



Otimização da Detecção de Isotiocianatos na Análise por CG-DNP

Izabela Miranda de Castro¹
Marília Penteadó Stephan²

Os glicosinolatos (beta-tioglicosídeo-N-hidroxissulfatos) são precursores dos isotiocianatos e ocorrem em dezesseis famílias de espécies vegetais. Uma grande parte das espécies que sintetizam estas substâncias pertencem aos gêneros *Brassicaceae*, *Caricaceae* e *Capparaceae* (FAHEY; ZALKMANN; TALALAY, 2001). Os glicosinolatos são convertidos na planta em isotiocianatos por ação da enzima mirosinase. Esta enzima, presente no próprio vegetal ou na microflora do trato digestivo humano, inicia sua atividade quando o tecido vegetal sofre algum tipo de injúria ou sob ação de fungos ou ainda mastigação de insetos ou pela própria mastigação das plantas frescas (BONES; ROSSITER, 1996). No caso do mamoeiro (*Carica papaya*), o isotiocianato de benzila (BITC), formado a partir do glicosinolato de benzila sob a ação da mirosinase no mamão, já foi relatado por apresentar atividade anti-helmíntica (KERMANSHAI et al., 2001).

Durante os últimos vinte anos, muitas evidências foram mostradas ressaltando que o aumento do consumo de frutas e vegetais reduz a incidência de câncer (TALALAY, 1999), em alguns casos na ordem de 50%. As propriedades químico-protetoras dos vegetais são atribuídas à presença de substâncias como os glicosinolatos. Alguns destes (por exemplo o glicosinolato de benzila, de p-hidroxibenzila e de 2-hidroxibut-3-enila) induzem os mecanismos de desintoxicação celular da Fase 2 (WATTENBERG et al., 1986; TAWFIQ et al., 1995; FAHEY; ZHANG; TALALAY, 1997), induzindo, por consequência, os mecanismos químicos de defesa contra agentes

cancerígenos, aumentando a resistência celular. Outros metabólitos atuam como indutores das enzimas da Fase 2 do mecanismo de desintoxicação celular, mas têm papel inibitório das enzimas da Fase 1 (GAMET-PAYRASTRE et al., 2000; NAKAMURA et al., 2000). Alimentos que são reconhecidas fontes de glicosinolato e isotiocianatos foram descritos, por serem capazes de ativar o mecanismo de desintoxicação celular e de proteger contra o câncer (SHAPIRO et al., 2001).

O mamão faz parte da nossa dieta diária e é reconhecida fonte de glicosinolatos e isotiocianatos. A atividade funcional atribuída a essas substâncias suscita o interesse em se estabelecer métodos validados para sua quantificação. Um método de análise de isotiocianato de benzila utilizando cromatografia gasosa com um detetor de fotometria de chama (CG-DFC), já foi estabelecido anteriormente por Castro, Anjos e Silva (2005) e adapta-se bem para a matriz mamão. Neste método, no entanto, observa-se que é difícil efetuar a quantificação do isotiocianato em concentrações baixas. Isto levou a desenvolver o presente método, utilizando um outro detetor – detetor de nitrogênio-fósforo (DNP) – que tem maior sensibilidade que o DFC usado no método original.

Método de Análise de Isotiocianatos

As amostras de mamão ainda verdes foram adquiridas no mercado local. Depois de retiradas as sementes, a

¹ Quím., Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: imcastro@ctaa.embrapa.br

² Farm., Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br

polpa e a casca foram cortadas em pequenos cubos, imediatamente antes da análise. A extração foi feita usando-se cerca de 20g de amostra (polpa + casca) com acetato de etila, durante quinze minutos no Ultra-Turrax. Após filtração em papel de filtro rápido, a solução foi evaporada em rota-evaporador e transferida para balão volumétrico de 10 ou 25mL com acetato de etila. A solução contendo o analito foi aplicada em um sistema cromatográfico composto por: cromatógrafo gasoso Trace 2000 fabricado pela Thermo® equipado com a) um detetor de fotometria de chama com filtro de enxofre (sistema CG-DFC) ou b) detetor de nitrogênio fósforo (sistema CG-DNP); coluna J&W Scientific DB-1701 P (28,5m x 0,32µm x 0,25µm); programação de temperatura, 50 a 130°C (25°C/min) e de 130 a 200°C (5°C/min); injetor sem divisão de fluxo a 225°C (tempo de abertura da válvula - 1min); volume injetado - 0,8µL.

