

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM
ERITRÓCITOS HUMANOS POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-UV:
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KAREN LILIAN SCHOTT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM
ERITRÓCITOS HUMANOS POR CROMATOGRRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-UV:
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO**

por

Karen Lilian Schott

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Santa Maria, RS, Brasil

2005

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-UV:
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO**

Elaborada por
Karen Lilian Schott

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr.^a Solange Cristina Garcia Pomblum
(Presidente/Orientadora)

Dr.^a Denise Bohrer do Nascimento
(UFSM)

Dr.^a Tatiana Emanuelli
(UFSM)

Santa Maria, 21 de fevereiro de 2005.

DEDICO

À Leone Zenir Antonini Schott, minha mãe e a primeira educadora e Roberto Schott, meu pai. Roberto e Josias, meus irmãos e Tia Sali. Este trabalho é o reflexo do esforço e sacrifício incondicional para oferecer-me uma boa formação.

Ao Luiz Gustavo por me apoiar com
seu amor, amizade, atenção e paciência.

À Dr.^a Solange Cristina Garcia Pomblum, por sua amizade e por seu exemplo de força, perseverança, persistência e coragem em busca do melhor possível para o ensino, pesquisa e extensão. Sobretudo, agradeço, por sua orientação e participação efetiva neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Solange Cristina Garcia Pomblum por sua orientação, confiança e estímulo durante a realização do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Denise Bohrer do Nascimento pelo suporte científico, auxiliando-me no decorrer deste trabalho.

Aos colegas de laboratório André Valle de Bairros, Ângela Maria Moro, Cristiane Portes Ribeiro, Denise Grotto, Gabriela Cristina Schmitt, Juliana Valentini, Juniara Cassol, Janisse Crestani de Miranda, Lucas Dorneles Santa Maria, Mariele Feiffer Charão, Natália Brücker, Silvia Juliane Piva e Silvana Peterini Boeira por sua disponibilidade e o seu interesse em colaborar direta ou indiretamente com os trabalhos realizados.

Aos amigos e familiares que não conviveram comigo durante esta etapa de minha vida, mas que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Em especial às tias Neusa, Irma e Eda.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelo suporte e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica pela oportunidade em realizar o mestrado.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de graduação e mestrado.

Ao CNPq pelo fomento através da concessão da bolsa.

Ao DAAD por fornecer o equipamento de CLAE-UV.

Agradeço a Deus por estar presente nos momentos difíceis e, principalmente, nos de realizações e alegrias...

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-UV: VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO

AUTORA: KAREN LILIAN SCHOTT

ORIENTADORA: Solange Cristina Garcia Pomblum

Data e Local da defesa: Santa Maria, 21 de fevereiro de 2005.

O estresse oxidativo pode ser iniciado pela diminuição do sistema de defesa antioxidante ou por uma produção excessiva de radicais livres, um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. A alteração mais significativa nas defesas antioxidantes é a diminuição na concentração da glutatona reduzida (GSH). A depleção da GSH está relacionada a estados patológicos; incluindo câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. É o principal tiol não protéico envolvido na defesa antioxidante contra produtos de biotransformação de xenobióticos e compostos deletérios formados naturalmente, como os radicais livres e hidroperóxidos. A glutatona não só protege as membranas celulares do dano oxidativo, mas também ajuda a manter os grupos sulfidrílicos de muitas proteínas na forma reduzida, mantendo sua função normal. Os radicais livres induzem a peroxidação lipídica que ocupa importante função nos processos patológicos de muitas doenças como as doenças cardiovasculares. Devido a importante função da GSH na proteção contra o estresse oxidativo e detoxificação de xenobióticos, sua disponibilidade na forma reduzida pode ser um fator essencial para a manutenção da saúde. Conseqüentemente, sua determinação em eritrócitos humanos é necessária. Assim, metodologias para a medida da GSH em amostras biológicas e sua exeqüibilidade como método de rotina em laboratórios de análises clínicas são

fundamentais. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se, recentemente, o método de escolha para a medida de GSH porque é rápido, altamente seletivo, sensível e reproduzível. Relatos recentes descrevem o uso da CLAE com detecção por fluorescência de derivados ou detecção eletroquímica de grupos sulfidrílicos, no entanto, estes detectores não são largamente utilizados como os modelos de ultravioleta-visível. Para a análise de amostras sanguíneas por CLAE, a remoção de proteínas é a etapa de *cleanup* mais importante. Neste estudo, um método foi otimizado e validado para determinar GSH em eritrócitos humanos por CLAE, eluição por gradiente, detecção ultravioleta, comprimento de onda 330 nm. A separação foi realizada em uma coluna C18 integrada a uma coluna guarda, a 39°C. A derivação pré-coluna foi realizada com ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), reagente de Ellman. Os eritrócitos foram separados, hemolisados e desproteinizados com ácido tricloroacético 15% antes da derivação. Os parâmetros analíticos avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade. O método otimizado foi aplicado em amostras de sangue de indivíduos saudáveis (grupo controle) e de pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise. A análise foi linear de 0,5 a 3,0 mM. O desvio padrão relativo para a precisão intra- e inter-dia foi menor que 10% com exatidão (bias%) menor que $\pm 10\%$ para as concentrações 0,5; 1,5 e 3,0 mM. A recuperação média de GSH em eritrócitos foi acima de 94%. O limite de detecção foi de 0,0024 mM e o limite de quantificação foi de 0,0081 mM. As amostras derivadas com DTNB mostraram boa estabilidade por um mês a -20°C . Os indivíduos saudáveis mostraram níveis de GSH semelhantes aos obtidos em trabalhos prévios. Os níveis eritrocitários de GSH dos pacientes foram significativamente aumentados ($p < 0,05$) quando comparados com os do grupo controle. Muitos dos pacientes receberam suplementação vitamínica do complexo B, 70% e eritropoietina, 75%. Os resultados demonstraram que o método otimizado é linear, reproduzível, apresenta baixo limite de detecção e quantificação e é exequível.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduate Course of Toxicology Biochemistry

Federal University of Santa Maria

QUANTIFICATION OF REDUCED GLUTATHIONE IN HUMAN ERYTHROCYTES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-UV: VALIDATION AND APLICATION

AUTHOR: KAREN LILIAN SCHOTT

Adviser: Solange Cristina Garcia Pomblum

Place and date of defense: Santa Maria, February 21th, 2005.

Oxidative stress may be initiated by a decline in the antioxidant defence system or by an overproduction of free radicals leading to an imbalance between oxidants and antioxidants. The most significant alteration in the antioxidant defence is a decrease in reduced glutathione (GSH) concentration. GSH depletion is linked to a number of disease states; including cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases. GSH is the main nonprotein thiol involved in the antioxidant cellular defence against xenobiotics and naturally occurring deleterious compounds, such as free radicals and hydroperoxides. GSH not only protects cell membranes from oxidative damage, but also helps to maintain the sulphhydryl groups of many proteins in the reduced form, a requirement for their normal function. Free radicals induce lipid peroxidation that plays important roles in the pathological process of many diseases such cardiovascular diseases. Given the role of GSH in the protection against oxidative stress and detoxification of xenobiotics, its availability in the reduced form may be a key factor in the maintenance of health. Therefore, its determination in human erythrocytes is necessary. Metodologies for measuring GSH in human biological samples and their feasibility as routine methods in the clinical chemistry laboratory are important. The high-performance liquid chromatography (HPLC)

became recently the method of choice for measuring GSH, because it is rapid, highly specific, sensitive and reproducible. Recent reports describe the use of HPLC with fluorescence detection of derivatives or electrochemical detection of the sulphhydryl groups, however these detectors are not as widely available as ultraviolet-visible models. For the HPLC analysis of blood samples, the removal of proteins is the most important cleanup step. In this study, a method was optimized and validated to determine the human erythrocyte GSH by HPLC, gradient elution, with ultraviolet detection, wavelength 330 nm. The separation was performed on a C18 column integrated with guard-column, at 39°C. Pre-column derivatization was performed with 5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB), Ellman's reagent. The erythrocytes were separated, hemolyzed and deproteinized with 15% trichloroacetic acid before the derivatization. The analytical parameters were evaluated: linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, robustness, recovery and stability. The optimized method was applied in healthy human (control group) and patients receiving hemodialysis treatment. The assay was linear from 0.5 to 3.0 mM. The relative standard deviation for intra- and inter-day precision was lower than 10% with accuracy (%bias) was within $\pm 10\%$ for the three GSH concentrations. The average recovery of GSH from erythrocytes was over 94%. The limit of detection was 0.0024 mM and the limit of quantification was 0.0081 mM. Derivatized samples with DTNB showed good stability for a month at -20°C . The method was evaluated in blood samples from healthy subjects and hemodialyzed patients. Erythrocyte GSH levels of patients were significantly ($p < 0.05$) increased when compared with control group. Many patients received vitamin supplementation, 70% and erythropoietin, 75%. The healthy subjects showed GSH levels similar to previous reports. The results demonstrated that the optimized method is linear, reproducible, provided low limit of detection and quantification, and is feasible.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Equipamentos.....	13
3.2 Reagentes e soluções.....	14
3.3 Condições cromatográficas.....	16
3.4 Fase móvel.....	17
3.4.1 Solução de fosfato de potássio monobásico.....	17

3.5 Eluição por gradiente.....	18
3.6 Amostra biológica.....	18
3.6.1 Coleta e processamento da amostra.....	19
3.6.2 Hemólise e desproteínização.....	19
3.7 Validação.....	26
3.7.1 Linearidade.....	28
3.7.2 Seletividade.....	31
3.7.3 Precisão.....	31
3.7.4 Exatidão.....	33
3.7.5 Recuperação.....	33
3.7.6 Limite de detecção.....	34
3.7.7 Limite de quantificação.....	35
3.7.8 Robustez.....	36
3.7.9 Estabilidade.....	36
3.8 Aplicação do método.....	38
3.9 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Reação de derivação com DTNB.....	40
4.2 Escolha da fase móvel e condições de eluição.....	40
4.3 Eluição por gradiente.....	41
4.4 Amostra biológica.....	45
4.4.1 Coleta e processamento da amostra.....	45
4.4.2 Hemólise e desproteínização.....	46

4.5 Validação.....	53
4.5.1 Linearidade.....	54
4.5.2 Seletividade.....	57
4.5.3 Precisão.....	58
4.5.4 Exatidão.....	60
4.5.5 Recuperação.....	60
4.5.6 Limite de detecção e limite de quantificação.....	61
4.5.7 Robustez.....	61
4.5.8 Estabilidade.....	62
4.6 Aplicação do método e análise estatística.....	66
5 CONCLUSÃO.....	69
6 APÊNDICES.....	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Relação entre GSH, selênio e enzimas envolvidas no sistema anti-oxidante.....	5
FIGURA 2 – Fluxograma do preparo da amostra para a realização da validação.....	27
FIGURA 3 – Cromatograma obtido a partir da análise de padrão aquoso de GSH 1 mM utilizando o gradiente I. Tempos de retenção: TNB 2,91; GSH 3,13; EDTA 3,75 e DTNB 7,66 minutos.....	42
FIGURA 4 – Cromatograma obtido a partir da análise de padrão aquoso de GSH 1 mM utilizando gradiente II. Tempos de retenção: TNB 5,56; GSH 7,46; EDTA 8,28 e DTNB 15,2 minutos.....	43
FIGURA 5 – Cromatograma obtido a partir da análise de padrão aquoso de GSH 1 mM utilizando gradiente III. Tempos de retenção: TNB 4,7; GSH 6,34; EDTA 7,55 e DTNB 9,87 minutos.....	44
FIGURA 6 – Avaliação da interferência do SSA na determinação de GSH através da sobreposição dos cromatogramas relativos à solução de branco aquoso e amostra eritrocitária basal após tratamento com SSA 15%.....	50
FIGURA 7 – Avaliação da interferência do TCA na determinação de GSH através da sobreposição dos cromatogramas relativos à solução de branco aquoso e amostra eritrocitária basal após tratamento com TCA 15%.....	50
FIGURA 8 – Desproteínização com SSA 15%, avaliação da perda de GSH adicionada aos eritrócitos comparando-se com as correspondentes áreas dos padrões aquosos.....	51
FIGURA 9 – Desproteínização com TCA 15%, avaliação da perda de GSH adicionada aos eritrócitos comparando-se com as correspondentes áreas dos padrões aquosos.....	52
FIGURA 10 – Desproteínização com TCA 15%, GSH adicionada aos eritrócitos e avaliação da linearidade comparando-se com as correspondentes áreas dos padrões aquosos.....	53
FIGURA 11 – Cromatogramas sobrepostos correspondentes à curva analítica com adição de padrão de GSH nos eritrócitos; nível basal, adição de 0,5 e 1,5 mM.....	55

FIGURA 12 – Demonstração gráfica da curva analítica com adição de padrão de GSH nos eritrócitos (n=5); nível basal e adição de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH.....	55
FIGURA 13 – Demonstração gráfica da curva aquosa de GSH (n=5), branco e concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH.....	56
FIGURA 14 – Demonstração da seletividade utilizando solução de padrões aquosos com outros tióis que reagem com o DTNB. Tempos de retenção: CYS 3,08; CYSGLY 3,98; TNB 4,73; GSH 6,46; HCYS 7,16; EDTA 7,58; NAC 8,89 e DTNB 9,98 minutos.....	57
FIGURA 15 – Estabilidade da GSH derivada com DTNB no sobrenadante ácido, mantida a -20°C (áreas médias±desvio padrão: nível basal 11,93±0,60; adição de 1 mM 23,21±1,33 e adição de 2 mM 31,84±1,15).....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Procedimento de derivação e remoção do excesso de DTNB.....	17
TABELA 2 – Procedimento de hemólise.....	20
TABELA 3 – Soluções ácidas testadas e suas respectivas concentrações (m/v).....-	20
.....	
TABELA 4 – Procedimento de desproteínização.....	21
TABELA 5 – Preparo dos padrões e da amostra para quantificação de proteínas, método de Bradford	22
TABELA 6 – Programa de eluição, gradiente III.....	23
TABELA 7 – Preparo do branco aquoso e amostra eritrocitária basal com SSA 15% e TCA 15%.....	24
TABELA 8 – Desproteínização com SSA 15% e TCA 15% após adição de GSH nos eritrócitos.....	25
TABELA 9 – Condições de tratamento da amostra otimizadas para a validação...	26
TABELA 10 – Condições cromatográficas otimizadas para a validação.....	27
TABELA 11 – Preparo da curva analítica com adição de GSH nos eritrócitos nas concentrações de 0 a 3 mM (n=5).....	29
TABELA 12 – Preparo da curva analítica aquosa de GSH nas concentrações de 0 a 3 mM (n=5).....	30
TABELA 13 – Programa de eluição, gradiente I.....	42
TABELA 14 – Programa de eluição, gradiente II.....	43
TABELA 15 – Aspecto do precipitado e sobrenadante observado com o uso de diferentes concentrações de MPA na desproteínização do hemolisado com diluição 1:2,42.....	47
TABELA 16 – Aspecto do precipitado e sobrenadante observado com o uso de diferentes concentrações de SSA na desproteínização do hemolisado com diluição 1:2,42.....	48
TABELA 17 – Aspecto do precipitado e sobrenadante observado com o uso de diferentes concentrações de TCA na desproteínização do hemolisado com diluição 1:2,42.....	48

TABELA 18 – Concentração de proteínas residuais, método de Bradford, após desproteinização do hemolisado (diluição 1:2,42) com SSA 15% ou TCA 15%.....-	
.....	49
TABELA 19 – Precisão intra-dia, concentrações de GSH em mM recuperadas da amostra através do método de adição de padrão (n=6).....	59
TABELA 20 – Estabilidade da GSH no sobrenadante ácido e influência do EDTA, resultado dado em área do pico cromatográfico.....	63
TABELA 21 – Concentrações de GSH, Hb e Ht em pacientes sob tratamento de hemodiálise e indivíduos pertencentes ao grupo controle.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EROs – Espécies reativas do oxigênio

ERT – Eritrócitos

GSH – Forma reduzida da glutationa

GSHPx – Glutaciona peroxidase

GSSG – Forma oxidada da glutaciona

Hb – Hemoglobina

Ht – Hematócrito

ICH – International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

mAU – Miliunidade de absorvância

MPA – Ácido metafosfórico

NaOH – Hidróxido de sódio

PSSG – Glutaciona ligada à proteína

RS – Rio Grande do Sul

SOD – Superóxido dismutase

SSA – Ácido sulfossalicílico

TCA – Ácido tricloroacético

TRIS – Tris (hidroximetilamino)-metano

UV – Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo pode resultar do excesso da produção oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes. Estas protegem os tecidos e líquidos corpóreos da lesão causada pelos oxidantes produzidos pelo metabolismo normal ou pela resposta à inflamação e doenças (Leite & Sami, 2003).

Espécies reativas do oxigênio e particularmente os radicais livres induzem à peroxidação lipídica e, conseqüentemente, ao dano tecidual. O desequilíbrio gerado no estresse oxidativo é contrabalançado, principalmente, pela glutathiona reduzida (GSH), o antioxidante mais abundante das células de mamíferos que exerce uma série de funções importantes.

A GSH participa da detoxificação de drogas, transporta aminoácidos para o ciclo γ -glutamil e é seqüestradora de radicais livres (Nozal et al., 1997). Uma importante função é a detoxificação de metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o peróxido de hidrogênio e os lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de radicais livres do oxigênio/nitrogênio (Leichtweis & Ji, 2001), gerados durante o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas impedindo, assim, o dano oxidativo de macromoléculas (Kozar et al., 2002). Um dos papéis do ciclo redox da glutathiona e enzimas que compõem seu metabolismo é o de manutenção dos baixos níveis de hidroperóxidos lipídicos, evitando danos celulares provenientes do ataque desses radicais (Rover et al., 2001).

As propriedades multifuncionais da GSH estão refletidas num interesse crescente por esta molécula como parte integrante das mais diversas investigações, incluindo mecanismos enzimáticos de regulação antioxidante, biossíntese de macromoléculas, câncer, toxicidade devido a oxigenoterapia prolongada e, mais recentemente, doença de Alzheimer, Parkinson e lesões oxidativas do DNA.

A determinação sangüínea da GSH pode fornecer importantes informações bioquímicas do balanço oxidante-antioxidante no organismo, e ao mesmo tempo, permitir correlações clínico-laboratoriais com processos patológicos nos quais a sua quantificação pode ser um indicador indireto dos níveis de lipoperoxidação.

A complexidade da matriz biológica, a instabilidade do analito e as particularidades analíticas envolvidas na análise da GSH tornam sua quantificação um problema. Assim, busca-se desenvolver métodos analíticos para a quantificação da GSH em amostras sangüíneas com elevada sensibilidade, baixos níveis de interferência, rapidez e baixo custo, aspectos importantes para viabilizar as análises.

Dentre os pontos importantes na determinação da GSH eritrocitária se encontra o tratamento da amostra. A localização intra-eritrocitária da GSH exige hemólise seguida de desproteinização, procedimento de *cleanup* da amostra. A escolha do hemolisante e do desproteinizante adequado, bem como das condições ideais para obtenção de um sobrenadante límpido que preserve a GSH são aspectos importantes na sua quantificação.

