

APLICAÇÃO DE SULFATO DE ZINCO E DA MISTURA CITRATO DE SÓDIO-CLORETO DE ALUMÍNIO COMO AGENTES DESPROTEINIZANTES EM AMOSTRAS DE FÍGADO PARA INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA FORENSE

Cassia M. L. da Silva^{1*}, Eliani Spinelli², Silvana V. Rodrigues³

1. Doutorado da Faculdade de Farmácia (PG-CAPS) – UFF

2. Faculdade de Farmácia – UFF / Co-orientadora

3. IQ-UFF - Departamento de Química Analítica / Orientadora

Resumo:

Na investigação toxicológica a seleção do material biológico a ser coletado depende de aspectos específicos de cada caso. Na investigação pós-morte, o fígado é usualmente incluído como amostra por sua grande capacidade de concentrar os agentes tóxicos.

Devido à grande complexidade da matriz hepática, a fase de preparação da amostra assume especial importância. A proposta desse trabalho é aplicar o $ZnSO_4$ e uma mistura equimolar de $AlCl_3$ e citrato de sódio como agentes desproteinizantes em amostras de fígado.

Com o $ZnSO_4$ obteve-se $88,6 \pm 0,2\%$ de remoção das proteínas e para a mistura $AlCl_3$ -citrato $95,8 \pm 0,4\%$.

Palavras-chave: Desproteinizantes; pré-tratamento; fígado.

Apoio financeiro: FAPERJ e PROPP-UFF.

Introdução:

Dentre os aspectos importantes a serem considerados na investigação toxicológica forense temos: a via de administração do agente tóxico (p. e., oral ou parenteral), sua distribuição nos diferentes tecidos e órgãos, sua biotransformação e excreção. Em relação às matrizes coletadas após a morte, o sangue é a de maior prevalência, oferecendo como principal vantagem a possibilidade de correlação entre níveis sanguíneos e a intensidade do efeito tóxico, informação importante para interpretação dos resultados¹.

No entanto, a quantidade de sangue pode não ser suficiente para a investigação, devido à ocorrência de intensa hemorragia ou avançado estado de decomposição.

O fígado costuma ser um dos órgãos de escolha, porque neste órgão a maioria das substâncias tóxicas são encontradas em concentrações mais altas que no sangue². Porém, é uma matriz sólida de alta complexidade, tornando mais trabalhosa a tarefa de separar o agente tóxico de constituintes celulares e proteicos, em quantidade e pureza

suficientes para sua caracterização e quantificação.

A desproteíntização, é uma das estratégias utilizadas na preparação de amostras biológicas na pesquisa de fármacos e outras substâncias. Geralmente a desproteíntização é feita por precipitação das proteínas na etapa de pré-tratamento. Existem alguns métodos de desproteíntização, sendo ideal o que produzir boa recuperação do analito por ser capaz de deslocar a substância em estudo dos sítios de ligação proteicos, mesmo em elevada interação com a proteína⁵.

Como há uma grande demanda por metodologias de pré-tratamento para amostras biológicas, especialmente quando se empregam técnicas sofisticadas e sensíveis de análise, como por exemplo, LC-MS⁶, o presente trabalho busca desenvolver um procedimento de preparação de amostras de fígado, visando solucionar problemas que comumente envolvem a etapa de pré-tratamento, tais como: aumento da superfície de contato com o solvente extrator e remoção de proteínas.

Metodologia:

As amostras de fígado utilizadas no trabalho experimental foram obtidas no comércio de alimento varejista local. Todas as amostras foram previamente submetidas a dispersão enzimática por 4 h, em incubadora com agitação orbital, com 1 mL de uma solução enzimática com colagenase (1600-1700 unidades) em uma solução de tampão borato pH 9,0 e $CaCl_2$ 1 mM

Os agentes desproteinizantes submetidos ao estudo foram o sulfato de zinco e a mistura equimolar de cloreto de alumínio e citrato de sódio, aplicando triplicata em cada ensaio.

