

## INFLUÊNCIA DE DESPROTEINIZANTES ÁCIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA ERITROCITÁRIA POR CLAE-UV

Karen L. Schott, Mariele F. Charão, Juliana Valentin, Juniara Cassol e Solange C. Garcia\*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, CP 5061, 97110-970 Santa Maria - RS, Brasil

Valdeci J. Pomblum

Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brasil

Denise Bohrer

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brasil

Recebido em 10/3/06; aceito em 14/6/06; publicado na web em 19/1/07

INFLUENCE OF DEPROTEINIZING ACIDS IN ERYTHROCYTIC REDUCED GLUTATHIONE QUANTIFICATION BY HPLC-UV. Large differences in reduced glutathione (GSH) levels have been found in different investigations, also in healthy people. GSH oxidation *in vitro* has been associated with sample acidification in the presence of oxihemoglobin. In this work, the influence of different acids on GSH determination utilizing HPLC with UV detection was evaluated. The results showed that metaphosphoric acid and sulfosalicylic acid were inadequate for analysis, because metaphosphoric acid showed to be inefficient for deproteinization and with sulfosalicylic acid loss of GSH was observed. Trichloroacetic acid did not effect GSH quantification, since the deproteinized form was immediately derivatized with 5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) acid. Methods with TCA deproteinization presented linear results from 0.5 to 3.0 mM. The correlation coefficient between aqueous curves and GSH spiked RBC exceeded 0.99. Precision calculations showed CV lower than 10% and bias within  $\pm 10\%$  for concentrations of 0.5; 1.5 and 3.0 mM GSH. The recovery was higher than 94%. Moreover, GSH blood concentrations were independent of hemoglobin concentrations.

Keywords: GSH; erythrocytes; deproteinizing acids.

### INTRODUÇÃO

A glutatona, um tripeptídeo contendo cisteína, desempenha importantes funções em células humanas, especialmente como agente antioxidante. A forma reduzida da glutatona (GSH) mantém os grupos tióis (-SH) das proteínas, reduz ligações dissulfetos (-S-S-) induzidas pelo estresse oxidativo, neutraliza radicais livres e detoxifica eletrófilos<sup>1,2</sup>. Por isso, a concentração intracelular da GSH é um indicador da capacidade da célula em manter sua homeostase, através da neutralização de agentes oxidantes.

Na presença de peróxidos, a GSH intracelular é convertida a glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona peroxidase, a qual catalisa a redução destes peróxidos<sup>3</sup>. A redução da GSSG a GSH é mediada pela enzima glutatona redutase, cujo substrato é o NADPH<sup>3</sup>. A glicose-6-fosfato desidrogenase, como fonte de NADPH, garante a redução da GSSG e a manutenção de uma constante da reserva de GSH, especialmente no eritrócito<sup>4</sup>. O nível de glutatona em eritrócitos está principalmente em sua forma reduzida (99,5%) e a concentração de GSSG em eritrócitos é descrita como baixa porque esta atravessa facilmente a membrana celular<sup>5</sup>.

Na avaliação do estresse oxidativo, o uso de eritrócitos é aconselhável, pois durante seu ciclo vital entram em contato com as mais diversas estruturas orgânicas. Os eritrócitos perfazem 40% do volume do sangue e as espécies reativas do oxigênio que saem da célula vermelha têm potencial para causar dano a outros componentes celulares. Em contrapartida, a GSH em eritrócitos é responsável pela homeostase contra o dano oxidativo da própria célula, bem como de todas as outras células do organismo<sup>6</sup>.

Um método de referência para determinação de GSH ainda não

foi definido<sup>7,8</sup>. No decorrer dos anos, vários métodos foram introduzidos para determinação da GSH em amostras biológicas. Métodos baseados em espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e, mais recentemente, métodos baseados em eletroforese capilar e técnicas de ressonância magnética nuclear têm sido descritos<sup>9,10</sup>.