A CLAE é uma técnica analítica de separação que acoplada à detectores permite a quantificação da GSH de forma seletiva e sensível. Assim, a GSH pode ser separada de outros tióis sangüíneos e detectores ultravioleta (UV) e de fluorescência podem quantificá-la após adequada derivação, enquanto os detectores eletroquímicos não necessitam deste procedimento.

Os detectores eletroquímicos são inadequados para a análise de matrizes biológicas complexas, uma vez que o eletrodo de Au/Hg, por exemplo, perde a sensibilidade com menos de cem injeções e deve ser reconicionado (Pastore et al, 2003). Kleinman et al. (2000) observaram interferência na detecção eletroquímica da GSH quando utilizaram o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico), DTNB, como estabilizante em amostra biológica.

Os detectores de fluorescência exigem derivação da GSH e condições drásticas de reação. Por outro lado, o detector UV é o mais amplamente empregado nos laboratórios que utilizam CLAE devido à sua funcionalidade (Pastore et al, 2003) e possibilita a utilização do DTNB como derivatizante e estabilizante da GSH.

A confiabilidade em uma metodologia para a quantificação sangüínea da GSH utilizando-a como possível indicador do estresse oxidativo, requer a validação. A validação é demonstrada através dos parâmetros como linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade.

Neste trabalho, um método utilizando CLAE acoplada ao detector UV foi desenvolvido para a quantificação da GSH sangüínea. Parâmetros da validação foram demonstrados e o método foi aplicado para a quantificação da GSH em amostras de indivíduos saudáveis e de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) submetidos ao tratamento regular de hemodiálise.

Pacientes com IRC apresentam uma tendência ao desenvolvimento precoce da aterosclerose e risco aumentado de morbidade e morte por suas conseqüências cardiovasculares (Bevilacqua et al, 1995). Em pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise, o aumento do estresse oxidativo pode ser considerado como um fator de risco para acelerar a aterosclerose (Morena et al., 2002). Hirasaka et al. (2004) relataram níveis de LDL oxidado em excesso na circulação sangüínea de pacientes com IRC sob tratamento de hemodiálise.

O objetivo da quantificação sangüínea da GSH, utilizando um método confiável, reprodutível e exeqüível, reside na sua importância clínico-laboratorial para a avaliação de patologias associadas ao estresse oxidativo, bem como para o esclarecimento dos fenômenos fisiopatológicos e bioquímicos dessas doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glutathiona reduzida e sua atividade antioxidante

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, é o principal tiol intracelular livre, não-protéico, encontrado em vários tecidos biológicos. É produzida em todos os órgãos especialmente no tecido hepático, encontra-se no interior das células e dos eritrócitos em concentrações de milimolar e em baixas concentrações, micromolar, no plasma e urina (Pastore et al., 2003). Embora presente em várias formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e ligada à proteínas (PSSG), a GSH é a forma mais abundante (Nozal et al., 1997). No sangue, 99,5% da glutathiona se encontra no interior dos eritrócitos e uma pequena quantidade está associada às membranas destes (Haest et al., 1979; Mills & Lang, 1996).

A GSH é uma forma de armazenamento da cisteína, a qual participa das reações de detoxificação de xenobióticos ou é utilizada na síntese de proteínas (Hoffman et al., 1984). Suas funções fisiológicas são variadas, como regular a síntese de proteínas, modificar a atividade enzimática e proteger contra o dano oxidativo (De Vega et al., 2003).

A GSH detoxifica substâncias ou metabólitos reativos, por três caminhos: reação de conjugação catalisada pela glutathiona S-transferase, reação de conjugação através de simples reação química com o metabólito reativo e via reação de redução catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GSHPx) através da doação de um próton ou átomo de hidrogênio para metabólitos reativos ou radicais livres (Timbrell, 2000).

O grupo sulfidril livre da GSH lhe confere carácter nucleofílico, desta forma, através de reação irreversível, forma conjugados estáveis com a espécie reativa. O conjugado resultante é menos lipofílico, mais solúvel em água e pode ser excretado na urina. De acordo com o tamanho da molécula, o conjugado pode ser secretado pela bile e excretado nas fezes (Hayes, 1994).

O sistema antioxidante enzimático envolvendo GSH, GSHPx e Selênio (Se) é responsável pela defesa intracelular contra danos oxidativos causadas por espécies reativas do oxigênio (EROs) (Gillhan et al., 1997) e diminuição da lipoperoxidação. Em 1973, o Se foi identificado como um importante componente da GSHPx, que é caracterizada como uma proteína tetramérica com quatro átomos de Se por molécula. A glutathiona redutase (GSH redutase) catalisa a reação de redução na presença de NADPH, transformando a glutathiona oxidada (GSSG) em GSH para que exerça sua função antioxidante e mantenha o ciclo catalítico da GSHPx (Figura 1).

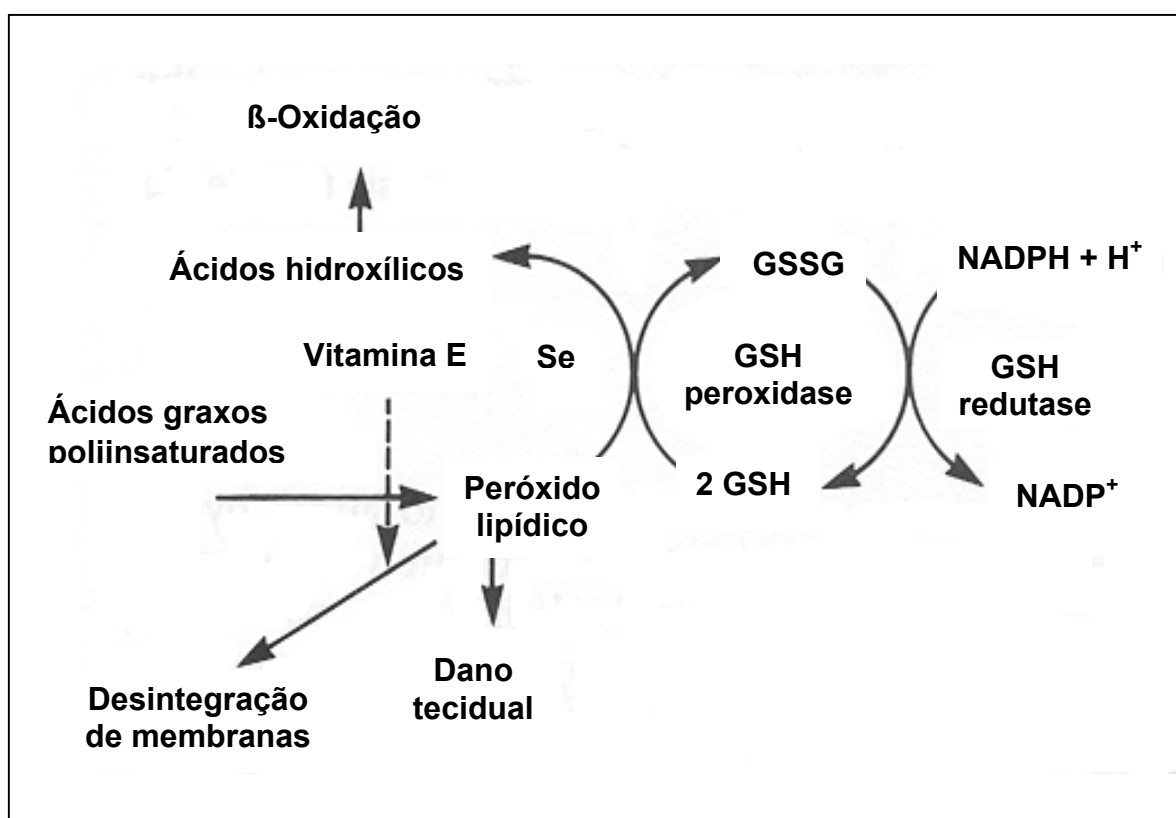


FIGURA 1 – Relação entre GSH, selênio e enzimas envolvidas no sistema antioxidante.

Uma perturbação neste sistema, como por exemplo, deficiência de Se, resulta em perda de atividade da GSHPx, como primeira consequência, que se não compensada por outro sistema antioxidante, resultará através dos radicais livres em dano oxidativo. Quando a taxa de oxidação da GSH excede a capacidade da GSH redutase, a GSSG sai da célula e ocorre depleção de GSH intracelular (Timbrell, 2000).

A GSH pode ser depletada em situação de produção excessiva de espécies reativas resultante do processo de biotransformação de xenobióticos (Hayes, 1994) ou quando ocorre produção excessiva EROs derivados do metabolismo normal, como o ânion radical superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete (Timbrell, 2000).

Em suma, a GSH pode ser removida da célula irreversivelmente através das reações de conjugação ou pela saída da GSSG da célula e reversivelmente por oxidação no ciclo catalítico da GSHPx. Assim, a determinação dos níveis de GSH no interior dos eritrócitos é importante, uma vez que qualquer fator que reduza o nível de GSH pode aumentar a toxicidade de substâncias que originam metabólitos reativos, como, por exemplo, na intoxicação por paracetamol em que ocorre depleção de GSH hepática (Hayes, 1994) e diminuição do nível de GSH nos eritrócitos (Kozer et al., 2002).

2.2 Espécies químicas reativas e patologias

Radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico ou moléculas com alto grau de reatividade química que é a causa para o grande número de efeitos prejudiciais ao organismo (De Vega et al., 2003). As espécies reativas do oxigênio (EROs) ânion radical superóxido, radical hidroxila e íon peroxila são os mais relevantes radicais livres de interesse biológico. As proteínas, os lipídios insaturados e os ácidos nucléicos são os principais alvos das reações dos radicais livres.

As proteínas são modificadas de diferentes maneiras por espécies reativas do oxigênio, por exemplo, o ferro da oxihemoglobina pode reagir com o radical superóxido de hidrogênio para formar metemoglobina (Freeman & Grapo, 1982).

Os ácidos graxos poliinsaturados de membrana são especialmente susceptíveis aos radicais livres. O processo de peroxidação lipídica começa quando o radical livre retira um átomo de hidrogênio de um dos carbonos metilenos da cadeia carbonada para produzir um radical livre lipídico (Blake et al., 1987). O hidroperóxido lipídico formado é instável e pode se decompor em várias espécies incluindo o malondialdeído (Kehrer, 2000). O progresso das reações deste pode induzir a liberação de ácido araquidônico e à subsequente formação de prostaglandinas e distintos endoperóxidos (Jamieson, 1989). Estas reações podem afetar canais iônicos, inativar proteínas de transporte de membrana e enzimas (Kehrer, 2000). Como consequência, pode causar edema celular, influenciar na permeabilidade vascular, promover quimiotaxia (Blake et al., 1987) e dano tecidual implicado, por exemplo, com doenças cardiovasculares (Leichtweis & Ji, 2001) como aterosclerose (Parthasarathy, 1987; Vagimigli et al., 2003).

A presença de bases de DNA oxidadas é freqüentemente usada como um marcador para o dano do DNA mediado por radicais livres (Helbock et al., 1999). Em geral, DNA oxidado exibe um aumento da propensão para mutações genéticas e alterações na transcrição (Yavuz et al., 2004) e câncer (Cerutti, 1994).

Embora os radicais livres sejam espécies altamente reativas, as células dispõem de sistemas de proteção contra os mesmos. A homeostase antioxidante é mantida pela atividade de sequestradores de radicais livres, como a GSH, vitamina E, vitamina C, β -caroteno, flavonóides e de sistemas enzimáticos envolvendo a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSHPx) (Gilhan et al., 1997).

Os radicais livres são produzidos continuamente no organismo (Halliwell & Gutteridge, 1989), o problema surge quando há uma superprodução ou quando os sistemas antioxidantes estão debilitados (Cotgreave, 1988). O desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio determina o estresse oxidativo (Morena et al., 2002).

O estudo do estresse oxidativo vem se apresentando como uma importante fonte para a elucidação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos em muitas doenças.

Estudos têm demonstrado o importante papel do estresse oxidativo na patogênese de doenças cardiovasculares (Heinecke, 1998), por exemplo, os efeitos pró-inflamatórios e seu envolvimento nos processos ateroscleróticos presentes em estágios iniciais do desenvolvimento de doença coronária (Abramson et al., 2005). Doenças como Alzheimer e Parkinson apresentam o dano oxidativo de macromoléculas biológicas como um indicador de desordens neurodegenerativas (Moreira et al., 2004).

2.3 Hemodiálise e estresse oxidativo

A insuficiência renal crônica (IRC) é definida como o estado resultante de uma deterioração significativa e permanente de néfrons funcionantes. A IRC é a via final comum de uma variedade de afecções renais e se constitui em importante causa de morbidade e mortalidade. Os pacientes com IRC apresentam deficiência na produção renal da eritropoietina e vitamina D, principais causas da anemia e desmineralização óssea (Bevilacqua et al., 1995).

A hemodiálise e a administração de eritropoietina, vitamina D e vitaminas do complexo B constituem algumas das necessidades terapêuticas comuns nestes pacientes. A hemodiálise consiste em um tratamento intensivo que utiliza um equipamento onde uma membrana dialisadora formada por um conjunto de filtros capilares substitui a função de filtração renal.

Estudos previamente realizados em hemodializados mostraram alterações de alguns indicadores do estresse oxidativo, como níveis de malondialdeído (MDA) significativamente mais elevados, e selênio e a atividade da glutathione peroxidase significativamente mais baixos que em indivíduos do grupo controle (Turis et al., 1992; Morena et al., 2002; Yavuz et al., 2004).

Os níveis da GSH em eritrócitos, no entanto, têm apresentado resultados controversos: significativamente baixos (Pasaoglu et al., 1996), ou mais elevados, mas sem diferença significativa em relação ao grupo controle (Cristol et al., 1997).

2.4 Quantificação da glutatona reduzida

Complexidade da matriz biológica.

O processamento da amostra é uma etapa crítica na análise da GSH (Kleinman & Richie, 2000). Perdas quase imediatas e completas de GSH foram observadas quando GSH foi adicionada ao plasma (Lash & Jones, 1985). Esta perda foi aparentemente devida à formação de dissulfetos de GSH de baixo peso molecular (Anderson & Meister, 1980).

A oxidação dos tióis é catalisada por metais de transição. A presença de agentes quelantes como EDTA ou 1,10-fenantrolina previne a oxidação (Yoshida, 1996). O bloqueio dos grupos sulfidrílicos com N-etilmaleimida previne a perda da GSH na amostra (Mueller, 2001).

A utilização de amostras livres de proteínas para a quantificação da GSH no eritrócito se mostrou um método mais sensível, possivelmente por que houve menor perda de GSH em detrimento de sua não interação com proteínas plasmáticas. Procedimentos utilizados na lavagem dos eritrócitos resultou em perda de GSH e aumento da GSSG (Roberts & Agar, 1971). Assim sendo, o estudo do ácido desproteinizante e a sua concentração são importantes na determinação da GSH, que não deve ficar presa ao precipitado de proteínas.

A otimização referente ao processamento da amostra de plasma e sangue total, com o objetivo de minimizar a oxidação da GSH, foi objeto de alguns estudos (Yoshida, 1996; Lash & Jones, 1985; Mills et al., 1994; Kleinman & Richie, 2000; Richie & Lang, 1987).

No entanto, existem poucos trabalhos (Beutler, 1957; Roberts & Agar, 1971) onde se realiza recuperação de padrão, para avaliar a estabilidade da GSH em eritrócitos.

Metodologias.

Os métodos utilizados para determinação da GSH em amostras biológicas são: fluorimetria, bioluminescência, eletroforese capilar, CLAE acoplada a detector eletroquímico, fluorimétrico ou UV; cromatografia gasosa – espectrometria de massa, cromatografia líquida – espectrometria de massa. Todos os métodos de análise de amostras biológicas, exceto aqueles baseados em eletroquímica e espectroscopia de massa, dependem de derivação da GSH (Pastore et al., 2003).

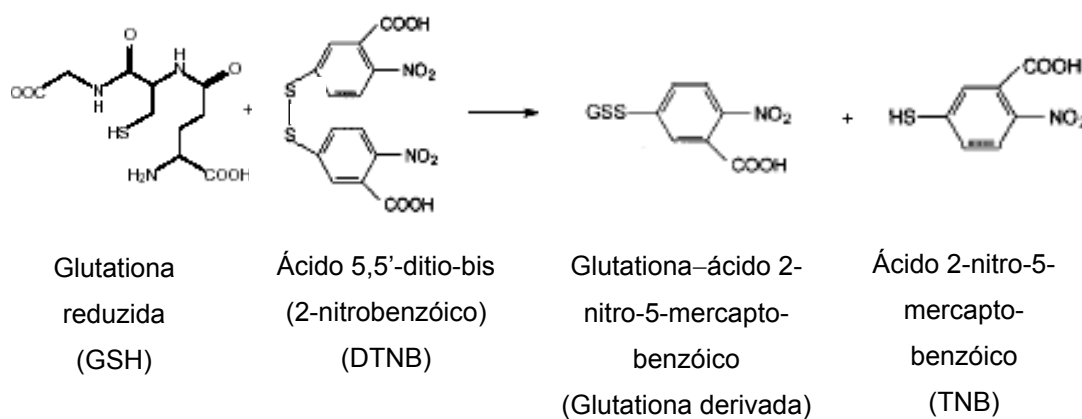
O método realizado por bioluminescência é semi-quantitativo para análise de amostras sangüíneas (Pastore et al., 2003) e para análise indireta de GSSG, dependente do consumo de NADPH, nos tecidos hepático e renal (Mourad & Steghens, 2000). A eletroforese capilar (EC) tem sido introduzida na determinação de glutathiona e se mostra altamente eficiente. Trabalhos recentes, utilizando a EC acoplada à detecção eletroquímica, permitiram a análise da GSH e GSSG (Jim et al., 2000; Carru et al., 2002).

A CLAE acoplada a detectores de fluorescência, eletroquímicos ou UV tornou-se, recentemente, a técnica de escolha para a medida de glutathiona, pois é uma técnica rápida, altamente específica, sensível e reprodutível (Pastore et al., 2003).

O método baseado na derivação pré-coluna com reagentes fluorogênicos para tióis e seguida por CLAE acoplada a um detector de fluorescência tem sensibilidade para medir concentrações em picomolar. No entanto, o reagente pode conter impurezas fluorescentes ou apresentar baixa reatividade. O mono-Bromobimano, por exemplo, liga-se rapidamente com tióis em pH 8,0 e à temperatura ambiente, no entanto, o próprio reagente é fluorescente (Baeyens et al., 1988). O derivatizante amônio-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonato (SBD-F) requer drásticas condições para reagir com tióis (pH 9,5 e 60°C por 1 hora) o que causa problemas devido a reoxidação da GSH (Toyo'oka et al., 1988).

Os detectores eletroquímicos são inadequados para a análise de matrizes biológicas complexas. No uso de eletrodos de Au/Hg, por exemplo, há perda da sensibilidade e necessidade de acondicionamento após cerca de cem injeções (Pastore et al., 2003). Outro aspecto limitante é a interferência de agentes estabilizantes da GSH na detecção eletroquímica, como por exemplo, o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico), DTNB, (Kleinman et al., 2000).

O DTNB ou reagente de Ellman é utilizado para a quantificação colorimétrica de tióis totais em amostras biológicas desde 1957 (Beutler, 1957; Ellman, 1959). É largamente utilizado para análise de tióis totais em amostras biológicas através da determinação colorimétrica do ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) liberado (Gergel & Cerbaum, 1997). A especiação pode ser realizada por CLAE acoplada a detector UV, o que possibilita quantificar cada um dos componentes derivados na amostra (Reeve & Kuhlenkamp, 1980; Komuro et al., 1985; Katrusiak et al., 2001). A reação de derivação da GSH com DTNB está demonstrada no esquema seguinte (Rover et al., 2001).