A eficiência da desproteíntização neste estudo foi avaliada por espectrofotometria pelo método de Bradford⁸, que é amplamente utilizada na dosagem de proteínas⁹, aplicando uma curva com padrão de BSA (albumina de soro bovino).

Para o $ZnSO_4$ a faixa de concentração estudada foi de 0,5 a 10% (m/v), sendo

adicionado 1 mL da solução. A influência do pH também foi avaliada.

Para a mistura equimolar foi adicionado ao homogenato 0,5 mL da solução de AlCl_3 seguida de 0,5 mL solução de citrato de sódio em um intervalo de concentração de 0,3–0,9 molar.

Após adição dos agentes desproteinizantes, promoveu-se a homogeneização por 10s em vortex, aquecimento em banho-maria por 15min (temperatura), e centrifugação por 15min a 5000rpm. O sobrenadante foi então recolhido para avaliar a eficiência do processo.

Para um ajuste fino das condições variou-se o volume do desproteinizante na concentração ideal encontrada nas condições iniciais.

Resultados e Discussão:

Com o ZnSO_4 a melhor condição ficou em 6% de ZnSO_4 , com $88,6 \pm 0,2\%$ de remoção proteica. A partir de 7% a eficiência caiu porque o zinco satura os sítios desfavorecendo a formação das ligações inter-proteicas e reduzindo a taxa de precipitação. Em pH alcalino o zinco forma um gel $[\text{Zn}(\text{OH})_2]$ e o precipitado adquire uma coloração branca, mas a eficiência da desproteinação não foi afetada pelo pH 5.

No ensaio com a mistura equimolar, as concentrações de 0,7 e 0,8 molar mostraram os melhores percentuais de remoção proteica, com os valores de $94,5 \pm 0,5\%$ e $95,8 \pm 0,4\%$, respectivamente.

A variação no volume dos desproteinizantes não gerou acréscimo de eficiência na remoção das proteínas.

Conclusões:

Para amostras de fígados submetidas a dispersão enzimática, que promovem a liquefação da amostra sólida para obtenção de um homogenato de células e constituintes da matriz extracelular, a remoção desses constituintes das amostras de fígado foi satisfatória, sendo um procedimento simples, gerando um sobrenadante aquoso que poderá ser submetido a extração líquido-líquido ou extração em fase sólida (SPE).

Referências bibliográficas

1. KRAEMER, T.; PAUL, L. D. **Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388:1415–1435, 2007.
2. SKOPP, G. **Prenalytic Aspects in Postmortem Toxicology.** *Forensic Science International*, 142: 75–100, 2004.

3. DRUMMER, O. H.; GEROSTAMOULOS, J. **Postmortem Drug Analysis: Analytical and Toxicological Aspects.** *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(2):199-209, 2002.

4. POKLIS, A. **Analytic forensic toxicology**, in KLAASSEN, C.D. *et al.* (eds): *Casarett and Doull's Toxicology*, 5th ed. New York. McGraw-Hill, cap. 31, 1996.

5. WELLS, D. **High Throughput Bioanalytical Sample Preparation: Methods and Automation Strategies** – In: *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 5, cap 6, p. 199-254, Elsevier, 2003.

6. YU, C.; PENN, L. D.; HOLLEMBAEK, J.; LI, W.; COHEN, L. H. **Enzymatic Tissue Digestion as an Alternative Sample Preparation Approach for Quantitative Analysis Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.** *Analytical Chemistry*, 76:1761-1767, 2004.

7. SPINELLI, E.; FIAUX, S. B.; DA SILVA, C. M.; NEVES, R. dos S. **Desproteinizantes catiônicos e aniônicos e novas estratégias para sua utilização no pré-tratamento de matrizes biológicas com finalidade forense.** FAPERJ-Relatório Técnico [Processo E-26/110.355/2010], 2012.

8. BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248 – 254, 1976.

9. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** *Química Nova*, 21(6): 787 – 793, 1998.