Estudo recente<sup>7</sup> explica os fatores e mecanismos que comumente resultam na oxidação da GSH a GSSG em amostras sanguíneas e que ocorrem na fase pré-analítica. O uso de complexantes da GSH como N-etilmaleimida (NEM)<sup>7</sup> em sangue total para prevenir a oxidação da GSH a GSSG, a hemólise e a desproteinização ácida da amostra são procedimentos pré-analíticos comuns que antecedem a quantificação da GSH no sangue total ou eritrócito<sup>11</sup>. Concentrações alteradas de GSH por artefatos têm sido associadas à acidificação da amostra na presença de oxihemoglobina<sup>12</sup>, da mesma forma que o uso de agentes complexantes da GSH, como NEM<sup>13,14</sup>, no procedimento pré-analítico. Desta forma, para o desenvolvimento de um método confiável, os procedimentos analítico e pré-analítico devem ser otimizados e validados.

É importante destacar que interferentes analíticos na quantificação de GSH também têm influência em medidas de GSSG e, conseqüentemente, na determinação da razão GSH/GSSG como índice de estresse oxidativo. É difícil avaliar com precisão o papel biológico da GSSG, uma vez que vários fatores após a coleta do sangue podem influenciar na sua concentração<sup>7</sup>. Desta forma, a determinação da GSSG e da razão GSH/GSSG em sangue humano como índices de estresse oxidativo tornam-se inexpressivos.

No presente estudo, avaliou-se a influência de diferentes ácidos e a concentração de hemoglobina na estabilidade de GSH eritrocitária, através de sua quantificação por CLAE com detector UV. Pois, um método confiável, reprodutível e exequível para a

\*e-mail: sgarpom@smail.ufsm.br

quantificação de GSH eritrocitária têm importância clínico-laboratorial na avaliação da capacidade antioxidante do eritrócito, bem como para auxiliar no esclarecimento dos fenômenos fisiopatológicos e bioquímicos em patologias associadas ao estresse oxidativo.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Generalidades

O equipamento de CLAE-UV consistiu de um sistema de gradiente cromatográfico Knauer modelo WellChrom, bomba quaternária, sistema organizador de solventes, misturador dinâmico, degaseificador 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 5 x 4 mm; detector UV Knauer; comprimento de onda 330 nm, software Eurochrom 2000 versão 2,05 para Windows; sistema controlador de temperatura para a coluna, Haake FJ.

Utilizou-se o sistema “multipette plus” e “ependorf combitips plus” (Eppendorf, Hamburg, Germany) para dispensação do volume correto de eritrócitos nos tubos de ensaio.

Todas as soluções aquosas foram preparadas em água de Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Os reagentes e outros produtos químicos foram obtidos de diferentes fontes. GSH, ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) e albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido metafosfórico, ácido sulfossalicílico e ácido tricloroacético, Merck (Rio de Janeiro, Brasil); Azul brilhante de Coomassie, Mallinckrodt (St. Louis, USA); metanol grau HPLC, Tedia Company (Fairfield, USA); o reagente de Drabkin foi obtido da Labtest (Brasil).

Soluções estoque de padrões de GSH 20 mM foram preparadas em solução aquosa de EDTA 0,3 mM. Soluções de trabalho, nas concentrações de 0,5 a 3,0 mM de GSH, eram preparadas diariamente a partir da solução estoque.

A participação dos doadores das amostras sanguíneas ocorreu mediante termo de consentimento e aprovação do estudo pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (Registro 091/2003).

### Condições cromatográficas

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, 5 x 4 mm, temperatura de 39 °C; alça de amostragem de 20 µL; eluição por gradiente e detecção em 330 nm.

A fase móvel consistiu de eluentes A e B, solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM, pH 3,83 e metanol, respectivamente. O pH da solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi ajustado a 3,83 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  4 M. A GSH foi derivatizada com DTNB. A análise foi iniciada com a injeção de 20 µL do sobrenadante. O sistema por gradiente iniciou com 88% do eluente A e 12% do B, vazão de 1 mL/min. Após 3 min, a fase móvel foi modificada para 92% de A com vazão de 0,6 mL/min. Aos 4 min e 31 s adotou-se 60% de A com vazão de 0,8 mL/min. Aos 10 min e 31 s até 25 min retornou-se à constituição inicial, ou seja, 88% de A com vazão de 1 mL/min para recondicar a coluna.

### Amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas coletadas em EDTA, 5 mL cada, foram obtidas por punção venosa e mantidas em banho de gelo.

Para avaliação da influência da hemoglobina na determinação da GSH, as amostras de sangue foram obtidas de indivíduos saudáveis

(n=20), número igual de homens e mulheres, com idade entre 40 e 60 anos. Os fatores de exclusão foram tabagismo, etilismo e uso de polivitamínicos. A coleta de sangue foi realizada no Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Os parâmetros sanguíneos, hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e GSH foram determinados em duplicata. O hematócrito foi obtido por microcentrifugação, a hemoglobina foi medida através do método da cianometemoglobina utilizando o reagente de Drabkin e leitura a 540 nm e a GSH foi quantificada por CLAE-UV.

### Processamento da amostra biológica

Separou-se uma alíquota de 1 mL do sangue total para medir hematócrito e hemoglobina. A outra alíquota do sangue, 4 mL, foi utilizada para medir GSH. O processamento das amostras sanguíneas para medida de GSH, desde a coleta até a injeção no sistema cromatográfico, foi realizado a temperatura de 4 °C. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. Os eritrócitos, 300 µL, foram dispensados no tubo de ensaio e receberam 125 µL de solução de EDTA 0,3 mM contendo ou não o padrão de GSH e 300 µL de solução de triton x-100 20% para hemólise. A mistura foi agitada em vortex por 1 min.

### Procedimento para a desproteíntização ácida

Os ácidos metafosfórico (MPA) 5, 10, 15, 20, 30 e 50%; sulfossalicílico (SSA) 5, 10, 15% e tricloroacético (TCA) 5, 10, 15% (m/v) foram testados em duplicata para cada concentração utilizando um “pool” de eritrócitos. Foram adicionados 300 µL da solução de ácido aos 725 µL do hemolisado em cada tubo. Esta mistura foi agitada em vortex por 1 min, mantida em repouso durante 20 min e centrifugada a 6000 rpm por 20 min.

### Avaliação da eficiência desproteinizante do ácido

Os sobrenadantes foram observados e aqueles com aspecto não límpido foram desprezados. Nos sobrenadantes límpidos foi realizada a quantificação espectrofotométrica de proteínas, através do método de Bradford<sup>15</sup>.

### Avaliação da influência dos ácidos na determinação da GSH por CLAE-UV

A perda da GSH durante a desproteíntização ácida foi avaliada em três níveis de concentração 0,5; 1,0 e 1,5 mM de GSH adicionadas aos eritrócitos (n=5) em duplicata. O nível basal de GSH foi paralelamente estabelecido. As áreas cromatográficas resultantes foram comparadas com as obtidas por injeção direta nas curvas de padrões aquosos de GSH (n=5) nas mesmas concentrações.

A etapa da derivatização da GSH foi realizada imediatamente após a obtenção do sobrenadante ácido. As seguintes soluções e amostras foram mantidas em banho de gelo (4 °C) e sequencialmente combinadas: 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,9; 130 µL de sobrenadante ácido a ser testado; 350 µL de DTNB 10 mM em  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 M, pH 8,0. Misturou-se sob agitação por 1 min e após 5 min de repouso a mistura foi acidificada com 100 µL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  7 M e centrifugada a 6000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo.

### Avaliação da influência da hemoglobina na estabilidade da GSH

O hematócrito, a hemoglobina e a GSH foram determinados em sangue de 20 indivíduos saudáveis. Para determinação da GSH as áreas cromatográficas obtidas foram comparadas às da curva de calibração com adição de padrão nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5;

2,0 e 3,0 mM. Os valores de GSH, em mmol/L eritrócitos e em  $\mu\text{mol/g}$  Hb foram comparados aos descritos na literatura.

A precisão metodológica foi realizada através de adições de GSH em amostras eritrocitárias, em três concentrações diferentes, baixa, média e alta, sendo 0,5; 1,5 e 3,0 mM, respectivamente, intra-dia e inter-dia ( $n=5$ ).