Além disso, o DTNB pode agir como estabilizante da GSH no sangue total se a amostra for processada imediatamente após a coleta (Kleinmam et al., 2000).

A primeira etapa na análise da glutathiona livre é usualmente a precipitação de proteínas pela acidificação (ácido tricloroacético, ácido sulfossalicílico), produzindo um sobrenadante límpido após centrifugação. Dependendo do tipo de matriz na qual a amostra é determinada, pode haver problemas de interferência devido a outras espécies que absorvem luz no mesmo comprimento de onda (Gergel & Cerbaum, 1997). Devido a isto, uma técnica de separação é necessária para a análise de GSH, uma vez que esta não reage seletivamente com reagentes derivatizantes.

Em suma, os métodos analíticos que utilizam derivatizante colorimétrico, como o DTNB, seguido de CLAE e detecção da absorvância no UV são mais simples quando comparados à determinação com detecção fluorimétrica ou eletroquímica (Pastore et al., 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- ❖ Cromatógrafo líquido de alta eficiência KNAUER®, modelo WellChrom equipado com uma bomba quaternária, sistema organizador de solventes, câmara misturadora dinâmica, degaseificador *on line* com quatro canais, injetor manual com alça de amostragem de 20 µl.
- ❖ Coluna cromatográfica Eurospher-100 C18, 5 µm, 150 x 4 mm integrada à pré-coluna Eurospher-100 C18, 5 µm, 5mm x 4 mm.
- ❖ Sistema de aquecimento da coluna cromatográfica, HAAKE FJ .
- ❖ Detector espectrofotométrico na região do ultravioleta (UV) KNAUER®.
- ❖ Sistema informatizado de aquisição de dados, integração e registro através de computador Pentium IV, via EUROCHROM 2000 SOFTWARE ® basic edition Versão 2.05 para Windows.
- ❖ Centrífuga refrigerada, Heraeus GmbH.
- ❖ PHmetro, Metler Toledo.
- ❖ Balança analítica, Sartorius.
- ❖ Sistema de filtração de solventes, Millipore.
- ❖ Vórtex, Reidolph.
- ❖ Bomba de vácuo, Fanem.
- ❖ Banho de ultra-som, Unique.
- ❖ Dispensador manual de precisão, Eppendorf.
- ❖ Freezer -20°C, Prosdócimo.

3.2 Reagentes e soluções

Reagentes.

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítico.

- ❖ Acetonitrila, Tedia.
- ❖ Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico), Sigma-Aldrich.
- ❖ Ácido acético, Merck.
- ❖ Ácido clorídrico fumegante, Merck.
- ❖ Ácido etileno diamino tetracético, Vetec.
- ❖ Ácido metafosfórico, Vetec.
- ❖ Ácido o-fosfórico 85%, Merck.
- ❖ Ácido sulfossalicílico, Merck.
- ❖ Ácido tricloroacético, Vetec.
- ❖ Albumina bovina, Bioclin.
- ❖ Álcool metílico, Tedia.
- ❖ Azul brilhante de Coomassie G-250, Sigma-Aldrich.
- ❖ Cisteína , Sigma-Aldrich.
- ❖ Cisteinilglicina, Sigma-Aldrich.
- ❖ Fosfato de potássio dibásico, Vetec.
- ❖ Fosfato de potássio monobásico, Vetec.
- ❖ Glutationa (forma reduzida), Sigma-Aldrich.
- ❖ Heparina sódica, Eurofarma.
- ❖ Homocisteína, Sigma-Aldrich.
- ❖ N-acetilcisteína, Sigma-Aldrich.
- ❖ Tris (hidroximetil) aminometano; Vetec.
- ❖ Triton X – 100 , Sigma-Aldrich.

Soluções.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida através do sistema Milli-Q, Millipore, (resistividade de 18,2 M Ω cm).

- ❖ Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM, pH 8,0.
- ❖ Ácido clorídrico (HCl) 4 M.
- ❖ Ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 0,3 mM.
- ❖ Ácido fosfórico 7 M.
- ❖ Ácido metafosfórico (MPA) 5, 10, 15, 20, 30 e 50%.
- ❖ Ácido sulfossalicílico (SSA) 5, 10, 15, 20 e 25%.
- ❖ Ácido tricloroacético (TCA) 5, 10, 15, 20 %.
- ❖ Albumina bovina 1 mg/mL.
- ❖ Azul brilhante de Coomassie G-250 10%.
- ❖ Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,5 M, pH 8,0.
- ❖ Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 25 mM, pH 3,8.
- ❖ Padrão aquoso estoque de glutatona reduzida (GSH) 20 mM.
- ❖ Tris-HCl 0,5 M, pH 8,9.
- ❖ Triton X – 100 20%.

3.3 Condições cromatográficas

Para o estabelecimento das condições cromatográficas adequadas, alguns parâmetros foram avaliados: concentração da solução de fosfato de potássio monobásico, constituição da fase móvel e modo de eluição. Para estes testes foram utilizadas soluções aquosas de GSH 1 mM previamente derivadas com DTNB de acordo com publicação prévia (Katrusiak et al., 2001) com modificações como mostra a Tabela 1. A GSH derivada foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência/ detecção UV (CLAE-UV).

Preparo das soluções para a derivação.

- ❖ Solução padrão estoque de GSH 20mM: pesou-se 0,0615 g de GSH e completou-se o volume com solução de EDTA 0,3 mM até 10 mL. Alíquotas de 100 μ L foram armazenadas a -20°C . Para obtenção da solução de EDTA 0,3 mM, foi dissolvido 0,3722 g de EDTA e completado o volume com água até 100 mL.
- ❖ Solução de GSH 1mM foi preparada a partir da diluição da solução estoque de 20mM em solução de EDTA 0,3 mM.
- ❖ Solução Tris-HCl 0,5M, pH 8,9: para 100 mL de solução foram misturados 6,05 g de Tris (hidroximetil) aminometano com 70 mL de água, o pH foi ajustado a 8,9 com solução de ácido clorídrico 4 M e completado o volume com água.
- ❖ Solução de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 0,5 M; pH 8,0: para 100 mL de solução foram dissolvidos 8,709 g de K_2HPO_4 em 70 mL de água, o pH foi corrigido a 8,0 com solução de HCl 4 M e completado o volume com água.
- ❖ Solução de DTNB 10 mM: pesou-se 0,3963 g de DTNB e completou-se o volume até 100 mL com solução de K_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0.

TABELA 1 – Procedimento de derivação e remoção do excesso de DTNB.

Soluções	Volume (μL)
Padrão de GSH 1 mM	130
Tris-HCl 0,5M; pH 8,9	500
DTNB 10mM, pH 8,0	350
Vortex, frequência de 2400 agitações / minuto, por 1 minuto, repouso por 5 minutos. A remoção do excesso de DTNB foi realizada com solução de ácido fosfórico 7 M.	
Ácido fosfórico 7 M	100
A solução obtida foi homogeneizada e centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos, filtrada com membrana de acetato de celulose 0,22 μm e injetada no cromatógrafo.	

3.4 Fase móvel

3.4.1 Solução de fosfato de potássio monobásico

Concentrações de solução de KH_2PO_4 100, 50 e 25 mM foram testadas. O pH final de todas as soluções foi 3,83.

Preparo da solução de KH_2PO_4 100 mM: para um volume de solução de 1000 mL foram dissolvidos 13,61 g de KH_2PO_4 em 800 mL de água ultrapura com agitação magnética. O pH foi corrigido com solução HCl 4 M até 3,83 e o volume foi completado com água ultrapura até 1000 mL em balão volumétrico. O mesmo procedimento foi executado para as concentrações de 50 e 25 mM, pesando-se respectivamente 6,85 e 3,42 g de KH_2PO_4 .

Preparo da solução de ácido clorídrico (HCl) 4 M: para um volume final de 100 mL de solução, foram misturadas quantidade suficiente de água e 33,1 mL de HCl (concentração 37%, densidade 1,19).

3.5 Eluição por gradiente

O tempo de análise foi otimizado de acordo com as características físico-químicas dos produtos de reação de derivação pré-coluna e da fase móvel.

Solução para injeção foi constituída de padrão aquoso de GSH derivado com DTNB como mostra a Tabela 1, item 3.3.

Com o objetivo de alcançar a melhor resolução cromatográfica seguida do acondicionamento adequado da coluna, foi realizada a variação da proporção entre a solução de fosfato de potássio monobásico 25 mM, pH 3,83 e metanol (MeOH) em função do tempo e a variação da vazão da fase móvel. Assim, foram testados três gradientes diferentes.

3.6 Amostra biológica

Amostras de sangue foram obtidas de voluntários no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.6.1 Coleta e processamento da amostra

Amostra de sangue, 5 mL, foi obtida através de venipuntura. A amostra foi coletada em tubo de ensaio contendo EDTA como anticoagulante.

Para minimizar a oxidação da GSH foi utilizado banho de gelo (0 a 4°C) após a coleta sangüínea e durante o transporte e tratamento da amostra. A centrifugação para a separação dos eritrócitos do plasma e outros constituintes foi realizada a 3000 rpm durante 10 minutos, em centrífuga refrigerada (3°C).

Para obtenção do volume preciso de eritrócitos foi utilizado um dispensador manual de precisão acoplado a uma ponteira tipo seringa, com o cuidado de não aspirar bolhas de ar. A camada de leucócitos superior foi removida com pipeta.

3.6.2 Hemólise e desproteínização

Análise de amostras biológicas por CLAE exige um pré-tratamento, *clean up*, como a desproteínização ácida. Além disso, a localização intraeritrocitária da GSH requer hemólise previamente à desproteínização.

Hemólise.

Testes foram realizados para estabelecer as condições de hemólise utilizando solução de Triton X – 100 20% como hemolisante, variando tempo e frequência de agitação no vórtex. Considerou-se hemólise total através de observação visual de hemolisado não turvo.

Para obtenção de 100 mL de solução de Triton X – 100 20%, mediu-se 20 mL de Triton X – 100 e completou-se o volume com água.

O procedimento da hemólise foi realizado de acordo com a Tabela 2.

TABELA 2 – Procedimento de hemólise.

Componentes	Volume (μL)
Solução EDTA 0,3 mM	125
Eritrócitos	300
Solução Triton X – 100 20%	300

Vortex, frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalando com banho de gelo (0 a 4°C).

Desproteínização.

Escolha do ácido desproteínizante.

Para a determinação da GSH, os desproteínizantes estudados foram os ácidos. Foram testadas concentrações variadas dos ácidos metafosfórico (MPA), sulfossalicílico (SSA) e tricloroacético (TCA) de acordo com a Tabela 3. As soluções destes foram preparadas em água, utilizando as relações m/v.

TABELA 3 – Soluções ácidas testadas e suas respectivas concentrações (m/v).

Desproteínizante	Concentrações (%)					
	5	10	15	20	30	50
MPA	5	10	15	20	30	50
SSA	5	10	15	20	25	-
TCA	5	10	15	20	-	-

A escolha do desproteinizante ideal foi realizada através da avaliação do aspecto do sobrenadante, análise quantitativa de proteínas residuais no sobrenadante, avaliação qualitativa da interferência cromatográfica e avaliação da possível perda de GSH durante o procedimento de desproteinação da amostra.

O procedimento da desproteinação foi realizado de acordo com a Tabela 4.

TABELA 4 – Procedimento de desproteinação.

Componentes	Volume (μL)
Hemolisado ^a	725
Solução de ácido ^b	300

Agitação em vórtex, com frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalando com banho de gelo e seguido de repouso por 30 minutos. Centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos, 3°C. O sobrenadante ácido foi separado imediatamente para derivação de acordo com o item 3.3, Tabela 1, sendo substituída a solução padrão aquosa pelo sobrenadante ácido.

^a diluição 1:2,42; ^b ácidos e concentrações segundo Tabela 3.

Aspecto do sobrenadante.

O aspecto do sobrenadante foi avaliado segundo o grau de turvação. Os sobrenadantes turvos foram descartados.

Sobrenadantes límpidos foram utilizados para quantificação das proteínas residuais e avaliação, sob aspecto cromatográfico, da possível interferência causada pelo ácido e perda de GSH no procedimento da desproteinação.

Quantificação das proteínas residuais por espectrofotometria.

O método de Bradford (Bradford, 1976) foi realizado nos sobrenadantes com aspecto considerado límpido.

O reagente de Coomassie foi preparado para obter 100 mL: 10 mg de Coomassie Azul Brilhante G-250 foi pesado, este foi dissolvido em 5 mL de etanol 95%, adicionou-se água até 70mL e 10 mL de ácido fosfórico 85%. Completou-se o volume com água até 100 mL.

Solução padrão de albumina 1g.L^{-1} , a partir da concentração 40g.L^{-1} , foi utilizada para construção da curva analítica nas concentrações de 4, 10 e 20 mg.L^{-1} ; como P1, P2 e P3, Tabela 5.

TABELA 5 – Preparo dos padrões e da amostra para quantificação de proteínas, método de Bradford.

Reagentes	Branco	P 1	P 2	P 3	Amostra
Água ultrapura (μL)	100	90	75	50	50
Sobrenadante ácido (μL)	-	-	-	-	50
Albumina bovina 1mg/mL (μL)	-	10	25	50	-
Coomassie (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Leitura em 595 nm, a reação é estável por 1h e 30 minutos.

Avaliação da possível interferência cromatográfica causada pelo ácido.

Sobrenadantes considerados límpidos e com baixa concentração de proteínas foram avaliados qualitativamente por CLAE-UV.

As condições cromatográficas adotadas foram: coluna cromatográfica de fase reversa Eurospher-100 C18, 5 μ m, 150 x 4 mm integrada à pré-coluna Eurospher-100 C18, 5 μ m, 5mm x 4 mm, temperatura de 39°C; alça de amostragem de 20 μ l; fase móvel constituída por KH_2PO_4 25 mM, pH 3,83: metanol; eluição por gradiente de acordo com a Tabela 6 e comprimento de onda 330 nm.

TABELA 6 – Programa de eluição, gradiente III.

	Vazão (mL/minuto)	KH_2PO_4 (%)	MeOH (%)
00:00	1,0	88	12
03:00	1,0	88	12
03:01	0,6	92	8
04:30	0,6	92	8
04:31	0,8	60	40
10:30	0,8	60	40
10:31	1,0	88	12
25:00	1,0	88	12

Realizou-se a avaliação da possível interferência cromatográfica causada pelos ácidos SSA 15% e TCA 15% através da obtenção do cromatograma, observando se havia aparecimento de sinais no mesmo tempo de retenção da GSH comparando com o obtido com injeção direta do padrão aquoso da GSH 1 mM após derivação com DTNB (Tabela 1).

As soluções para injeção foram preparadas em duplicata de acordo com a Tabela 7. Considerou-se como branco aquoso a solução contendo SSA ou TCA, mas desprovida de eritrócitos.

TABELA 7 – Preparo do branco aquoso e amostra eritrocitária basal com SSA 15% e TCA 15%.

Soluções / componentes	Branco SSA	Branco TCA	Basal SSA	Basal TCA
EDTA 0,3mM (μ L)	300	300	-	-
Eritrócitos (μ L)	-	-	300	300
Triton X – 100 20% (μ L)	300	300	300	300
SSA 15% (μ L)	300	-	300	-
TCA 15% (μ L)	-	300	-	300

Agitação em vórtex, com frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalando com banho de gelo e seguido de repouso por 30 minutos. Centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos, 3°C. O sobrenadante ácido foi separado imediatamente e derivado de acordo com item 3.3, Tabela 1, sendo a solução padrão aquosa substituída pelo sobrenadante ácido.

Avaliação da possível perda de GSH durante a desproteíntização.

O nível basal de GSH na amostra é obtido pelo tratamento do eritrócito sem adição de GSH, uma vez que a GSH existe fisiologicamente nos eritrócitos.

A quantificação da GSH foi realizada por CLAE-UV em sobrenadante ácido considerado límpido e com baixa concentração de proteínas. Para a desproteíntização, foram utilizados ácidos SSA 15% e TCA 15%. O procedimento de preparo da amostra foi realizado em duplicata de acordo com a Tabela 8.

As condições cromatográficas adotadas foram as mesmas utilizadas na avaliação das possíveis interferências cromatográficas causadas pelo ácido.

TABELA 8 – Desproteinização com SSA 15% e TCA 15% após adição de GSH nos eritrócitos.

Soluções / componentes	Concentração basal	Concentração basal + adição de padrão		
GSH (mM)		0,5	1,0	1,5
Eritrócitos (µL)	300	300	300	300
GSH 10mM (µL)	-	15	30	45
EDTA 0,3mM (µL)	125	110	95	80
Triton X – 100 20% (µL)	300	300	300	300
Vórtex com frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalado com banho de gelo.				
Ácido* (µL)	300	300	300	300

Agitação em vórtex, com frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalando com banho de gelo e seguido de repouso por 30 minutos. Centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos, 3°C. O sobrenadante ácido foi separado imediatamente e derivado de acordo com item 3.3, Tabela 1, sendo substituída a solução padrão aquosa pelo sobrenadante ácido.

*SSA 15% ou TCA 15%

3.7 Validação

O desenvolvimento do trabalho foi realizado de acordo com protocolos e resoluções das agências reguladoras brasileiras e internacionais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003) e o Protocolo Harmonizado Internacional (ICH, 1994 e ICH, 1996). Artigos científicos indexados também foram utilizados para auxiliar na determinação de cada parâmetro (Causon, 1997; Garcia et al., 2003).

Os parâmetros de desempenho analíticos avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade.

Para o procedimento da validação as condições analíticas adotadas estão mostradas nas Tabelas 9 e 10. A representação esquemática do procedimento desde a coleta até a análise encontra-se na Figura 2.

TABELA 9 – Condições de tratamento da amostra otimizadas para a validação.

Anticoagulante	EDTA
Amostra biológica	Eritrócitos
Hemolisante	Triton X – 100 20%
Desproteinizante	TCA 15%
Derivatizante	DTNB 10 mM, pH 8,0
Remoção do excesso de DTNB	H ₃ PO ₄ 7 M

TABELA 10 – Condições cromatográficas otimizadas para a validação.

