um sistema isocrático para a determinação de GLU, essa fase móvel foi desgaseificada em banho de ultrassom (modelo Ultracleaner 1400 Unique[®]). A análise foi realizada usando um cromatógrafo modelo Prominence-i LC-2030C 3D, injetor automático com refrigeração e detector de Arranjo de Diodos (Shimadzu[®]). A fase estacionária foi composta por coluna de fase reversa C-18 modelo Shim-pack VP-ODS, 4,6 mm x 15 cm e diâmetro de partícula de 5 μ m, a 30 °C, fluxo de 0,8 mL/min, e comprimento de onda de 210 nm para detecção e determinação. O volume injetado foi de 5.0 μ L (injeção automática) e a análise foi realizada durante 5 min. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de máxima absorção da GLU, utilizando um detector UV. Foram pesados 25 mg de GLU padrão analítico em balança analítica (modelo AUW220D, Shimadzu[®]) e diluído com água ultra-purificada, sendo transferido para um balão volumétrico de 25 mL, de modo a obter uma solução-mãe (ou primária) com concentração final de 1.0 mg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL para gerar as soluções com as concentrações finais de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7 e 0,8 mg/mL. As análises foram realizadas em, no mínimo, seis replicatas.

Método espectrofotométrico direto

Para avaliar a especificidade do método, foi realizada uma análise do espectro de absorção da GLU nos comprimentos de onda de 190 a 450 nm. Na análise da linearidade, foi preparada uma solução-mãe contendo 1,0 mg/mL de GLU em água purificada e foram realizadas diluições da mesma, para obtenção das soluções padrão, cujas concentrações variaram de 0,20 a 0,70 mg/mL ($n = 7$). Em seguida, 2,0 mL de cada solução padrão do aminoácido foram colocados em cubeta de quartzo e a absorbância foi medida frente a um branco (água purificada) em espectrofotômetro no comprimento de onda específico de 210 nm.

Método espectrofotométrico indireto após reação com ninhidrina

Uma solução tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0) foi preparada pela adição de 0,69 g de fosfato de sódio monobásico e 0,70 g de fosfato de sódio dibásico

a um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com água purificada. Para a preparação do reagente de ninhidrina 1% (m/V), em um balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 0,25 g de ninhidrina e o volume foi completado com a solução tampão fosfato 0,1 mol/L. Para avaliar a especificidade do método e o comprimento de onda a ser utilizado, foram analisados os espectros de absorção de uma solução de GLU à 0,8 mg/mL após a reação com ninhidrina 1% nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm. A linearidade do método, foi avaliada por meio de uma solução-mãe 1,0 mg/mL de GLU preparada em tampão fosfato 0,1 mol/L em balão de 25 mL e foram realizadas diluições da mesma para obtenção das soluções padrão de concentrações 0,02 a 0,80 mg/mL ($n = 3$). Em seguida, alíquotas de 1,0 mL de cada solução padrão de GLU foram colocadas em tubos de ensaio e foram adicionados 1,0 mL do reagente de ninhidrina 1%. Os tubos foram fechados e colocados em equipamento de banho-maria a 100 ± 2 °C por 10 min e, após este período, foram imediatamente transferidos para um banho de gelo para parar a reação. A mistura de reação foi colocada em cubeta de quartzo e a absorbância foi medida frente a um branco (1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L e 1,0 mL de reagente de ninhidrina 1%) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

Validação

A linearidade foi avaliada a partir da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade utilizando análise de variância ANOVA. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão (s) e na inclinação da reta (S). Para a verificação da especificidade foi medida a resposta do analito na presença de suas impurezas. A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação. Para a avaliação da robustez, as absorvâncias de três soluções-mãe de GLU nas mesmas concentrações da precisão e exatidão foram medidas nos comprimentos de onda estabelecidos em ensaio, porém no método por CLAE foram alteradas condições cromatográficas como o fluxo e a temperatura, e no caso do método espectrofotométrico foi utilizado um equipamento espectrofotométrico diferente (ICH, 2005).

Resultados e Discussão

Os métodos por CLAE e espectrofotométrico direto foram válidos. Em relação linearidade as regressões foram altamente significativas e não apresentaram falta de ajuste. Os métodos foram considerados sensíveis a partir das relações pico ruído do limite de detecção e limite de quantificação. O método mais sensível foi por CLAE devido ao seu LQ que foi de 0,026 mg/mL, comparado ao LQ espectrofotométrico o qual foi de 0,056 mg/mL. Mostraram boa exatidão com recuperação média de $99,99 \pm 0,36\%$ para CLAE e de $98,46 \pm 0,65\%$ para análise espectrofotométrica, sendo, portanto a metodologia por CLAE mais exata. Os métodos propostos indicaram boa

precisão visto que os coeficientes de variação (CV) foram inferiores a 5%. Também foi avaliada a robustez das metodologias, alterando alguns parâmetros, como a temperatura e fluxo no caso da CLAE e alterando o equipamento no método espectrofotométrico direto, em relação a essas mudanças não houve alterações significativas na detecção da glutamina. O método espectrofotométrico indireto com reação de ninhidrina não se mostrou válido, visto que não atendeu ao parâmetro da linearidade, com coeficiente de determinação R^2 0,5037 e coeficiente de correlação linear de R 0,7097, sendo, portanto a regressão linear não significativa. Após a comparação dos métodos e avaliação de todos esses parâmetros, foi observado que o método por espectrofotômetro direto é uma opção eficiente, reprodutivo, com menor custo, e ainda com a vantagem da diminuição de interferentes e processos trabalhosos se comparada ao método por CLAE. Porém, a metodologia analítica por CLAE possui uma maior sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade.

Conclusões

O estudo em questão demonstrou que as metodologias por CLAE e espectrofotometria direta foram válidas, já o método espectrofotométrico indireto não se mostrou válido. Dos métodos validados, a metodologia por CLAE proporcionou separação da glutamina com alta resolução, sendo caracterizado como melhor método devido a sua alta reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade. Portanto, pode ser concluído que esses métodos analíticos validados podem ser úteis como ferramentas na determinação de glutamina em vários produtos, assegurando uma suplementação segura aos pacientes.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq-FA-UEM.

Referências

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH); **Validation of Analytical procedure: Text and Methodology**, Q2 (R1), 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Fundamentos de cromatografia**, 2006, 456p.

CRUZAT, V. F.; PETRY, E. R.; TIRAPÉGUI, J. Glutamina: Aspectos Bioquímicos, Metabólicos, Moleculares e Suplementação. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 15, n. 5, p.392-397, 2009.

SCALISE, M.; POCHINI, L.; GALLUCCIO, M.; INDIVERI, C. Glutamine transport. From energy supply to sensing and beyond. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1857, p. 1147–1157, 2016.