#### Métodos estatísticos

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram comparados pelo teste *t* de Student. O coeficiente de correlação *r* de Pearson foi usado para determinar a relação entre as concentrações de GSH e hemoglobina; o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A GSH é um importante antioxidante intracelular em mamíferos, 99,5% é encontrada no interior dos eritrócitos e a alteração de seus níveis pode indicar o estado antioxidante circulante. No entanto, devido à oxidação da GSH após a coleta de sangue, grandes diferenças nos níveis de GSH são encontradas em variadas investigações, inclusive em pessoas saudáveis. A oxidação da GSH tem sido associada à acidificação da amostra na presença de oxiemoglobina e pode resultar em formação de GSSG ou GS-SP (proteína glutationilada). Para evitar resultados artefatuais, os procedimentos pré-analítico e analítico devem ser otimizados.

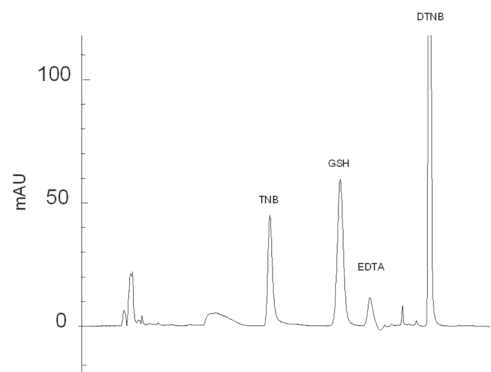
#### Considerações sobre a desproteínização ácida

As etapas da desproteínização, bem como da hemólise são pontos críticos para manter a estabilidade da GSH<sup>16</sup>. Apesar das desvantagens descritas em alguns trabalhos sobre a utilização de ácidos para remover proteínas de amostras complexas, este procedimento é de simples execução e ainda muito utilizado, uma vez comprovada sua eficiência. A avaliação sistemática do uso do ácido desproteínizante é importante porque proteínas residuais podem interferir na análise, além de degradar o sistema cromatográfico<sup>17,18</sup>. Com o objetivo de evitar interferência com resultados artefatuais de GSH<sup>7,11</sup> e dano ao sistema cromatográfico, avaliou-se a eficiência desproteínizante dos ácidos em várias concentrações. Observou-se que soluções contendo MPA 5 a 50%, SSA 5 a 10% e TCA 5 a 10% utilizadas para desproteínização de eritrócitos resultaram em sobrenadantes não límpidos, insatisfatórios para as análises cromatográficas. Os resultados obtidos no presente trabalho referentes à eficiência do MPA na desproteínização podem ser associados ao estudo realizado por Stempak *et al.*<sup>17</sup> que demonstraram que 1 volume de MPA 5 a 15% foi insuficiente para remover proteínas em 1 volume de amostras de sangue total. Recentemente, o efeito pró-oxidante do MPA em amostras contendo eritrócitos foi demonstrado através da quantificação de GSH e GSSG por eletroforese capilar, onde foi observada perda de GSH por oxidação a GSSG quando comparada à desproteínização realizada com o solvente orgânico acetônitrila<sup>19</sup>.

No presente trabalho, as desproteínizações realizadas com SSA 15% e TCA 15% proporcionaram sobrenadantes límpidos e concentrações residuais de proteínas  $< 4$  mg/L. Desta forma, estas soluções ácidas foram utilizadas para avaliação da estabilidade da GSH medida por CLAE-UV.