Fase móvel	KH ₂ PO ₄ 25 mM, pH 3,83 : MeOH
Eluição por gradiente	Tabela 6
Fase estacionária	Fase reversa C18, 5 µm, 150 x 4 mm
Temperatura da coluna	39°C
Comprimento de onda (UV)	330 nm
Volume de injeção	20 µL

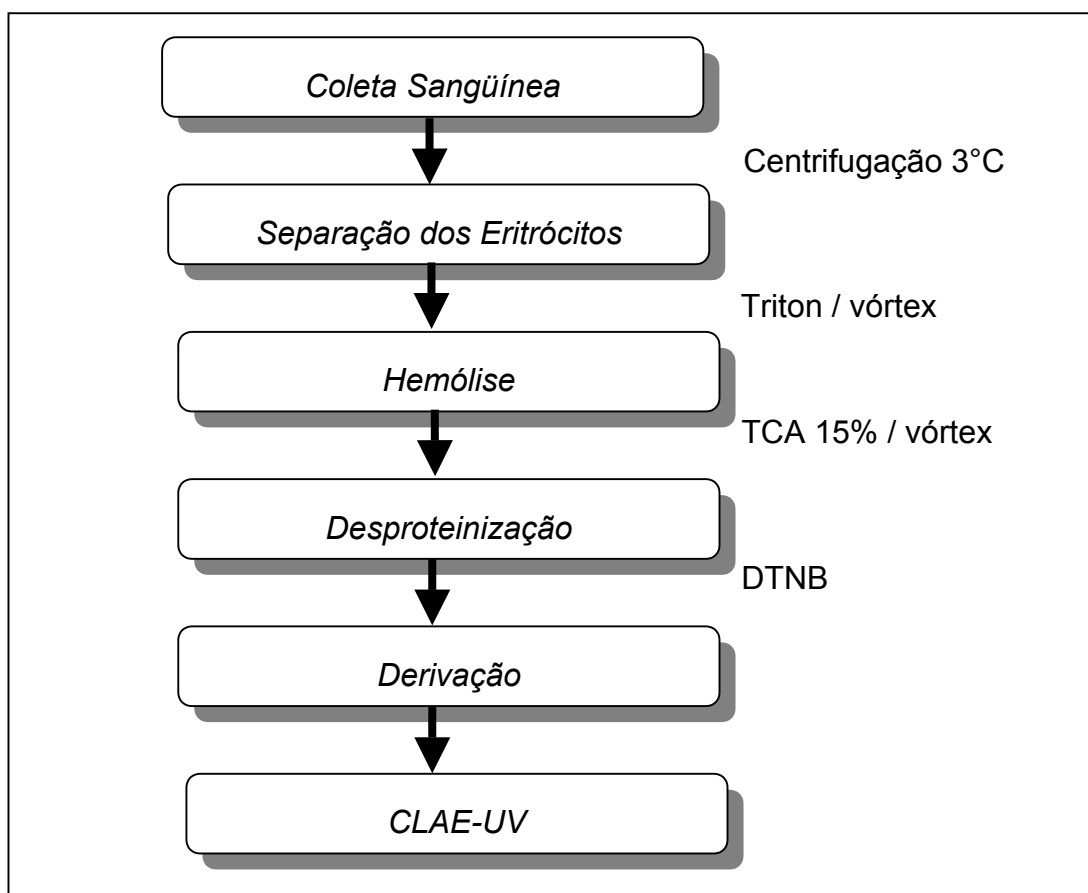


FIGURA 2 – Fluxograma do preparo da amostra para a realização da validação.

3.7.1 Linearidade

A verificação da linearidade se constituiu da construção de curvas com adição de padrão no eritrócito (n=5), através do método de adição de padrão e de curvas analíticas aquosas (n=5) avaliando-se a regressão linear.

A correlação matemática entre o sinal medido, área do pico cromatográfico, representado no eixo y e a concentração da espécie de interesse, no eixo x, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva analítica*.

Para a curva analítica com adição de padrão, seis pontos foram utilizados para definir a reta: nível basal e adição de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM no eritrócito. Para a curva aquosa os pontos foram: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH.

Para as curvas com adição de padrão, amostras sanguíneas de cinco diferentes voluntários foram obtidas em cinco dias diferentes de análise.

Método de regressão linear.

O coeficiente de correlação r , calculado a partir dos pontos da curva analítica, é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Os coeficientes de regressão a e b também são calculados. A relação linear simples descrita pela equação $y = a x + b$ é válida até um determinado intervalo de concentração da espécie medida. Em que y representa a resposta do detector ou área, a é a inclinação da reta, x representa a concentração do analito e b corresponde ao intercepto da reta no eixo y .

Método de adição de padrão.

As amostras para injeção para a curva analítica com adição de padrão na amostra eritrocitária e curva aquosa foram preparadas em duplicata e injetadas no cromatógrafo em triplicata. As áreas obtidas na curva com adição de padrão na matriz foram comparadas com as obtidas na curva aquosa.

A curva analítica com adição de padrão na amostra eritrocitária foi estabelecida de forma que o primeiro ponto considerado foi o nível endógeno ou basal de GSH, existente nos eritrócitos; os demais pontos foram preparados de acordo com a Tabela 11 e representam a adição de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM.

TABELA 11 – Preparo da curva analítica com adição de GSH nos eritrócitos nas concentrações de 0 a 3 mM (n=5).

Soluções / componentes	Basal		Concentração basal + GSH			
GSH (mM)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
Eritrócitos (µL)	300	300	300	300	300	300
GSH 10mM (µL)	-	15	30	45	60	90
EDTA 0,3mM (µL)	125	110	95	80	65	35
Triton X – 100 20% (µL)	300	300	300	300	300	300
Vórtex com frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalado com banho de gelo (0 a 4°C).						
TCA 15% (µL)	300	300	300	300	300	300

Agitação em vórtex, com frequência de 2400 agitações / minuto, durante 20 segundos, três vezes, intercalando com banho de gelo e seguido de repouso por 30 minutos. Centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos, 3°C. O sobrenadante ácido foi separado imediatamente e derivado de acordo com item 3.3, Tabela 1, sendo a solução padrão aquosa substituída pelo sobrenadante ácido.

As soluções para a curva analítica aquosa, sem a presença da matriz biológica, foram preparadas para injeção direta, nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH, como mostra a Tabela 12.

TABELA 12 – Preparo da curva analítica aquosa de GSH nas concentrações de 0 a 3 mM (n=5).

Soluções / componentes	Concentrações					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
GSH (mM)	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
EDTA 0,3 mM (μ L)	130	-	-	-	-	-
GSH (μ L)	-	130	130	130	130	130
Tris-HCl 0,5M; pH 8,9 (μ L)	500	500	500	500	500	500
DTNB 10mM (μ L)	350	350	350	350	350	350
Ácido fosfórico 7M (μ L)	100	100	100	100	100	100

Vortex, frequência de 2400 agitações / minuto, durante 1 minuto, repouso por 5 minutos. Centrifugação a 6000 rpm e injeção no cromatógrafo.

3.7.2 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA,2003).

Avaliação de possíveis interferentes.

Para avaliar a seletividade do método seguiu-se normas da ICH de 1996.

Outros tióis que também reagem com o DTNB e que se encontram em amostras sanguíneas foram derivados e injetados.

❖ Soluções contendo cada tiol foram preparadas separadamente, derivou-se com DTNB, injetou-se no cromatógrafo-se e os tempos de retenção foram identificados;

❖ Soluções contendo GSH e outros tióis como cisteína (CYS), cisteinilglicina (CYSGLY), homocisteína (HCYS) e n-acetilcisteína (NAC), possíveis interferentes; foram preparadas, derivadas com DTNB, injetadas e os tempos de retenção foram comparados com o tempo de retenção da GSH.

A derivação foi realizada de acordo com a Tabela 1.

3.7.3 Precisão

Ensaio independentes foram realizados utilizando o método da adição de padrão, em amostras de eritrócitos coletados no dia da preparação, de acordo com a Tabela 11. Verificou-se a repetibilidade do método ou precisão intra-dia e a precisão intermediária ou precisão inter-dia (ANVISA, 2003 e Causon, 1997).

Repetibilidade ou precisão intra-dia.

As preparações de três níveis de concentração (0,5, 1,5 e 3,0 mM) foram realizadas em duplicata, com seis preparações da amostra realizadas no mesmo dia. As duplicatas das diferentes concentrações foram injetadas em triplicata, foi calculado o coeficiente de variação entre as medidas de cada concentração.

Precisão intermediária ou precisão inter-dia.

As amostras biológicas (n=5) foram coletadas em cinco diferentes dias e preparadas por diferentes analistas. A utilização de diferentes amostras se deve à instabilidade da GSH após a coleta.

As preparações, de três níveis de concentração (0,5, 1,5 e 3,0 mM) foram realizadas em duplicata, seis preparações ao dia, em cinco diferentes dias. As duplicatas das diferentes concentrações foram injetadas em triplicata.

O coeficiente de variação foi calculado entre as medidas de cada concentração.

Cálculo das médias das áreas dos picos:

$$\bar{A} = \sum A_i / n$$

Em que \bar{A} é a média das áreas, $\sum A_i$ é o somatório das áreas e n é o número de análises.

Estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV):

$$CV (\%) = S / \bar{A} \times 100$$

Em que:

$$S = [\sum (A_i - \bar{A})^2 / (n-1)]^{1/2}$$

Em que S é a estimativa do desvio padrão absoluto, A_i é a área obtida em cada medida, \bar{A} é a média das medidas e n é o número de medidas.

3.7.4 Exatidão

A exatidão foi calculada como porcentagem bias (% bias) a partir de quantidades conhecidas do analito adicionado à amostra: concentração baixa, média e alta (0,5; 1,5 e 3,0 mM). As amostras foram preparadas em duplicata em cinco dias diferentes de acordo com a Tabela 11.

Ensaio independentes foram realizados utilizando o método da adição de padrão em amostras de eritrócitos, coletados no dia da preparação.

As amostras biológicas (n=5), foram obtidas de cinco diferentes voluntários em cinco diferentes dias de análise.

O cálculo foi realizado segundo com publicação prévia (Causon, 1997).

$$\% \text{ bias} = \frac{[\text{concentração encontrada} - \text{concentração adicionada}]}{\text{concentração adicionada}} \times 100$$

3.7.5 Recuperação

A recuperação, representa a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Para fins de entendimento da recuperação de padrão no presente trabalho, interpreta-se como processo de extração, a hemólise e desproteíntização do hemolisado. As áreas obtidas das amostras de eritrócitos onde foi adicionada a GSH (processadas) foram comparadas com as áreas de soluções aquosas obtidas a partir de injeção direta (não processadas).

O método de adição de padrão foi utilizado devido à impossibilidade de obter um branco da matriz isento de GSH. As amostras foram preparadas como mostra a Tabela 11.

A recuperação de GSH, R (%), foi avaliada na faixa de concentração de 0,5 a 3,0 mM. A GSH eritrocitária foi quantificada em amostra nível basal, onde não foi adicionada a GSH e em amostras enriquecidas com adição de padrão. Adicionou-se o analito na matriz biológica em 3 diferentes concentrações 0,5; 1,5 e 3,0 mM, em cinco diferentes amostras de eritrócitos e em cinco diferentes dias.

O cálculo foi realizado segundo publicação prévia (Causon, 1997).

$$R (\%) = \frac{\text{Resposta do analito quando adicionado a matriz (processado)}}{\text{Resposta do analito quando padrão puro (não processado)}} \times 100$$

Em que a resposta do analito quando processado corresponde a diferença entre a área obtida a partir da análise da amostra com a adição de GSH e área obtida da amostra basal. A resposta do analito quando não processado corresponde a área do pico obtido a partir da injeção direta da solução aquosa de GSH.

3.7.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental através do método baseado no desvio padrão do branco, sinal do ruído e em parâmetros da curva analítica (ANVISA, 2003).

Método baseado no desvio padrão do branco.

Utilizou-se solução de EDTA 0,3 mM isenta de GSH.

Método baseado em parâmetros da curva analítica.

Curvas analíticas aquosas (n=5), sem a presença de matriz biológica, foram construídas com concentrações de padrão de GSH na faixa próxima ao provável limite de quantificação (0,015; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0mM).

O procedimento de derivação das soluções de GSH nas concentrações 0,015; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mM e do branco foi realizado de acordo com a Tabela 12.

O LD pode ser expresso como:

$$LD = S_a \times 3 / IC$$

Em que S_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y proveniente da medida de amostras do branco (n=10); IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

3.7.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental através do método baseado em parâmetros da curva analítica e injeções de branco como descrito no item 3.7.6.

O LQ pode ser expresso como:

$$LQ = S_a \times 10 / IC$$

Em que S_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y proveniente da medida de amostras do branco (n=10); IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

3.7.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso por que as medidas são susceptíveis a variações das condições analíticas. Para avaliar a robustez do método foram avaliadas:

Modificações nas amostras, reagentes e condições cromatográficas foram modificadas;

- ❖ Colunas cromatográficas de diferentes lotes;
- ❖ Constituintes da fase móvel de diferentes marcas;
- ❖ Variação do pH da fase móvel;
- ❖ Diferentes dias de análise e recuperação do padrão;
- ❖ Diferentes analistas.

3.7.9 Estabilidade

Parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

A estabilidade da GSH foi avaliada em solução de padrão aquoso, no sangue total, no sobrenadante ácido e no sobrenadante ácido derivado.

Estabilidade da solução de padrão aquoso de GSH 20 mM.

Para o preparo de 10 mL de solução de GSH 20 mM, foram pesados 0,0307 g de GSH e o volume foi completado com solução de EDTA 0,3 mM. Alíquotas de 100 µL foram separadas e estocadas a -20°C.

Solução de GSH 1mM foi obtida em duplicata a partir da diluição da solução estoque de 20mM, seguida de derivação como descrito no item 3.3, Tabela 1. Medidas cromatográficas foram realizadas, imediatamente após derivação, rotineiramente durante dois meses.

Estabilidade da solução de padrão aquoso de 1mM após derivação.

Solução de GSH 1 mM foi derivada em cinco dias diferentes (n=5) e imediatamente medida. As soluções derivadas foram armazenadas a -20°C e medidas 24 horas após.

Estabilidade da GSH eritrocitária no sangue total.

O sangue total foi coletado em EDTA. Uma parte do sangue foi processada, em duplicata, imediatamente e outra parte quatro horas após a coleta, sendo a amostra mantida em banho de gelo (0 a 4°C).

Estabilidade da GSH eritrocitária no sobrenadante ácido.

Para avaliar a influência do TCA e EDTA na estabilidade da GSH utilizou-se água e/ou solução de EDTA 0,3 mM como diluentes do TCA

A amostra foi preparada em duplicata com adição de 1 mM de GSH no eritrócito. Uma parte do sobrenadante foi derivada e injetada imediatamente e a outra parte mantida a -20°C por 24 horas, derivada e injetada.

Estabilidade da GSH eritrocitária após derivação do sobrenadante ácido.

Para avaliar a estabilidade da GSH derivada, sobrenadantes ácidos foram obtidos através de desproteinização do hemolisado de acordo a Tabela 4, utilizando solução de TCA 15%.

A GSH foi adicionada aos eritrócitos preparados em duplicata, concentração basal, 1 mM e 2 mM. Os sobrenadantes obtidos foram derivados e analisados imediatamente. Alíquotas da amostra derivada foram armazenadas a -20°C . Medidas cromatográficas foram realizadas no segundo, quinto, oitavo e trigésimo dia.

3.8 Aplicação do método

Realizou-se a análise de GSH, hematócrito (Ht) e hemoglobina (Hb) em 30 indivíduos. Os grupos de estudo foram constituídos pelo grupo I e II.

Grupo I (n=20), indivíduos com doença renal crônica e submetidos ao tratamento regular de hemodiálise por um período superior a 10 meses, igual número de homens e mulheres, idade 50 ± 10 anos, não sendo considerado o jejum.

Grupo II (n=10), controle, formado por indivíduos considerados saudáveis para doença renal crônica, igual número de homens e mulheres, idade 50 ± 10 anos, não sendo considerado o jejum.

Um termo de consentimento foi assinado pelos participantes. Indivíduos infectados por vírus da hepatite e da imunodeficiência humana foram excluídos do estudo. Os indivíduos do grupo controle não estavam utilizando suplementos vitamínicos.

O termo de consentimento para a realização das coletas sanguíneas e autorização para a publicação dos resultados obtidos foi previamente assinado pelos participantes do estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde para a realização deste trabalho.

Todos os participantes dos grupos responderam a um questionário utilizado como um banco de dados para auxiliar na análise e discussão dos resultados obtidos (APÊNDICE 1).

A obtenção da amostra biológica, através da venipuntura periférica, foi realizada na Casa de Saúde e no Hospital de Caridade para o grupo I e no Laboratório de Toxicologia na UFSM para o grupo II. O volume de sangue total foi de 5 mL em EDTA. As amostras foram mantidas sob refrigeração, 0 a 4°C, imediatamente após a coleta.

Separação e tratamento das amostras de sangue.

Amostra de 1 ml de sangue total em EDTA foi destinada para determinação da hemoglobina através do método da cianometahemoglobina (ID181), APÊNDICE 2, e hematócrito através de microcentrifugação (ID 182), APÊNDICE 3.

Amostra de 4 ml de sangue total em EDTA foi centrifugada sob refrigeração a 3°C. Os eritrócitos separados foram hemolisados e desproteinizados, de acordo com a Tabela 4, utilizando solução de TCA 15%. O sobrenadante ácido foi derivado e mantido a -20°C até o momento da análise cromatográfica.

Cálculo para obtenção dos resultados.

Os resultados foram expressos em mmol de GSH/L de eritrócitos e em μmol GSH no sangue total/gHb. O resultado em mmol de GSH/L foi obtido diretamente através da curva analítica eritrocitária. O resultado em μmol GSH no sangue total/g Hb foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{❖ } \mu\text{mol GSH no sangue total/gHb} = \frac{\text{mM GSH nos eritrócitos} \times \text{Ht}}{\text{Hb}} \times 10$$

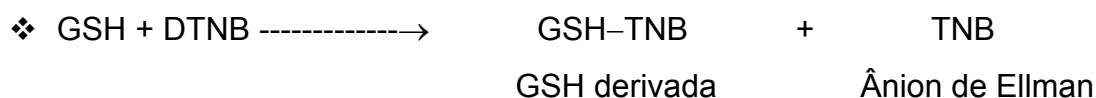
3.9 Análise estatística

Os grupos de estudo foram constituídos por indivíduos com insuficiência renal crônica submetidos ao tratamento regular de hemodiálise denominado grupo I e por indivíduos que não apresentam problemas renais, grupo controle ou grupo II. Os resultados obtidos do grupo I (n=20) e grupo II (n=10), foram analisados estatisticamente através de teste T de Student para amostras independentes através do *software* de estatística SPSS 10.0 para *Windows*. Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reação de derivação da GSH com DTNB

O Reagente de Ellman, DTNB, é largamente utilizado para a quantificação de grupos sulfidrílicos totais por espectrofotometria, quantificação indireta através do ânion liberado, ânion de Ellman ou ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB) (Gergel & Cerbaum, 1997). Em amostras contendo uma mistura de tióis, a reação com DTNB ou derivação permite a especificação e quantificação de cada componente tiol derivado através de técnicas cromatográficas que permitem a separação dos diferentes componentes e a detecção seletiva por UV 330 nm (Katrusiak et al., 2001).



4.2 Escolha da fase móvel e condições de eluição

A concentração da solução de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) ideal deve ser a de menor concentração possível capaz de eluir a substância de interesse analítico da fase estacionária no menor intervalo de tempo.

As concentrações de 100, 50 e 25 mM de solução de fosfato de potássio monobásico foram testadas. Verificou-se precipitação do sal e sobrecarga da pressão no sistema cromatográfico com conseqüente desgaste dos pistões quando utilizadas as concentrações de 100 e 50 mM. No entanto, concentração de 25 mM associada a eluição por gradiente permitiu separação cromatográfica satisfatória com tempo 25 minutos e sem a desvantagem de dano ao sistema cromatográfico.

4.3 Eluição por gradiente

A variação na constituição da fase móvel em função do tempo caracteriza a eluição por gradiente. Em geral, utiliza-se uma mistura binária e objetiva-se uma separação completa dos analitos de interesse no menor tempo de análise possível. Amostras complexas e analito com elevado tempo de retenção conduzem à utilização de eluição por gradiente.

O gradiente foi programado com o objetivo de eluir a GSH derivada em tempos de retenção diferentes das demais substâncias; remover o excesso de DTNB, e restabelecer o equilíbrio da fase estacionária. Os gradientes testados resultaram em diferentes tempos de retenção e conseqüentemente, os picos se apresentaram mais próximos ou mais separados.

A Tabela 13 mostra a programação do gradiente I e o cromatograma correspondente está na Figura 3. Nesta programação, a polaridade da fase móvel foi menor entre os tempos de um a quinze minutos, o que promoveu a eluição do TNB e GSH derivada em tempos de retenção muito próximos, prejudicando a separação.

A partir do resultado observado na Figura 3, resolveu-se aumentar a polaridade da fase móvel a partir de zero até onze minutos e diminuir a vazão para retardar a eluição dos compostos. A partir de onze minutos e um segundo até dezesseis minutos, a polaridade foi diminuída para diminuir o tempo de retenção do DTNB. A programação está demonstrada na Tabela 14, gradiente II. O respectivo cromatograma está representado na Figura 4.

TABELA 13 – Programa de eluição, gradiente I.

Intervalo de tempo (minutos)	Vazão (mL/minuto)	KH ₂ PO ₄ (%)	MeOH (%)
00:00	1,3	85	15
01:00	1,3	80	20
01:01	1,3	74	26
06:00	1,3	74	26
06:01	1,0	70	30
15:00	1,0	70	30
15:01	1,0	85	15
25:00	1,0	85	15

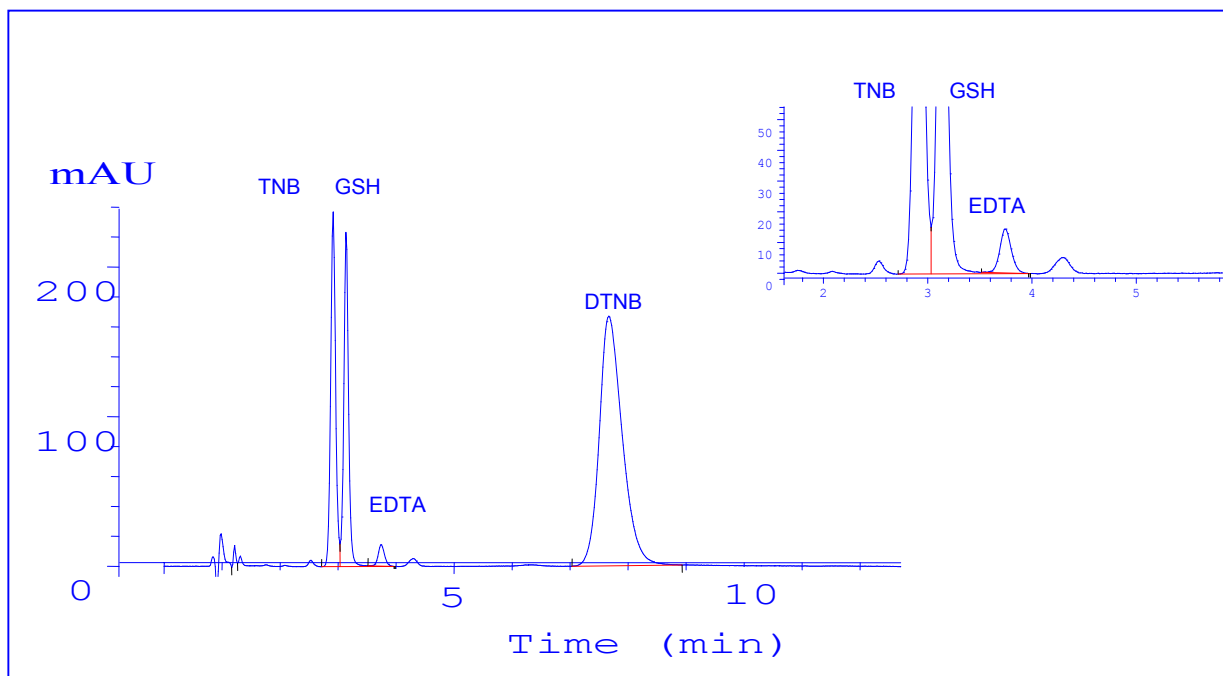


FIGURA 3 – Cromatograma obtido a partir da análise de padrão aquoso de GSH 1 mM utilizando o gradiente I. Tempos de retenção: TNB 2,91; GSH 3,13; EDTA 3,75 e DTNB 7,66 minutos.

TABELA 14 – Programa de eluição, gradiente II.

Intervalo de tempo (minutos)	Vazão (mL/minuto)	KH ₂ PO ₄ (%)	MeOH (%)
00:00	0,8	88	12
11:00	0,8	88	12
11:01	0,8	50	50
16:00	0,8	50	50
16:01	0,8	88	12
25:00	0,8	88	12

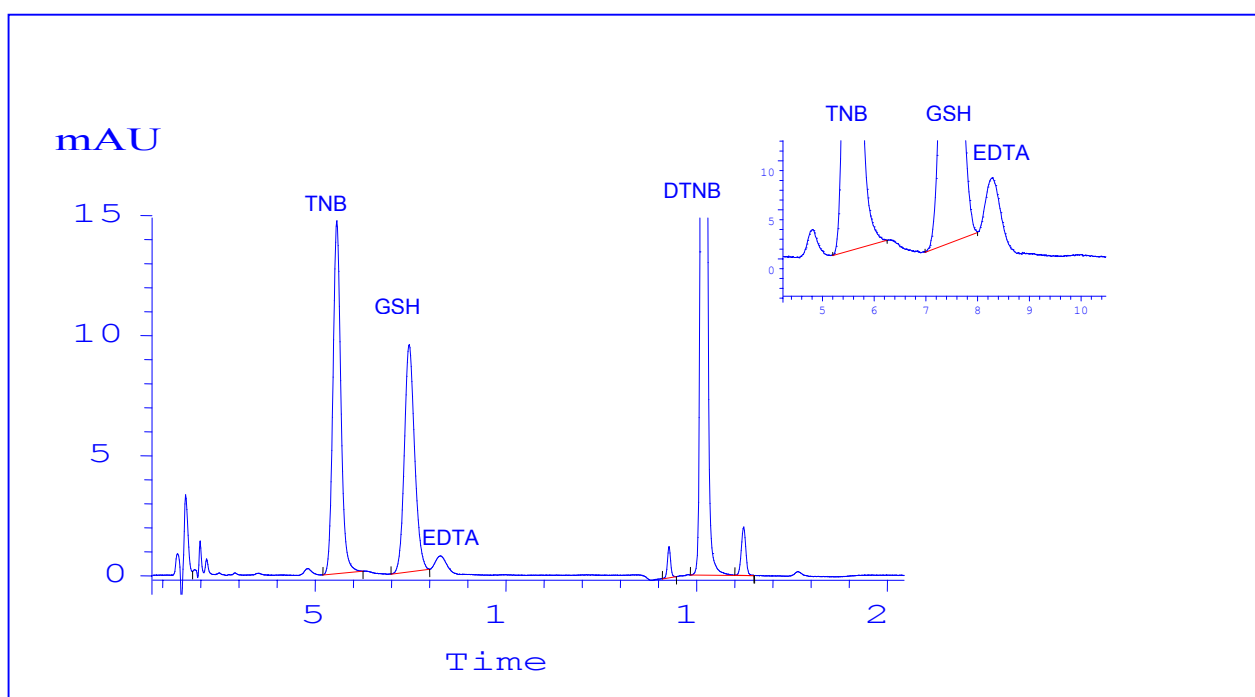


FIGURA 4 – Cromatograma obtido a partir da análise de padrão aquoso de GSH 1 mM utilizando o gradiente II. Tempos de retenção: TNB 5,56; GSH 7,46; EDTA 8,28 e DTNB 15,2 minutos.

Observamos na Figura 4 que os picos do TNB e da GSH derivada estão resolvidos, no entanto, o gradiente II utilizado não foi ideal para separar a GSH derivada e EDTA. Então, o gradiente III (Tabela 06), foi programado, a polaridade foi aumentada e a vazão diminuída para 0,6 mL/minuto entre os tempos de três minutos e um segundo e quatro minutos e meio em relação ao gradiente II. Com o objetivo de restabelecer o equilíbrio da fase estacionária em menor tempo possível, a polaridade foi reduzida e a vazão foi mantida a 0,8 mL/minuto entre quatro minutos e trinta e um segundos e dez minutos e meio, uma vez que o excesso de metanol que se mantinha na coluna interferia na corrida seguinte. Deste modo, o excesso de DTNB foi removido e o equilíbrio químico da coluna restabelecido para a próxima corrida, a partir do tempo de dez minutos e trinta e um segundos até vinte e cinco minutos, com a proporção 88:12 (KH_2PO_4 : MeOH). O cromatograma correspondente obtido está representado na Figura 5.

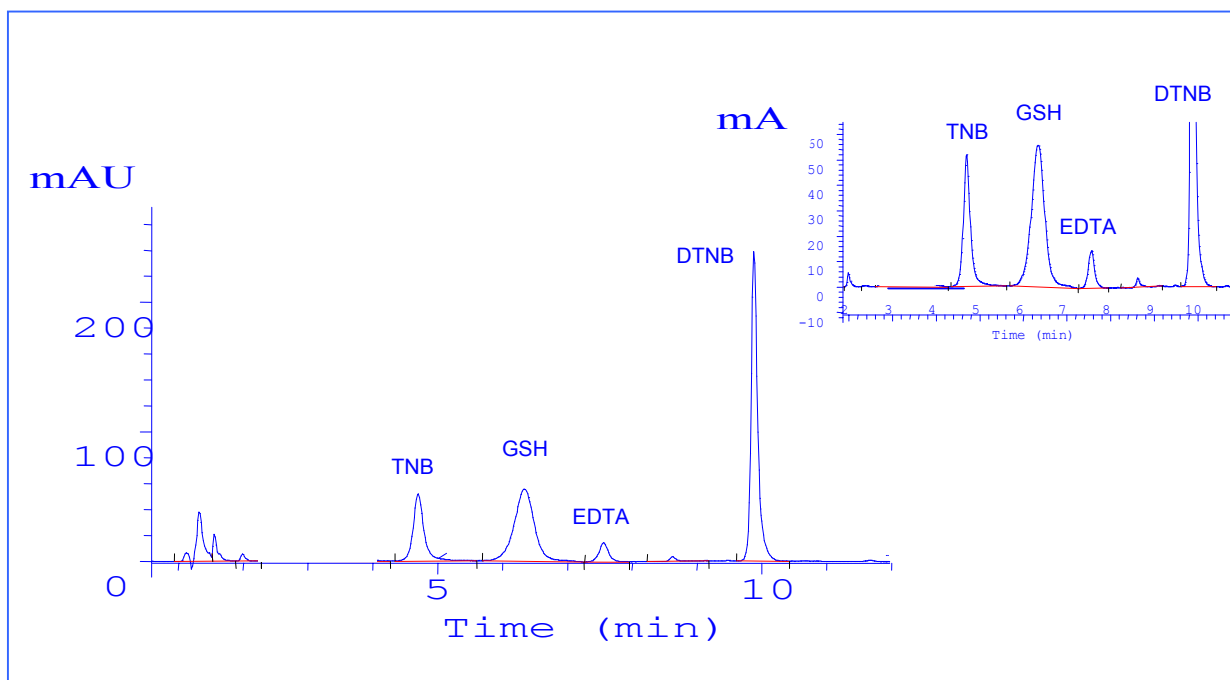


FIGURA 5 – Cromatograma obtido a partir da análise de padrão aquoso de GSH 1 mM utilizando gradiente III. Tempos de retenção: TNB 4,7; GSH 6,34; EDTA 7,55 e DTNB 9,87 minutos.

A otimização das condições cromatográficas, utilizando gradiente III e padrões aquosos de GSH, foi considerada satisfatória, para o início do trabalho com a amostra biológica.

4.4 Amostra biológica

Cuidados com a coleta da amostra são necessários para prevenir a oxidação da GSH resultando em GSSG devido à presença do ferro em eritrócitos. Em 1994, Asensi et al. verificaram que a hemoglobina está associada à oxidação da GSH na amostra. Em 1996, Yoshida demonstrou que a oxidação da GSH pode ser minimizada através do uso de agentes quelantes de metais como EDTA e 1,10-fenantrolina.

A presença de Fe^{3+} ou Fe^{2+} na amostra resulta em oxidação da GSH (Minotti & Aust, 1987; Kehrer, 2000). Assim, a presença de agentes quelantes como o EDTA ou a 1, 10-fenantrolina promovem a remoção do ferro e outros metais da amostra, prevenindo a oxidação da GSH e falsos resultados analíticos.

4.4.1 Coleta e processamento da amostra

O EDTA foi utilizado como anticoagulante devido à possibilidade de prevenir a oxidação da GSH após coleta da amostra. O processamento da amostra é uma etapa crítica na análise de GSH devido à suscetibilidade à reação de oxidação. Para minimizar estas reações, utilizou-se banho de gelo (0 a 4°C) durante coleta e processamento.

4.4.2 Hemólise e desproteíntização

O procedimento de hemólise é necessário, uma vez que 99,5% da GSH se encontra no interior dos eritrócitos. Após a variação do tempo e frequência de agitação no vórtex, a solução de Triton X-100 20% foi escolhida por ser a concentração mínima ideal capaz de causar hemólise total observada visualmente como hemolisado límpido.

A desproteíntização é importante para remover as enzimas envolvidas no metabolismo da GSH e prevenir reações de oxi-redução provenientes da interação química destes componentes. Além disso, em análises realizadas por CLAE, as proteínas da amostra podem precipitar quando em contato com solventes ou tampões salinos utilizados na fase móvel, o que bloqueia as canalizações, causando aumento na pressão e deterioração da eficiência da coluna (Bohrer et al., 2001).

A desproteíntização das amostras biológicas de interesse clínico é comumente realizada com substâncias ácidas ou solventes orgânicos que desnaturam as proteínas levando-as à precipitação. O processo mecânico de centrifugação permite que ocorra a separação. O analito que não estiver ligado às proteínas apresentar-se-á livre no sobrenadante.

O eritrócito representa uma amostra biológica complexa para a desproteíntização devido à grande concentração de proteínas. Somente de hemoglobina, a concentração média é de 12 g/dL. A instabilidade química e suscetibilidade à reações da GSH também são fatores determinantes na escolha do agente desproteíntizante. Portanto, o mesmo não deve reagir com a GSH, tampouco interferir no equilíbrio das reações pré-coluna. O ácido perclórico, por exemplo, age como pró-oxidante (Stempak et al., 2001).

Escolha do ácido desproteíntizante.

A escolha do ácido desproteíntizante deve respeitar alguns critérios, como por exemplo, não causar interferência durante todo o procedimento analítico nem causar dano ao sistema cromatográfico.

A concentração de ácido para desproteinização adequada é a menor possível para remover as proteínas resultando em sobrenadante límpido, com baixa concentração de proteínas residuais e sem perda do analito no precipitado.

Avaliação do aspecto do sobrenadante.

O MPA, concentração 5%, tem sido utilizado para desproteinização de eritrócitos (Mills & Lang, 1996) e de sangue total (Mills et al., 1994; Lang et al., 2001). Porém, outro trabalho demonstra que concentrações de 5 a 15% de MPA foram insuficientes para remover as proteínas da amostra de sangue total (Stempak, 2001).

De acordo com os resultados observados na Tabela 15, concentrações de 5 a 50% de MPA resultaram em desproteinização do hemolisado não satisfatória, caracterizada pelo aspecto turvo do sobrenadante. Por este motivo, os testes seguintes foram realizados com SSA e TCA.

TABELA 15 – Aspecto do precipitado e sobrenadante observado com o uso de diferentes concentrações de MPA na desproteinização do hemolisado com diluição 1:2,42.

MPA	Aspecto	
	Precipitado	Sobrenadante
Concentração (%)		
5, 10, 15, 20	Homogêneo	Turvo
30, 50	Heterogêneo	Turvo

De acordo com os resultados observados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente; concentrações de 5 a 10% de SSA e TCA resultaram em desproteíntização não satisfatória caracterizada pelo aspecto turvo do sobrenadante.

TABELA 16 – Aspecto do precipitado e sobrenadante observado com o uso de diferentes concentrações de SSA na desproteíntização do hemolisado com diluição 1:2,42.

SSA	Aspecto	
	Precipitado	Sobrenadante
Concentração (%)		
5, 10	Homogêneo	Turvo
15, 20	Heterogêneo	Límpido

TABELA 17 – Aspecto do precipitado e sobrenadante observado com o uso de diferentes concentrações de TCA na desproteíntização do hemolisado com diluição 1:2,42.

TCA	Aspecto	
	Precipitado	Sobrenadante
Concentração (%)		
5, 10	Homogêneo	Turvo
15, 20	Homogêneo	Límpido

A concentração mínima dos ácidos sulfossalicílico e tricloroacético que resultou em aspecto límpido do sobrenadante foi de 15%. Diante destes resultados, realizou-se a quantificação de proteínas residuais, que poderiam interferir nas reações pré-coluna ou causar dano ao sistema cromatográfico, e a avaliação da possível perda de GSH no precipitado após desproteíntização.

Quantificação das proteínas residuais por espectrofotometria.

A determinação da concentração de proteínas residuais foi realizada nos sobrenadantes considerados límpidos, obtidos com SSA 15% e TCA 15%, através do método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina bovina como padrão de acordo com a Tabela 5. Os resultados da análise estão na Tabela 18.

TABELA 18 – Concentração de proteínas residuais, método de Bradford, após desproteinização do hemolisado (diluição 1:2,42) com SSA 15% ou TCA 15%.

Sobrenadante SSA	< 4 mg.L ⁻¹
Sobrenadante TCA	< 4 mg.L ⁻¹

Considerando-se somente a concentração média de hemoglobina no eritrócito 120 g.L⁻¹ e desconsiderando demais proteínas, o procedimento de desproteinização realizado de acordo com a Tabela 4, utilizando SSA 15% ou TCA 15% mostra efetividade na desproteinização do hemolisado com diluição final 1:2,42; uma vez que pequena quantidade de proteína residual permaneceu no sobrenadante. Em análises de amostras de sangue realizadas por CLAE, a remoção das proteínas é o passo mais importante no tratamento da amostra (Bohrer et al., 2001).

Avaliação da interferência cromatográfica causada pelos ácidos.

O SSA 15% e o TCA 15% não causaram interferência no mesmo tempo de retenção da GSH. Os cromatogramas correspondentes aos tratamentos do eritrócito com SSA e TCA estão representados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A Tabela 7 mostra como foram preparadas as soluções para injeção.

O TCA, assim como o SSA não apresentou sinal cromatográfico no tempo de retenção correspondente ao da GSH. Portanto, foi avaliada a possível perda de GSH no procedimento da desproteinização com estes ácidos na concentração de 15%.