Quanto à interferência da matriz, após tratamento dos eritrócitos, hemólise seguida de desproteínização, tanto com SSA como com TCA, não se observou diferença em relação aos padrões aquosos, especialmente, no tempo de retenção da GSH, não representando, portanto, um problema analítico. E, o mesmo comportamento

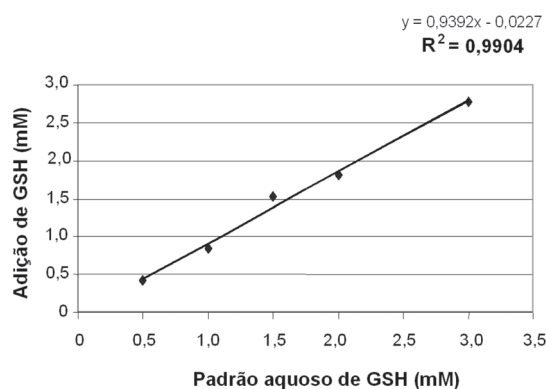
cromatográfico foi obtido para todas as análises, independente da presença ou não da matriz biológica. A Figura 1, mostra um cromatograma típico da quantificação de GSH em nível basal de uma amostra eritrocitária. O gradiente permitiu a separação adequada da GSH e do EDTA.



**Figura 1.** Um típico cromatograma do nível basal de GSH em uma amostra humana de eritrócitos após tratamento com hemólise, desproteínização com TCA e derivatização com DTNB. As condições cromatográficas foram coluna C18 (150 X 4 mm; partículas de 5  $\mu\text{m}$ ); mantida a 39 °C; alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$  e detector UV, 330 nm; tempo total de corrida de 25 min; fase móvel 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.83); metanol; eluição por gradiente

Nos ensaios cromatográficos, a acidificação com SSA 15% mostrou-se inadequada devido à baixa recuperação do padrão, indicando perda de GSH; para as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mM de GSH adicionadas aos eritrócitos recuperou-se 36, 59 e 63%, respectivamente. Sob as mesmas condições, o uso de TCA 15%, nas três concentrações adicionadas de GSH, apresentou as recuperações de 99,5; 102,4 e 104,5%, respectivamente. O coeficiente de variação foi menor que 10%.

Desta forma, avaliou-se a estabilidade pré-analítica, utilizando TCA 15% como desproteínizante para quantificar GSH eritrocitária. A linearidade entre as curvas aquosas e as curvas com adição de padrão nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM foi realizada e os resultados mostraram que o coeficiente linear foi maior que 0,99 (Figura 2).



**Figura 2.** Representa linearidade e paralelismo entre as curvas de eritrócitos com adição de padrão ( $n=5$ ) e as curvas aquosas ( $n=5$ ) com as mesmas concentrações, sendo 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM de GSH. A desproteínização utilizada foi com TCA 15%

Para a precisão metodológica as concentrações de 0,5; 1,5 e 3,0 mM de GSH foram adicionadas aos eritrócitos; realizou-se, assim, a precisão intra-dia ( $n=5$ ) obtendo-se CV% entre 6,64 e 9,65% e

**Tabela 1.** Parâmetros sanguíneos determinados em voluntários sadios (n=20). Concentrações de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) em sangue total e glutatona reduzida (GSH) em eritrócitos desproteinizados com TCA 15%. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão

Parâmetro	Hb (g/dL)	Ht (%)	GSH (mmol/l eritrócito)	GSH ( $\mu$ mol/g Hb)
Média $\pm$ D.P.	13,50 $\pm$ 0,94	42,40 $\pm$ 2,41	1,91 $\pm$ 0,36	5,99 $\pm$ 0,92

precisão inter-dia (n=5), para as mesmas concentrações, obtendo-se 7,67; 4,6; 6,73%, respectivamente. As recuperações encontradas foram de 94,5; 102,4 e 104,5% e valores de bias -6,38; 1,32 e 9,65%, respectivamente. Estes resultados demonstram que o método é adequado para quantificar GSH em amostras biológicas.

A desproteinação de amostras complexas tem sido objeto de estudo no sentido de minimizar a interferência de ácidos. Carru *et al.*<sup>11</sup> utilizaram membrana de filtração Microcon-10 para remover proteínas; com recuperação superior a 99,3% da GSH adicionada aos eritrócitos, mostrando que a oxidação da GSH durante a fase pré-analítica foi minimizada.

Apesar da pesquisa de novas propostas, a desproteinação ácida continua sendo utilizada por ser um método simples e rápido. Em estudo recente<sup>7</sup>, foram descritos os fatores que causam interferência na quantificação de GSH e GSSG. Rossi *et al.*<sup>20</sup> utilizaram NEM para bloquear tióis livres em amostras sanguíneas para evitar formação de dissulfetos, mas extraíram o excesso de NEM da amostra com diclorometano para evitar formação de adutos com a GSSG; após, a amostra foi desproteinizada com TCA 10%. A partir deste procedimento, foi observada uma pequena oxidação da GSH de ~3-4%, a 0 °C, 20 h após a adição de TCA<sup>7</sup>.

A utilização de determinados ácidos para tratamento de tecidos contendo altas concentrações de grupo heme pode levar à formação de espécies oxidantes e, como consequência, à oxidação de grupos tióis da GSH e de proteínas, como a hemoglobina<sup>7</sup>, que constituem mais de 95% do conteúdo de proteínas no interior dos eritrócitos<sup>21</sup>. A hemoglobina humana contém seis grupos tióis por molécula, dois -SH em cada cadeia  $\beta$  e 1 -SH em cada cadeia  $\alpha$ <sup>22</sup>.

No presente estudo, os valores de hemoglobina, hematócrito e GSH estão apresentados na Tabela 1. Os valores de GSH encontrados em indivíduos sadios (1,91  $\pm$  0,36 mmol/L eritrócitos) são similares aos valores obtidos em recente trabalho de Luchi *et al.*<sup>23</sup> e com autores que utilizaram acetoneitrila como agente desproteinizante (2,05  $\pm$  0,42 mmol/L eritrócitos)<sup>19</sup>.

Os resultados obtidos demonstram que o TCA não age como agente oxidante da GSH na fase pré-analítica, considerando as condições propostas neste estudo. Os níveis de GSH em eritrócitos separados do plasma imediatamente após a coleta e sem a presença de NEM, mantidos a 4 °C, hemolisados com triton x-100 e desproteinizados com TCA independem da concentração de hemoglobina total nos eritrócitos, segundo as condições metodológicas utilizadas neste trabalho, em que  $p > 0,05$  e coeficiente de correlação  $r = -0,17$ .

Rossi *et al.*, em amplo estudo, avaliaram a influência da oximoglobina sobre o estado redox da glutatona e confirmaram que a glutatona total é depletada quando o sangue é acidificado com ácido perclórico e SSA. No mesmo estudo, o sobrenadante obtido com TCA mostrou pequena oxidação à GSSG, 2-3% sob temperatura de 0 °C<sup>7</sup>.

Adicionalmente, a oxidação da GSH a GSSG após a coleta deve ser rigorosamente controlada, pois pode resultar, também, em falsos dados em relação a proteínas glutatoniadas. De maneira geral, a formação de proteína glutatoniada no eritrócito depende da formação prévia da GSSG<sup>23</sup>; assim, se houver oxidação da GSH após a coleta da amostra haverá, por consequência indireta, a for-

mação artefactual de GS-SP. Di Simplicio *et al.* demonstraram, em amostras de sangue tratadas com 4 volumes de TCA 5%, que hemoglobina humana tem baixa capacidade de formar dissulfetos com a GSSG e baixa reatividade dos seus grupos -SH quando comparada com a hemoglobina de ratos<sup>24</sup>. Desta forma, podemos reafirmar que os grupos -SH da hemoglobina humana, na presença de TCA, possuem baixa reatividade, o que dificultaria a perda de GSH via reação da GSSG com os grupos tióis da hemoglobina.

Ao final destas avaliações, podemos inferir que o TCA pode ser utilizado com segurança, respeitando os limites de concentração e temperatura já estudados, na desproteinação eritrocitária para determinação de GSH.

## CONCLUSÃO

A acidificação eritrocitária com MPA resultou em desproteinação ineficiente e o SSA foi inadequado como agente desproteinizante, devido à baixa recuperação de GSH. Por outro lado, não foi observado efeito da concentração da Hb sobre a estabilidade da GSH em eritrócitos acidificados com TCA e imediatamente derivatizados com DTNB.