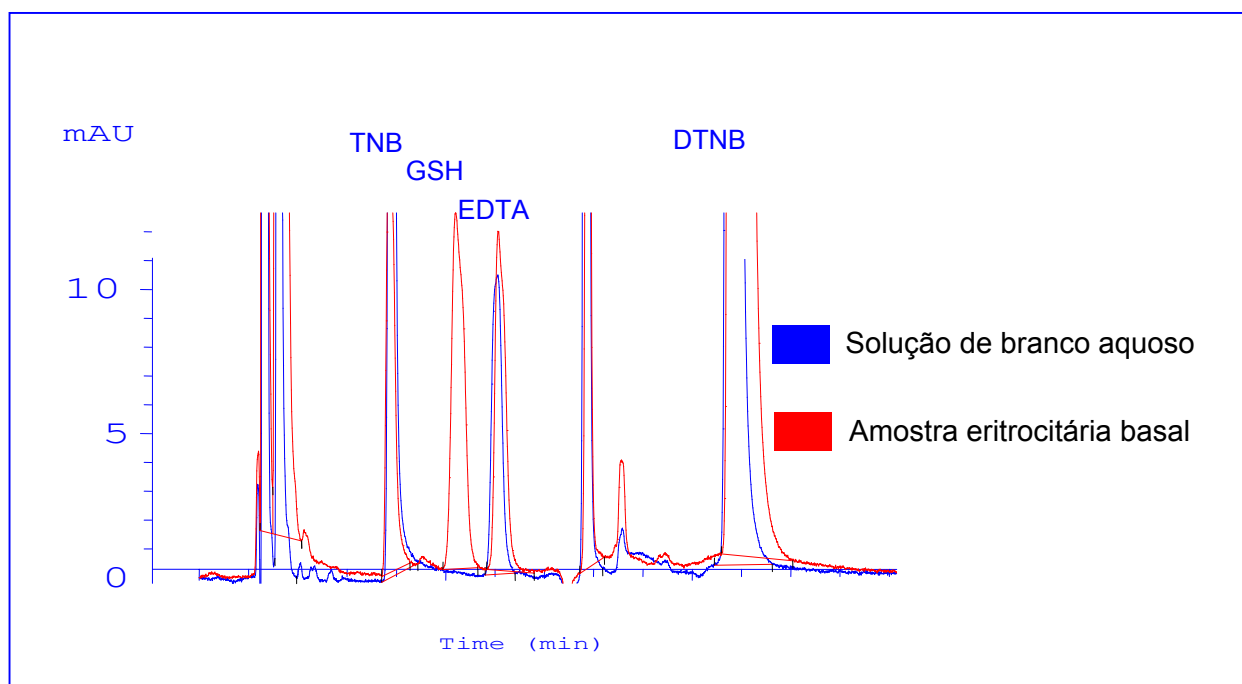


FIGURA 6 – Avaliação da interferência do SSA na determinação de GSH através da sobreposição dos cromatogramas relativos à solução de branco aquoso e amostra eritrocitária basal após tratamento com SSA 15%.

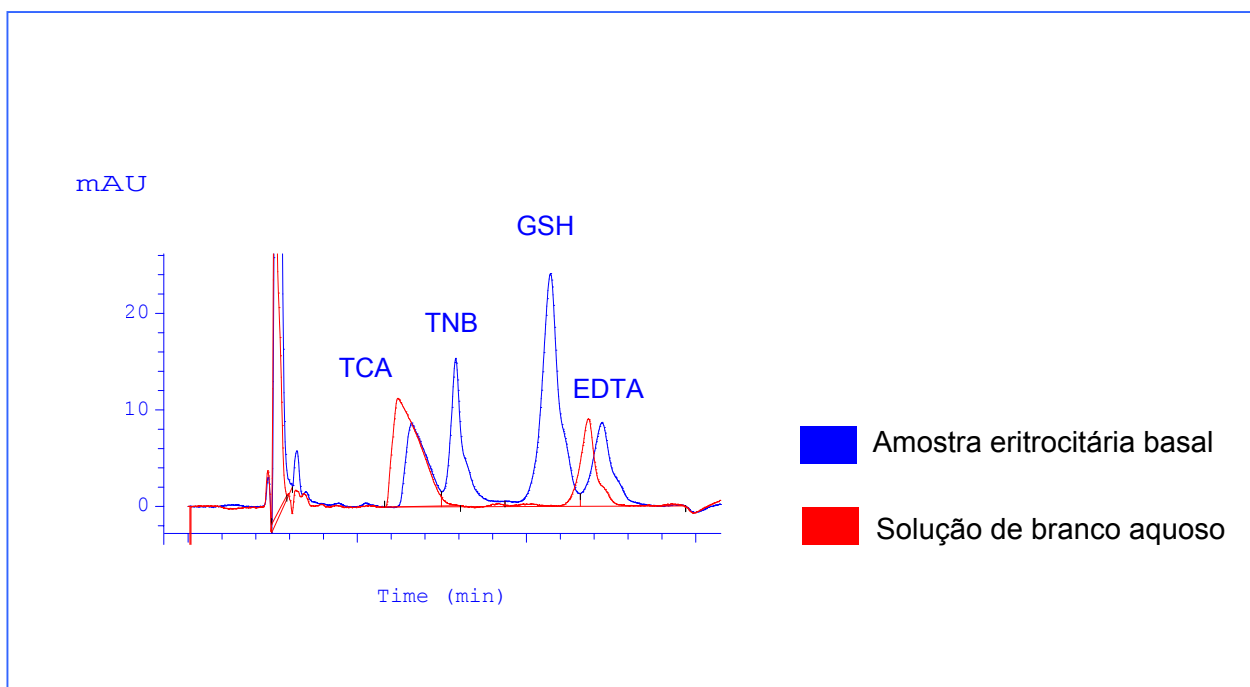


FIGURA 7 – Avaliação da interferência do TCA na determinação de GSH através da sobreposição dos cromatogramas relativos à solução de branco aquoso e amostra eritrocitária basal após tratamento com TCA 15%.

Avaliação da perda de GSH durante a desproteínização.

As condições cromatográficas foram às mesmas utilizadas na avaliação das interferências cromatográficas.

Testes foram realizados com SSA 15% e TCA 15%; adição de 0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM de GSH no eritrócito foi realizada de acordo com a Tabela 8.

As áreas dos picos cromatográficos resultantes da injeção de amostras do eritrócito processado foram comparadas com as áreas obtidas a partir de injeção direta de padrão aquoso de GSH nas mesmas concentrações que as adicionadas ao eritrócito.

Na desproteínização com SSA 15%, verificou-se perda de 36, 59 e 63% correspondentes às concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mM de GSH adicionadas aos eritrócitos (Figura 8). A desproteínização se mostrou drástica de forma que o analito, provavelmente, tenha ficado preso ao precipitado.

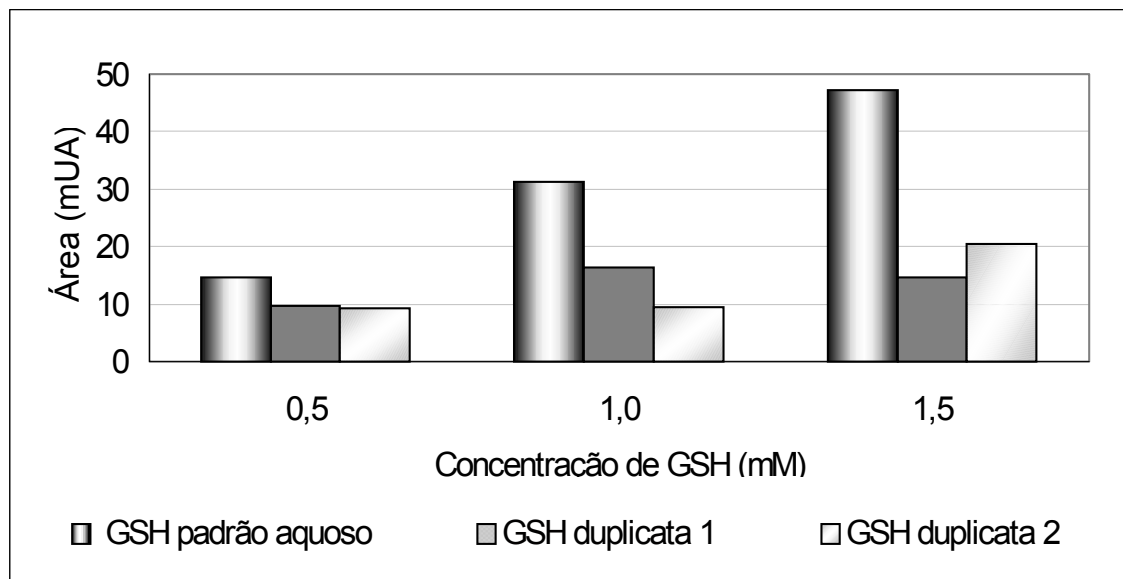


FIGURA 8 – Desproteínização com SSA 15%, avaliação da perda de GSH adicionada aos eritrócitos comparando-se com as correspondentes áreas dos padrões aquosos.

Assim, o SSA foi descartado no procedimento da desproteinização do hemolisado, diluição 1:2,42, para a determinação da GSH.

Na desproteinização com TCA 15%, foi verificada muito pequena, de 0,5% de GSH adicionada aos eritrócitos, (Figura 9). Além disto, observou-se linearidade entre os três pontos testados (Figura 10).

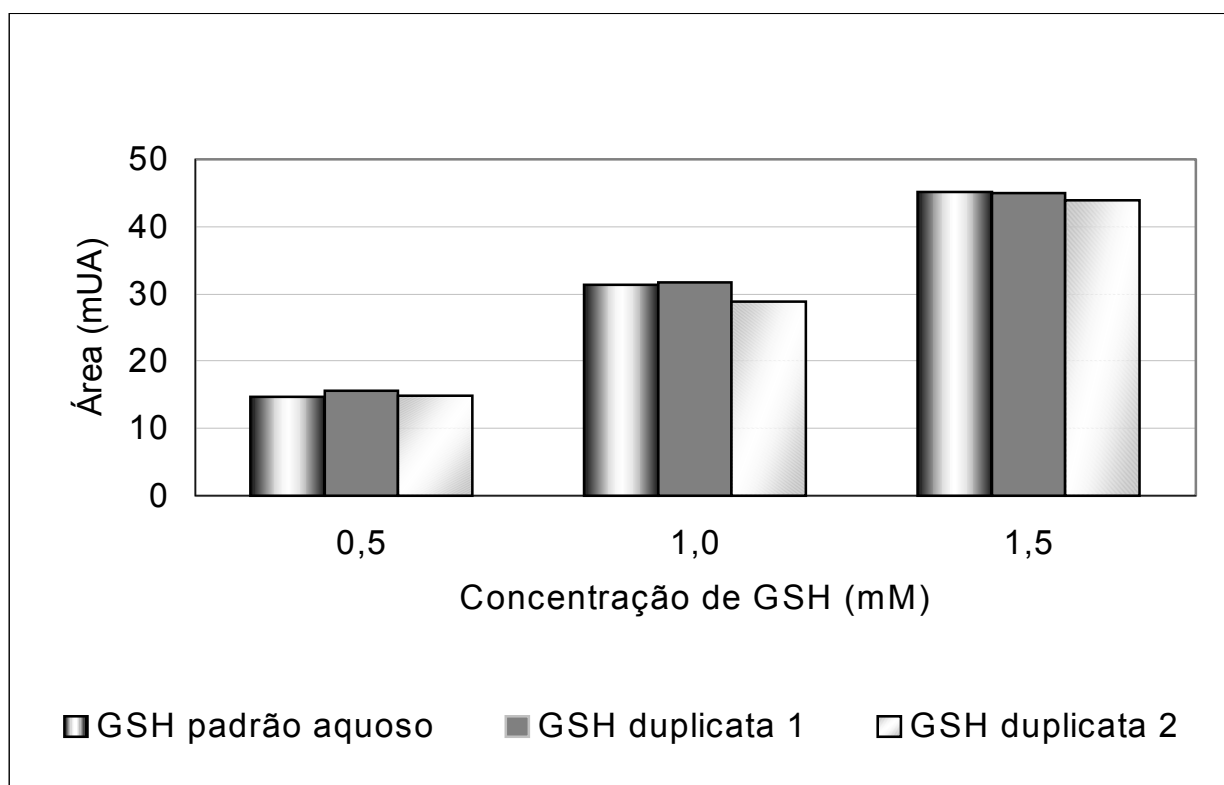


FIGURA 9 – Desproteinização com TCA 15%, avaliação da perda de GSH adicionada aos eritrócitos comparando-se com as correspondentes áreas dos padrões aquosos.

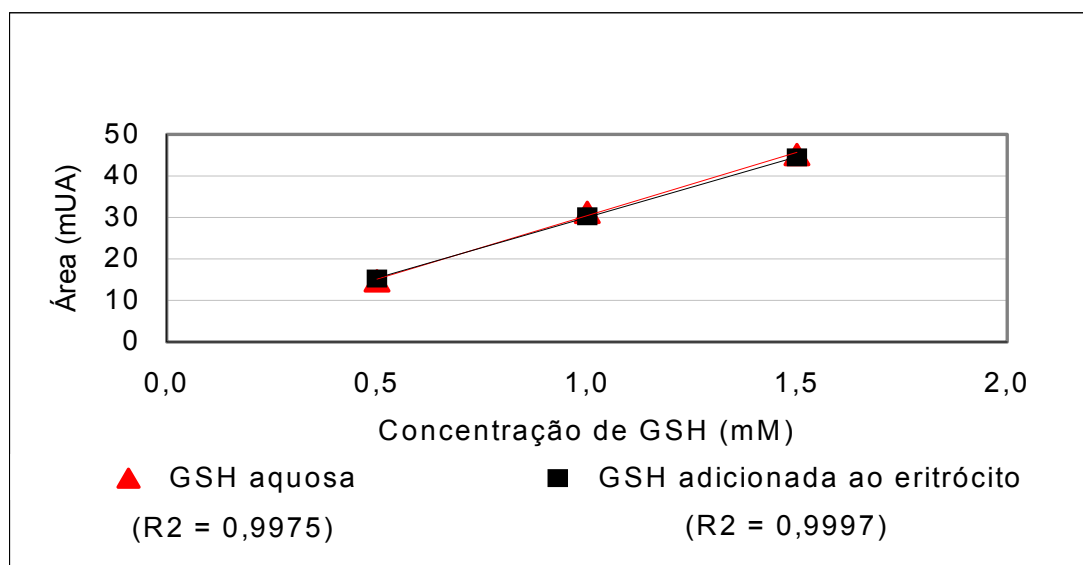


FIGURA 10 – Desproteínização com TCA 15%, GSH adicionada aos eritrócitos e avaliação da linearidade comparando-se com as correspondentes áreas dos padrões aquosos.

Diante dos resultados obtidos, observou-se que não houve interferência cromatográfica ou perda de GSH adicionada nos eritrócitos quando desproteínizados 15%. Desta forma, o TCA 15% foi utilizado para a validação com TCA do método.

4.5 Validação

A validação de um método assegura a credibilidade deste durante a rotina laboratorial, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (ICH, 1994).

O objetivo da validação foi demonstrar que o método otimizado apresentou-se apropriado para a determinação quantitativa da GSH em eritrócitos humanos através da avaliação dos parâmetros de desempenho analíticos: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade.

As condições cromatográficas adotadas foram: coluna cromatográfica de fase reversa Eurospher-100 C18, 5 μm , 150 x 4 mm integrada à pré-coluna Eurospher-100 C18, 5 μm , 5mm x 4 mm, temperatura 39°C; alça de amostragem de 20 μl ; fase móvel constituída por KH_2PO_4 25 mM, pH 3,83: metanol; eluição por gradiente (Tabela 6) e comprimento de onda 330 nm.

4.5.1 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2003).

Avaliou-se a linearidade através da curva de adição de GSH em eritrócitos humanos. Uma vez que a GSH se encontra normalmente nos eritrócitos, nível basal, a área referente a injeção da amostra foi considerada concentração zero e as concentrações adicionadas correspondentes à área do nível basal mais a área correspondente ao adicionado.

A Figura 11 mostra os sinais de cromatogramas sobrepostos correspondentes aos sinais da amostra basal e com adição de GSH 0,5 e 1,5 mM. Observou-se o aumento da resposta em função da quantidade de GSH adicionada ao eritrócito. A Figura 12 mostra o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9998$, muito próximo de 1, caracterizando a linearidade deste método.

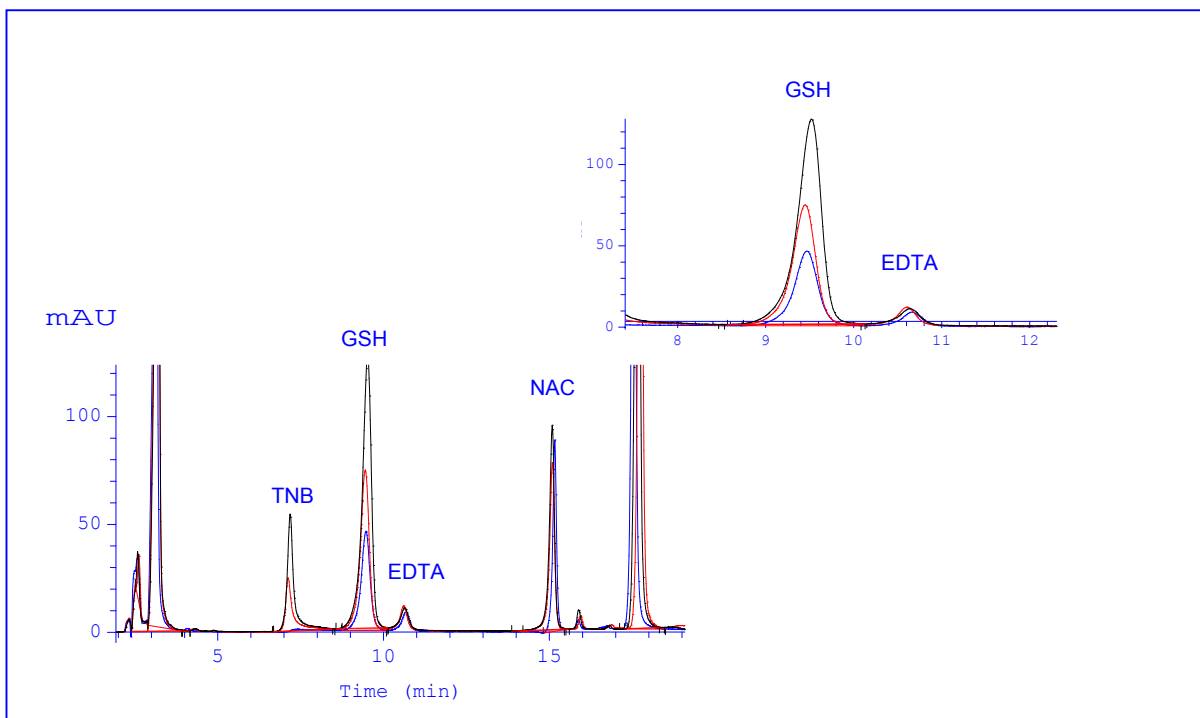


FIGURA 11 – Cromatogramas sobrepostos correspondentes à curva analítica com adição de padrão de GSH nos eritrócitos; nível basal, adição de 0,5 e 1,5 mM.