Os resultados encontrados demonstram que o uso de TCA 15% como agente desproteinizante nos eritrócitos é adequado, por não influenciar na estabilidade da GSH mesmo na presença de diferentes concentrações de hemoglobina. A desproteinação ácida com TCA pode ser realizada de forma rápida, o que também é importante em análises de substâncias quimicamente instáveis como a GSH.

O método utilizando TCA 15% mostrou-se adequado para determinação da GSH em eritrócitos, o que foi demonstrado através dos parâmetros acurácia (% bias) e recuperação. Desta forma, este método pode ser utilizado com segurança para avaliação do potencial antioxidante nos eritrócitos, em estudos experimentais e clínicos envolvendo o estresse oxidativo.

## AGRADECIMENTOS

Ao DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), ao Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. H. Knauer GmbH pelo suporte em cromatografia, ao CNPq e à FAPERGS pelas bolsas de estudo e suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Griffith, O. W.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 27, 922.
- Dickinson, D. A.; Forman, H. J.; *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64, 1019.
- Comporti, M.; *Chem. Phys. Lipids* **1987**, 45, 143.
- Meinster, A.; *Fed Proc.* **1984**, 43, 3031.
- Mimic-Oka, J.; Djukanovic, L.; Markovic, B.; *Biochem. Med. Met. Biol.* **1998**, 39, 48.
- Johnson, R. M.; Goyette Jr., G.; Ravindranath, Y.; Ho, Y.; *Free Radical Biol. Med.* **2005**, 39, 1407.
- Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Done, I.; Giustarini, D.; Lusini, L.; Colombo, R.; Di Simplicio, P.; *Clin. Chem.* **2002**, 48, 742.
- Lada, M. W.; Kennedy, J.; *Neurosci. Methods* **1997**, 72, 153.
- Serru, V.; Baudin, B.; Ziegler, F.; David, J. P.; Cals, M. J.; Vaubourdoille, M.; Mario, N.; *Clin. Chem.* **2001**, 47, 1321.
- Reglinsky, J.; Smith, W. E.; Brzesky, M.; Marabani, M.; Sturrock, R. D.; *J. Med. Chem.* **1999**, 35, 2134.

11. Carru, C.; Zinellu, A.; Sotgia S.; Marongiu, G.; Farina, M. G.; Usai, M. F.; Pes, G. M.; Tadolini, B.; Deiana, L.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1017*, 233.
12. Galleman Galleman, D.; Eyer, P.; *Anal. Biochem.* **1990**, *191*, 347.
13. Eyer, P.; Podhradsky, D.; *Anal. Biochem.* **1996**, *153*, 57.
14. Beutler, E.; Srivastava, S. K.; West, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *38*, 341.
15. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
16. Mills, B. J.; Richie, J. P. Jr.; Lang, C. A.; *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 95.
17. Stempak, D.; Dallas, S.; Klein, J.; Bendayan, R.; Koren, G.; Baruchel, S.; *Ther. Drug Monitor.* **2001**, *23*, 542.
18. Lima, V. V.; Cassiano, N. M.; Cass, Q. B.; *Quim. Nova.* **2006**, *29*, 72.
19. Zinellu, A.; Sotgia S.; Usai, M. F.; Zinellu, E.; Deiana, L.; Carru, C.; *Clin. Chim. Acta* **2006**, *366*, 363.
20. Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Colombo, R.; Milzani, A.; Rossi, R.; *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *35*, 1365.
21. Reishl, E. Em *Non-mammalian Animal Models for Biomedical Research*; Woodhead, A. W., ed.; CRC Press: Boca Raton, 1989, p. 309.
22. Amicini, G.; Brunori, M. Em *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*; Meyers, R. A., ed.; VCH: New York, 1996, vol. 3, p. 2.
23. Lucchi, L.; Bergamini, S.; Iannone, A.; Perroni, S.; Stipo, L.; Olmeda, F.; Caruso, F.; Tomasi, A.; Albertazzi, A.; *Artif. Organs* **2005**, *29*, 67.
24. Di Simplicio, P.; Cacaè, M. G.; Lusini, L.; Giannerini, F.; Giustarini, D.; Rossi, R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *355*, 145.