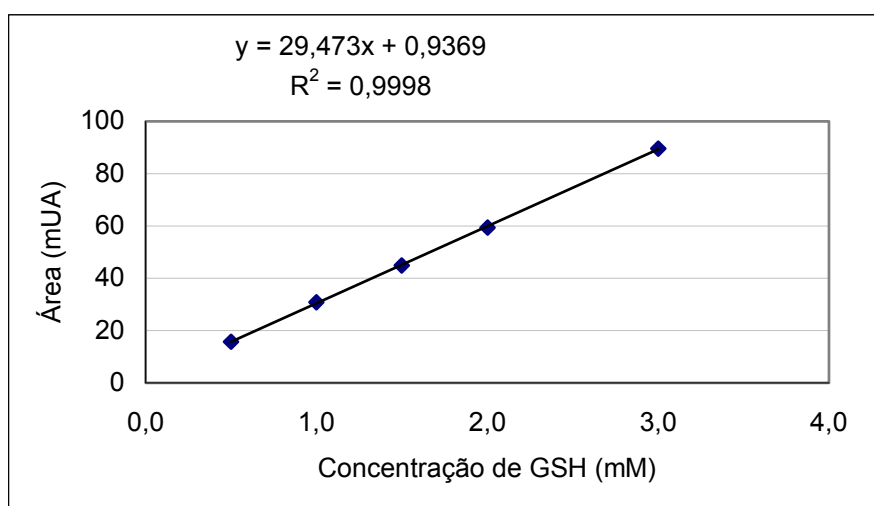


FIGURA 12 – Demonstração gráfica da curva analítica com adição de padrão de GSH nos eritrócitos (n=5); nível basal e adição de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH.

A curva aquosa, representada na Figura 13, foi obtida através de injeção direta de padrão aquoso de GSH após derivação, como mostra a Tabela 1. A média das áreas das curvas analíticas (n=5) foram correlacionadas com suas respectivas concentrações. As concentrações foram iguais às aquelas adicionadas ao eritrócito na curva analítica com adição de padrão 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM. Observou-se linearidade representada por $r^2 = 0,9986$. Esta curva foi utilizada para determinação dos parâmetros da curva com adição de GSH na matriz, onde as respostas entre ambas foram comparadas e associadas à respectiva concentração adicionada ao eritrócito.

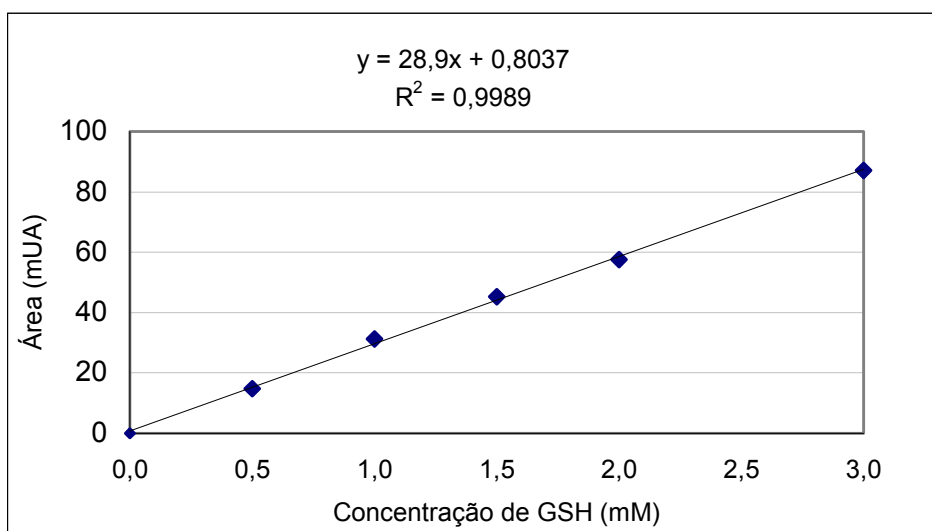


FIGURA 13 – Demonstração gráfica da curva aquosa de GSH (n=5); branco e concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH.

4.5.2 Seletividade

É a capacidade em um método instrumental de separação de avaliar as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa amostra. Para demonstrar isto, foram identificados os tempos de retenção de outros tióis que também reagem com o DTNB e comparou-se com o tempo de retenção da GSH.

Os outros tióis foram derivados separadamente e cada solução foi injetada para estabelecimento prévio dos tempos de retenção e posteriormente todos contidos na mesma solução, inclusive a GSH, foram derivatizados e injetados, o cromatograma obtido está na Figura 14.

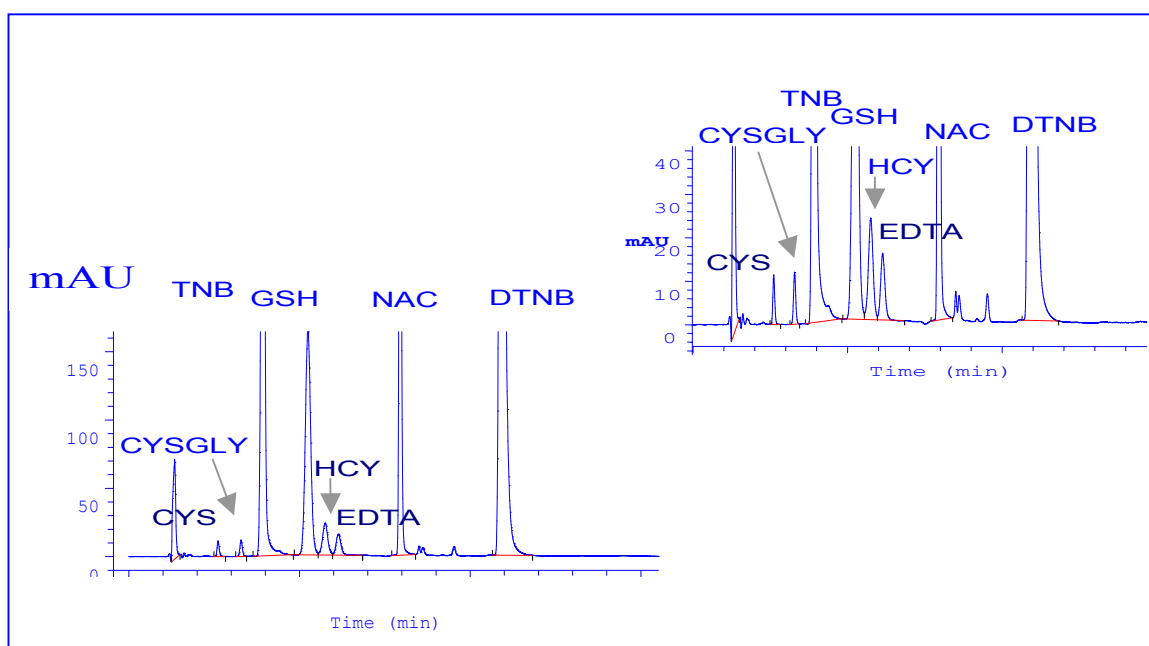


FIGURA 14 – Demonstração da seletividade utilizando solução de padrões aquosos com outros tióis que reagem com o DTNB. Tempos de retenção: CYS 3,08; CYSGLY 3,98; TNB 4,73; GSH 6,46; HCYS 7,16; EDTA 7,58; NAC 8,89 e DTNB 9,98 minutos.

A Cisteína (CYS), a cisteinilglicina (CYSGLY), a homocisteína (HCYS) e a n-acetilcisteína (NAC) apresentaram tempos de retenção diferentes da GSH, demonstrando a seletividade do método para a quantificação deste analito. Estes tióis se encontram em concentrações muito baixas no eritrócito e são essencialmente plasmáticos (Yoshida, 1996; Andersson et al., 1993); no entanto, a demonstração gráfica da separação destes é importante caso estejam na amostra como contaminantes.

4.5.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, calculada como o coeficiente de variação (CV%) entre as medidas.

A precisão foi calculada como o coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas dentro de um dia (intra-dia) e entre diferentes dias (inter-dia) de procedimento e análise.

Repetibilidade ou precisão intra-dia.

A coleta, processamento do sangue e a quantificação da GSH adicionada ao eritrócito, concentrações 0,5; 1,5 e 3,0 mM, foram realizadas em duplicata (n=6) nas mesmas condições e no mesmo dia. Os dados expressos na Tabelas 19 são referentes a todas as medidas de cada amostra preparada.

TABELA 19 – Precisão intra-dia, concentrações de GSH em mM recuperadas da amostra através do método de adição de padrão (n=6).

Adição (mM)	Duplicata 1 (mM)		Duplicata 2 (mM)			Média(mM) ± S	CV%	
0,5	0,54	0,46	0,48	0,45	0,49	0,45	0,48 ± 0,03	6,90
1,5	1,52	1,46	1,58	1,44	1,37	1,65	1,50 ± 0,10	6,64
3,0	3,11	2,99	3,12	3,34	3,58	3,82	3,33 ± 0,32	9,65

A precisão intra-dia apresentou um CV% entre 6,64 e 9,65%, mostrando que o método é preciso para a análise de GSH em eritrócitos, pois considera-se precisão metodológica satisfatória a obtenção de CV% ± 15 em validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas (Causon, 1997).

Precisão intermediária ou precisão inter-dia.

As amostras sanguíneas foram obtidas de cinco diferentes voluntários pois o analito não é estável, caso contrário deveria ser a mesma amostra. As preparações, GSH adicionada ao eritrócito nas concentrações 0,5; 1,5 e 3,0 mM, foram realizadas em duplicata em cinco dias por diferentes analistas e injetadas em triplicata. A precisão inter-dia considerando todas as medidas, mostrou um CV% 7,67; 4,60 e 6,73%, respectivamente. O método se apresentou preciso para quantificação de GSH em eritrócitos em diferentes dias e por diferentes analistas com CV% ± 15 (Causon, 1997).

4.5.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, adição de padrão, ensaios de recuperação e porcentagem bias (% bias).

O cálculo da exatidão do método, dado em bias%, foi realizado a partir dos resultados obtidos em cinco diferentes dias de preparação da amostra. Curvas com adição de GSH no eritrócito (n=5), concentrações 0,5; 1,5 e 3,0 mM de GSH resultaram em bias% de -6,38; 1,32 e 4,05%, respectivamente. Considera-se exatidão metodológica satisfatória a obtenção de bias% ± 15 em validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas (Causon, 1997). O método otimizado, portanto, apresentou exatidão para quantificação de GSH em eritrócitos com bias% < 10%.

4.5.5 Recuperação

A recuperação (R%) realizada a partir de cinco preparações em duplicata com adição de GSH no eritrócito em cinco diferentes dias, foi 94,1; 102,4 e 104,5% para as concentrações 0,5; 1,5 e 3,0 mM. Em validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas, considera-se recuperação metodológica satisfatória a obtenção de R% dentro de $\pm 15\%$ da concentração esperada para o analito (Causon, 1997). A recuperação acima de 90% demonstra que a GSH adicionada se mantém estável durante o processamento da amostra, demonstrando, juntamente com os outros parâmetros, que o método pode ser utilizado para quantificação de GSH no eritrócito.

4.5.6 Limite de detecção e limite de quantificação

A solução de branco aquoso isenta de GSH foi preparada a partir do procedimento de derivação segundo mostra a Tabela 1, no lugar da solução de GSH usou-se solução de EDTA 0,3 mM.

As áreas obtidas a partir das injeções da solução de branco aquoso (n=10) foram: 0,1; 0,09; 0,15; 0,12; 0,11; 0,12; 0,08; 0,09; 0,15; 0,14. O desvio padrão absoluto foi de (S) 0,03.

Análise direta de solução aquosa de GSH derivada com DTNB, concentrações 0,015; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mM foi realizada. A equação da reta obtida foi $y = 31,3 x - 0,34$, em que o coeficiente angular, IC, é 31,3 e o coeficiente de correlação 0,999.

O limite de detecção (LD) foi calculado segundo a equação: $LD = S_a \times 3 / IC$. Desta forma, $0,03 \times 3 / 31,326$, obteve-se 0,0024 mM de GSH.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado segundo a equação: $LQ = S_a \times 10 / IC$. Desta forma, $0,03 \times 10 / 31,326$, obteve-se 0,0081 mM de GSH.

A partir da determinação destes valores observamos que o método é sensível para concentrações muito baixas de GSH, na ordem de 0,01 mM.

4.5.7 Robustez

Durante a validação do método ocorreram variações das condições analíticas: foram utilizados diferentes lotes de colunas cromatográficas, diferentes marcas de reagentes, fase móvel com pequenas variações no pH de 3,83 a 3,78; amostras provenientes de diferentes indivíduos e diferentes analistas. Diante dos resultados encontrados durante a validação, o método se mostrou confiável para a quantificação da GSH sob diferentes condições analíticas.

4.5.8 Estabilidade

Avaliou-se a estabilidade da GSH:

- ❖ derivada nas soluções aquosas de 1 mM;
- ❖ nas soluções estoque de padrão aquoso de 20 mM;
- ❖ no sangue total;
- ❖ no sobrenadante ácido;
- ❖ derivada no sobrenadante ácido.

Soluções de padrão aquoso.

Nas determinações (n=5) da GSH 1 mM a partir da 20 mM, em solução aquosa de EDTA 0,3 mM, mantida a -20°C por 24 horas observou-se perda de 26% de área em relação àquela GSH derivada e injetada imediatamente. Os resultados mostram que a GSH em solução aquosa de 1mM é instável mesmo após derivação.

A GSH na solução estoque de 20 mM mantido a -20°C , mostrou-se estável por um período de 2 meses após o preparo em solução de EDTA 0,3 mM.

Sangue total.

O sangue total, mantido de 0 a 4°C , apresentou 15% de perda de área de GSH, quatro horas após a coleta quando comparada àquela processada imediatamente. Este resultado demonstrou, juntamente com outros trabalhos (Roberts & Agar, 1971; Kleinman & Richie, 2000) que o tratamento da amostra é um ponto crítico na análise da GSH.

Sobrenadante ácido.

Nas amostras de eritrócitos preparados em duplicata, onde foi adicionado 1 mM de GSH e desproteinizadas com TCA 15% (dissolvidos ou não em solução de EDTA 0,3 mM), a GSH foi derivada. As soluções foram injetadas no primeiro e segundo dia após obtenção do sobrenadante ácido, sendo mantidas a -20°C . Observou-se diferença entre a média das áreas dos picos cromatográficos de cada duplicata, como mostra a Tabela 20.

TABELA 20 – Estabilidade da GSH no sobrenadante ácido e influência do EDTA, resultado dado em área do pico cromatográfico.

Sobrenadante ácido	Área média (mUA)		
	Derivação no dia 1	Derivação no dia 2	Perda (%)
Sem EDTA (n=2)	26,38	12,75	52
Com EDTA (n=2)	26,54	18,80	29

O EDTA melhorou a estabilidade da GSH na matriz desproteïnizada, mas seu efeito não foi efetivo, uma vez que houve perda de 29% da área da GSH em 24 horas a -20°C .

GSH derivada no sobrenadante ácido.

As áreas correspondentes a GSH derivada com DTNB, proveniente das amostras de eritrócitos processadas imediatamente, desproteïnizadas com TCA 15% (dissolvido em solução de EDTA 0,3 mM), foram determinadas. Os valores obtidos em área média \pm desvio padrão foram de $11,93 \pm 0,60$; $23,21 \pm 1,33$ e $31,84 \pm 1,15$, para o nível basal, adição de 1 e 2 mM, respectivamente. Obteve-se média de 103% de área relacionando-se os demais dias com o primeiro, considerado 100%. Observou-se, assim, que a GSH derivada se manteve estável por um período de trinta dias a -20°C , como mostra a Figura 15.

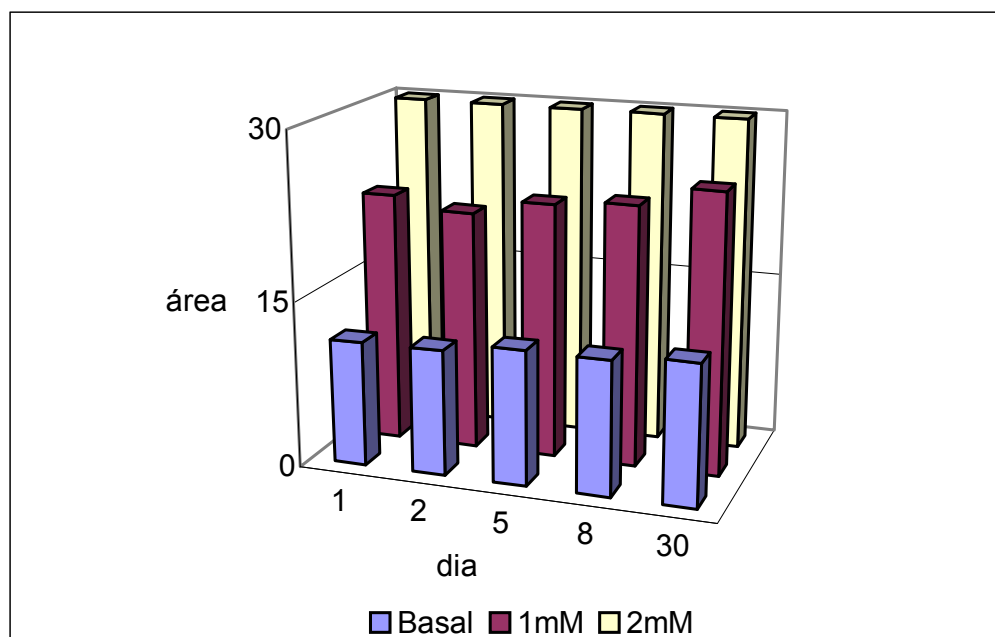


FIGURA 15 – Estabilidade da GSH derivada com DTNB no sobrenadante ácido, mantida a -20°C (áreas médias \pm desvio padrão: nível basal $11,93 \pm 0,60$; adição de 1 mM $23,21 \pm 1,33$ e adição de 2 mM $31,84 \pm 1,15$).

Diante dos resultados obtidos, observou-se que a GSH não é estável no sangue total (0 a 4°C /4horas), nem no sobrenadante ácido (a -20°C /24 horas), exigindo então a derivação com DTNB, forma que se manteve estável por um período de trinta dias.

O estudo da estabilidade de um analito é importante para maior segurança dos resultados obtidos na análise. Diminuições da concentração de até 10% são comumente aceitas como se a amostra mantivesse a integridade do analito.

Além disso, sendo a GSH estável quando derivada com o DTNB, análise pode ser realizada, com segurança, dentro de trinta dias após a coleta e derivação da amostra.

De acordo com o que se observou no trabalho realizado, um método analítico para quantificação de GSH requer cuidados especiais. O tipo de amostra biológica utilizada e a forma de seu processamento são pontos críticos na análise.

A instabilidade química da GSH após coleta pôde ser minimizada com a separação, em baixa temperatura, dos eritrócitos do plasma. A oxidação foi diminuída, provavelmente, por que a troca metabólica entre eritrócito, enzimas e outras proteínas plasmáticas foi prevenida, estando de acordo com estudo prévio o qual demonstrou diminuição no nível da GSH em função do tempo devido à atividade enzimática no plasma (Andersson et al., 1999). A recuperação satisfatória da GSH adicionada aos eritrócitos, de 94%, representou que o processamento da amostra foi adequado, pois a GSH se manteve estável após a coleta até derivação com DTNB.

O DTNB, que foi utilizado por Kleinman & Richie(2000) como estabilizante da GSH, não permitiu a sua detecção eletroquímica. A vantagem do método otimizado está na possibilidade de determinar a GSH por CLAE-UV derivada com DTNB que também age como agente estabilizante do analito. Através dos testes de estabilidade realizados de forma sistemática, a derivação pré-coluna com DTNB, imediatamente após o processamento da amostra, manteve a estabilidade da GSH por um período de um mês a -20°C o que torna o método seguro, sem o risco de perda do analito até a injeção no cromatógrafo.

A solução salina de KH_2PO_4 da fase móvel teve sua concentração diminuída para 25 mM quando comparada com trabalho prévio que utilizou 100 mM (Katrusiak et al., 2001), desta forma, não foi observado dano nos pistões do cromatógrafo.

Katrusiak et al. (2001) utilizaram temperatura de 35°C na coluna cromatográfica e eluição isocrática realizada em duas fases, através de um complexo sistema que permitisse a eluição do analito e reequilíbrio da coluna. No trabalho otimizado e validado, a temperatura foi modificada para 37°C e a eluição foi realizada por gradiente, através de uma bomba quaternária de solventes, o que simplificou o trabalho com um tempo de corrida de 25 minutos.

4.6 Aplicação do método e análise estatística

Sabe-se que em algumas patologias ou em situação de estresse oxidativo há alteração dos níveis de GSH sangüínea. Procurou-se aplicar o método otimizado e validado para a análise de amostras de indivíduos com insuficiência renal crônica e submetidos ao tratamento regular de hemodiálise, grupo I (n=20), comparando com um grupo controle, grupo II (n=10), indivíduos que não apresentavam problemas renais.

Os resultados foram expressos em mmol de GSH/L de eritrócitos e μmol GSH no sangue total/gHb, quando considerados os índices hematimétricos: hematócrito e hemoglobina. A multiplicação da quantidade de GSH em mM no eritrócito pelo valor absoluto do hematócrito avalia a hemodiluição e a divisão pela concentração de hemoglobina no sangue total considera o equilíbrio dos níveis fisiológicos da hemoglobina no estado reduzido, que é realizada pela GSH. Esta forma de apresentar os resultados considera a variabilidade interindividual, como por exemplo, a presença de anemia nos pacientes para posterior comparação entre estes e os indivíduos do grupo controle.

Os resultados obtidos foram analisados através de teste T de Student para amostras independentes. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$. Os resultados encontram-se na Tabela 21.

TABELA 21 – Concentrações de GSH, Hb e Ht em pacientes sob tratamento de hemodiálise e indivíduos pertencentes ao grupo controle.

		Hb (g/dL)	Ht%	GSH (mM Ert ^a)	GSH ($\mu\text{mol/gHb}$)
Controle (n=10)	Média \pm S	13,50 \pm 0,94	42,40 \pm 2,41	1,96 \pm 0,45	6,17 \pm 1,48
Pacientes (n=20)	Média \pm S	11,33 \pm 1,65*	36,75 \pm 5,08*	2,30 \pm 0,29*	7,52 \pm 1,15*

^a eritrócito; * $p \leq 0,05$. Resultados dados em média \pm desvio padrão.

A média dos valores de GSH encontrados no grupo controle (n=10) neste estudo, $6,17 \pm 1,48 \mu\text{mol/gHb}$, está de acordo com a literatura em estudo randomizado de indivíduos (n=396) onde a média e desvio encontrados foram $6,93 \pm 0,98 \mu\text{mol/gHb}$ (Inal et al., 1996)

A Tabela 21 apresenta os valores de p de todos os parâmetros analisados. Observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos em todos os parâmetros. No grupo dos pacientes, a hemoglobina e o hematócrito foram significativamente menores que no grupo controle, no entanto, a concentração de GSH em mM no eritrócito foi significativamente maior. Da mesma forma, independente dos índices hematimétricos, o resultado em μmol de GSH/gHb foi significativamente maior no grupo dos pacientes sob tratamento regular de hemodiálise.

Estudos prévios, sobre o aspecto da suplementação com multinutriente contendo vitaminas, mostraram aumento significativo dos níveis de GSH eritrocitária e da atividade da glutathiona peroxidase e da catalase (Cheng et al., 2001), e que algumas vitaminas B podem ter um importante papel nos sistemas antioxidantes celulares (Hu et al., 1995; Cabrini et al., 1998; Suliman et al., 1999). Através do questionário realizado, observou-se que 70% dos pacientes estavam sob uso de vitaminas do complexo B.

Quanto à administração de eritropoietina, estudo prévio mostrou que a diferença entre a concentração da GSH sangüínea em $\mu\text{mol/gHb}$ não foi estatisticamente significativa em pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise, tratados ou não tratados com eritropoietina, quando comparados com grupo controle (Cristol et al., 1997). No nosso estudo, a média dos valores de GSH em $\mu\text{mol/g Hb}$ do grupo dos pacientes foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) que a média do grupo controle. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Turi et al. (1992), que encontraram uma pequena, embora constante, elevação nos níveis de GSH em $\mu\text{mol/gHb}$ durante a terapia com eritropoietina. A partir dos dados obtidos pelo questionário realizado, observou-se que em 75% dos pacientes se administrava este medicamento.

Os resultados mostram que os pacientes analisados apresentam níveis de GSH significativamente maiores que os indivíduos do grupo controle e que 70% e 75% destes pacientes estavam sob administração de vitaminas do complexo B e de eritropoietina, respectivamente.

5 CONCLUSÃO

Um método para a quantificação de GSH por CLAE-UV em eritrócitos humanos foi otimizado. Condições para o tratamento da amostra biológica como hemólise e desproteinização eficientes, bem como as cromatográficas foram estabelecidas. Um tempo de análise considerado curto para cromatografia líquida de alta eficiência, de 25 minutos, foi obtido. Estabeleceu-se que no sobrenadante desproteinizado com TCA 15% seguido de derivação com DTNB, mantido à -20°C , a GSH se manteve estável por um mês. A complexidade da matriz não demonstrou problemas na análise com o tratamento da amostra biológica realizado, além disso, a instabilidade química da GSH foi adequadamente minimizada. O sistema cromatográfico consistiu de uma coluna em fase reversa C18 e detecção por ultravioleta. O derivatizante, DTNB, é de baixo custo quando comparado aos fluorescentes. Permitiu-se, desta forma, otimizar uma metodologia, com sistema cromatográfico, viável para a implantação na maioria dos laboratórios.

Os parâmetros avaliados como linearidade, seletividade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade da GSH, mostraram através dos seus resultados que o método foi validado e permite a análise da GSH em amostras sangüíneas em rotina laboratorial de forma exeqüível e confiável.

A aplicação do método foi realizada em amostras sangüíneas de indivíduos saudáveis e de pacientes com insuficiência renal crônica submetidos ao tratamento regular de hemodiálise. Os resultados obtidos mostraram que os valores de GSH nos eritrócitos dos indivíduos saudáveis foram concordantes com os previamente estabelecidos na literatura. Os pacientes apresentaram níveis de GSH significativamente elevados, porém a maioria recebia suplementação vitamínica e eritropoietina.

A metodologia otimizada e validada permite a quantificação de GSH em amostras sangüíneas de diferentes indivíduos com variação de idade e condições fisiopatológicas, mostrando-se útil para posteriores estudos experimentais e ambulatoriais envolvidos no estresse oxidativo.

6 APÊNDICES

APÊNDICE 1

QUESTIONÁRIO

DATA:...../...../.....

NOME:.....

PRONTUÁRIO (N°):.....

Grupo: () Controle () Estudo

Sexo: () F () M

Idade:

Precedentes familiares para doenças vasculares: () sim () não

Tempo de hemodiálise:

Tabagismo: () fumante () não fumante () ex-fumante

Uso de álcool Diariamente: () sim () não

Esporadicamente: () sim () não

Diabetes: () sim () não

Pressão alta: () sim () não

Medicamento antihipertensivo:.....

Dislipidemia: () sim () não

Creatinina sérica níveis encontrados:

Hemoglobina níveis encontrados:

Eritropoietina: () sim () não. Posologia:.....

Exercícios físicos: () sim () não. Frequência:.....

Multivitaminas: () sim () não. Qual?.....

Ácido fólico: () sim () não

Vit B12: () sim () não

Vitamina E: () sim () não

Vitamina C: () sim () não

Outros medicamentos: () uso contínuo () uso esporádico

Listar:.....
.....

Obs:.....
.....

.....

Ass. responsável pela coleta de dados.

APÊNDICE 2

Determinação da hemoglobina por espectrofotometria.

Baseado em método reconhecido pelo ICSH–*International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH, 1977).

Preparo do Reativo de Drabkin:

Cianureto de potássio (tóxico).....	0,05g
Ferricianeto de potássio.....	0,20g
Bicarbonato de sódio (Na ₂ CO ₃).....	1g
Água destilada qsp.....	1000mL

Características da solução e conservação:

- ❖ Cor amarela pálida e de aspecto límpido.
- ❖ Conservação em frasco escuro (evitar a luz).
- ❖ Conservação em local fresco (preferência na geladeira).
- ❖ Conservação em temperatura não maior do que 30°C.
- ❖ Estabilidade de 1 mês

Método da Cianometemoglobina.

Mediu-se exatamente 5mL do Reativo de Drabkin e colocou-se num tubo de hemólise;

Acrescentou-se 20 µL de sangue com EDTA, medindo em pipeta. O excesso de sangue no exterior da pipeta foi removido com papel absorvente;

Lavou-se três vezes a pipeta com diluente e misturou-se o sangue no líquido;

Deixou-se em repouso esta mistura por 5 a 10 minutos para desenvolvimento da cor (transformação da hemoglobina em cianometemoglobina);

Realizou-se leitura em filtro verde ou 540 nm;

A transmitância foi ajustada a 100% com reativo de Drabkin.

Cálculo da concentração em g.dL^{-1} :

Utilizou-se a equação da reta de calibração construída com as concentrações conhecidas de hemoglobina total 9,7; 11,8; 16 g.dL^{-1} . As respectivas absorvâncias médias obtidas foram 0,201; 0,229; 0,297.

O coeficiente de correlação linear $r^2 = 0,998$, e equação da reta de calibração $y = 0,0154x + 0,0502$.

APÊNDICE 3

Determinação do hematócrito (micro-hematócrito).

Baseado no método reconhecido pelo ICSH–*International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH, 1982).

Aspirou-se, por capilaridade, um pequeno volume de sangue total em EDTA em tubo capilar não graduado, com 75 mm de comprimento e 1,2mm de diâmetro interno, deixando vazios cerca de 15 mm;

Selou-se a extremidade, distante da coluna de sangue, pelo calor;

Centrifugou-se por 5 minutos a 7000 RPM em uma centrífuga pequena, especialmente projetada para esse fim;

Separou-se a coluna de sangue em eritrócitos e plasma, com uma pequena camada de leucócitos e plaquetas na interface.

O hematócrito foi lido em escala apropriada, excluindo-se da leitura a camada de leucócitos e plaquetas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, J. L.; HOOPER, W. C.; JONES, D. P. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 115-121, 2005.

ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. **Journal Biological Chemistry**, v. 255, p. 9530-9533, 1980.

ANDERSSON, A. et al. Homocysteine and Other Thiols Determined in Plasma by HPLC and Thiol-Specific Postcolumn Derivatization. **Clinical chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1590-1597, 1993.

ANDERSSON, A. et al. Thiols as a measure of plasma redox status in healthy subjects and in patients with renal or liver failure. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1084-1086, 1999.

ASENSI, M. et al. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 217, p. 323-328, 1994.

BAEYENS, W. et al. HPLC determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical preparations after pre-column derivatization with Thiolyte MB using fluorescence detection. **Analytical Letters**, v. 21, p. 741-757, 1988.

BEUTLER, E. The glutathione instability of drug-sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 49, n. 1, p. 84-95, 1957.

BEVILACQUA, F. et al. **Fisiopatologia Clínica**. 5ª edição. São Paulo, Atheneu, 1995. Cap. 10, p. 401-452.

BLAKE, D. R.; RALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 45, p. 371-385, 1987.

BOHRER, D.; NASCIMENTO, P. C. On-line deproteinization by adsorption of proteins on a polyethylene powder pre-column for the determination of Na, K, Mg and Ca in human serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 750, p. 61-69, 2001.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

CABRINI, L. et al. Vitamin B6 deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart. **Biochemistry Molecular Biology**, v. 46, p. 689-697, 1998.

CARRU, C. et al. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1716-1721, 2002.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, p. 3-862, 1994.

CHENG, T. et al. Effects of multivitamin supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 388-395, 2001.

COTGREAVE, I. A.; MOLDEUS P.; ORRENIUS. Host defense mechanism against prooxidants. **Review Pharmacology Toxicology**, v. 28, p. 189-212, 1988.

CRISTOL, J. P. et al. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis : beneficial effects of vitamin E supplementation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 12, n 11, p. 2312-7, 1997.

DE VEGA, L. et al. Study of the activity of glutathione-peroxidase, glutathione-transferase, and glutathione-reductase in renal transplants. **Transplantation Proceedings**, v. 35, p. 1346-1350, 2003.

DUMASWALA, U.J. et al. Glutathiones protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 280, p. 867-873, 2001.

FREEMAN, B. A.; GRAPO, J. D. Biology of disease free radicals and tissue injury. **Laboratory Investigation**, v. 47, p. 412-426, 1982.

GARCIA, L. G. et al. Simultaneous determination of four antipsychotic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography. Application to management of acute intoxications. **Journal of Chromatography B**, v. 795, p. 257-264, 2003.

GERGEL, D.; CERBAUM, A. I. Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's Reagent. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 347, n. 2, p. 282-288, 1997.

GILLHAN, B.; PAPACHRISTODOULOU D. K.; THOMAS J. H. **Will's Biochemical Basis of Medicine**. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing, 1997. Chapter 33, p. 343-354.

HAEST, C. W. M.; KAMP, D.; DEUTICKE, B. Formation of disulfide bonds between glutathione and membrane SH groups in human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 557, p. 363-371, 1979.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed. Basel: Karger, 1998.

HAYES, A. W. **Principles and Methods of Toxicology**. 3rd ed. New York, Raven Press, 1994. Chapter 3, p. 81-88.

HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis : implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. **Atherosclerosis**. v. 141, p. 1-15, 1998.

HELBOCK, H. J., BECKMAN, K. B., AMES, B. N. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. **Methods in Enzymology**, v. 300, p. 156-166, 1999.

HIRASAKA, N.; LIANG, X. M.; MUNE, M. Atherosclerosis and vascular calcification in hemodialysis patients. **Clinical Calcium**, v. 14, p. 931-936, 2004

HOFFMAN, M. E.; MELLO FILHO, A. C.; MENEGHINI, R. Correlation between cytotoxic effect of H₂O₂ and the yield of DNA strand break in cells of different species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 781, p. 234-238, 1984.

HU, M. L.; CHEN, Y. K.; LIN, Y. F. The antioxidant and pro-oxidant activity of some B vitamins and vitamin-like compounds. **Chemico-Biological Interactions**, v. 97, p. 63-73, 1995.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Validation of analytical procedures: methodology**. ICH Steering Committee, 1996.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**: Text on Validation of Analytical Procedures. ICH Steering Committee, 1994.

ICSH. **International Committee for Standardization in Haematology**. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977), *Journal Clinical Pathology*, Vol. 31, pp. 139-143, 1978.

ICSH. **International Committee for Standardization in Haematology**. Selected methods for the determination of the packed cell volume. In: van Assendelft OW & England JM, eds. *Advances in Hematological Methods: the blood count*, 1982.

INAL, T. C.; TULI, A.; YUREGIR, G. T. Evaluation of reference values for erythrocyte glutathione. **Clinica Chimica Acta**, v. 256, p. 189-196, 1996.

JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, p. 87-108, 1989.

JIN W.; LI W.; XU Q. Quantitative determination of glutathione in single human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v. 21, n. 774, p. 779, 2000.

KATRUSIAK, A. E. et al. Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cyteinil-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. **Journal of Chromatography B**, v. 758, p. 207-212, 2001.

KEHRER, J. P. The Haber- Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KLEINMAN, W. A.; RICHIE Jr, J. P. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 19-29, 2000.

KOMURO, C. et al. Rapid and simple method for quantitative determination of non-protein sulphhydryls in mouse liver by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 338, p. 209-212, 1985.

KOZER, E.; EVANS, S.; BARR, J. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high-dose paracetamol. **Journal Clinical Pharmacology**, v. 55, p. 234-240, 2002.

LANG, C. A. et al. Erythrocytic glutathione and plasma cysteine status of human immunodeficient patients. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 9, p. 866-869, 2001.

LASH, L. H.; JONES, D. P. Distribution of oxidized and reduced forms of glutathione and cysteine in rat plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 240, n. 2, p. 583-592, 1985.

LEICHTWEIS, S.; JI, L. L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 179, p. 1-10, 2001.

LEITE, H. P.; SAMI, R. S. Radicais Livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica** 2003, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

MILLS, B. J.; LANG, C. A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MILLS, B. J.; RICHIE, J. P. JR.; LANG, C. A. Glutathione disulfide variability in normal human blood. **Analytical Biochemistry**, v. 222, p. 95-101, 1994.

MINOTTI, G.; AUST S. A The Requirement for Iron(III) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n°3, p.1098-1104, 1987.

MOREIRA, P. I. et al. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 4, p. 242-248, 2004.

MORENA, M. et al. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 422-427, 2002.

MOURAD T.; MINK K.; STEGHENS J. Measurement of oxidized glutathione by enzymatic recycling coupled to bioluminescent detection. **Analytical Biochemistry**, v. 283, p. 146-152, 2000.

MUELLER, S. G. et al. Brain glutathione levels in patients with epilepsy measured by in vivo ¹H-MRS. **Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1422-1427, 2001.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 347, p. 353, 1997.

PARTHASARATHY, S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 917, p. 337-340, 1987.

PASAOGLU, H. et al. The role of the oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients. **Clinical Biochemistry**, v. 29, p. 567-572, 1996.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

REEVE, J.; KUHLENKAMP, J.; KAPLOWITZ, N. Estimation of glutathione in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography: separation from cysteine and–glutamylcysteine. **Journal of Chromatography**, v. 194, p. 424-428, 1980.

RICHIE Jr, J. P.; LANG, C. A. The determination of glutathione, cyst(e)ine, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. **Analytical Biochemistry**, v. 163, p. 9-15, 1987.

ROBERTS, J.; AGAR, N. S. An improved method for the automated analysis of erythrocyte reduced glutathione. **Clinica Chimica Acta**, v. 34, p. 471-480, 1971.

ROVER Jr, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

STEMPAK, D. et al. Glutathione stability in whole blood: effects of various deproteinizing acids. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 23, n. 5, p. 542-549, 2001.

SULIMAN, M. E. et al. Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocyte sulfur amino acids in hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p.1287-1296, 1999.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3rd ed. Philadelphia, Taylor & Francis, 2000. Chapter 6, p. 200.

HAYES, A. W. **Principles and Methods of Toxicology**. 3rd ed. New York, Raven Press, 1994. Chapter 3, p. 81-88.

TOYO'OKA, T.; UCHIYAMA, S.; SAITO, Y. Simultaneous determination of thiols and disulfides by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 205, p. 29-41, 1988.

TURI, S. et al. The effect of erythropoietin on the cellular defence mechanism of red blood cells in children with chronic renal failure. **Pediatric Nephrology**, v. 6, p. 536-541, 1992.

VAGIMIGLI, M. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 420, p. 255-261, 2003.

YAVUZ, O. The effect of different dialysis membranes on oxidative stress and selenium status. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, p. 153-60, 2004.

YOSHIDA, T. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 678, p. 157-164, 1996.