Os extratos das amostras de mamão foram analisados em duplicata por CG-DFC e por CG-DNP e quantificados por padronização externa. As curvas padrão de BITC, obtidas nos dois sistemas, foram construídas usando triplicatas.

Quantificação Usando o Sistema CG-DFC

No primeiro método desenvolvido utilizando o detetor DFC que é seletivo para o enxofre, obteve-se a curva padrão com sete pontos exposta na Figura 1. Vê-se que para os dois pontos de menor concentração (série 1 da Figura 1), a resposta do detector é similar mas difere da obtida para os pontos mais concentrados (série 2 da Figura 1), ou seja, os fatores de resposta do DFC nas faixas de baixa e alta concentração do analito são diferentes. Assim, calculando o valor do coeficiente de correlação (R^2) para diferentes faixas de concentração, determinou-se a faixa de linearidade da curva (15,53 a 56,2µg BITC/mL), que corresponde aos cinco pontos de maior concentração. A curva de calibração apresentou um R^2 de 0,987, o que é considerado aceitável para a faixa de trabalho usada. Neste sistema cromatográfico foram analisadas amostras de mamão seguindo o protocolo experimental previamente descrito. A identificação do pico de interesse - BITC - nas amostras de mamão, ocorreu através da comparação entre os tempos de retenção do padrão e os tempos de retenção dos picos observados nos cromatogramas das amostras. Como o detector DFC é seletivo e só responde às substâncias sulfuradas, obtêve-se cromatogramas "limpos" sem a presença de interferentes (CASTRO; ANJOS; SILVA, 2005).

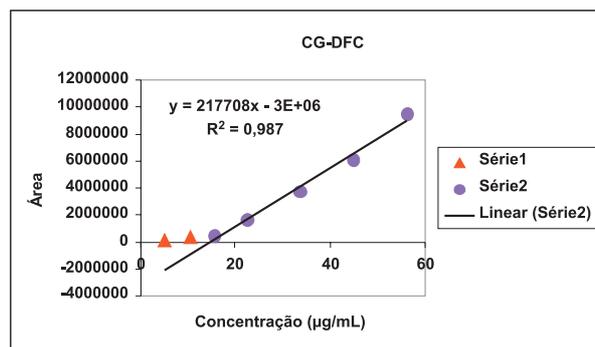


Fig. 1. Curva de calibração de BITC no sistema CG-DFC

O valor médio da concentração de isotiocianato de benzila nas amostras de mamão analisados por CG-DFC foi de 17µg de BITC/g amostra. Este resultado é coerente com dados publicados por Nakamura et al. (2000) para o mamão papaya, demonstrando assim o bom desempenho do método usado. Entretanto, considerando tanto a equação da reta (coeficientes angular e linear) como a faixa de linearidade, vê-se que a análise por CG-DFC não pode ser aplicada para diluições onde o analito esteja presente na solução final em concentrações < 15µg/mL. Para resolver este problema foi desenvolvido um novo método que apresenta maior sensibilidade que o sistema com DFC.

Novo Método: Determinação de Isotiocianatos por CG-DNP

A curva padrão de BITC para o sistema CG-DNP se encontra na Figura 2. A maior sensibilidade deste detector é claramente visualizada pelas áreas dos picos. Usando a mesma faixa de concentração de BITC, para efeito de comparação entre os dois detectores, vê-se que utilizando o DNP as áreas dos picos são dez vezes maiores do que com o DFC. A maior sensibilidade do DNP possibilita a obtenção de um fator de resposta bem melhor, permitindo a quantificação de concentrações bem mais baixas do que no método original. O coeficiente linear da equação da reta obtida pela regressão da curva é positivo e o valor de R^2 é 0,9964. Estes resultados são coerentes com as recomendações para análise de traços.

O fato mais importante que deve ser ressaltado no método proposto é a ausência do "efeito de matriz". O DNP é um detector seletivo e detecta apenas substâncias que contenham nitrogênio ou fósforo. Esta característica permitiu, no caso da matriz mamão, a

obtenção de um cromatograma onde não se observam outros picos além do BITC, facilitando a quantificação do mesmo. A Figura 3 mostra o cromatograma obtido neste sistema. A especificidade do detetor utilizado e a própria natureza da matriz estudada propiciam a obtenção de cromatogramas isentos da presença de interferentes. As análises de BITC, efetuadas em 42 amostras de mamão cultivados de forma orgânica e convencional, permitiram a determinação do teor médio de $23\mu\text{g}$ de BITC/g de amostra. Este valor é ligeiramente superior ao obtido anteriormente usando CG-DFC, mas esta diferença poderia ser atribuída à variabilidade entre os frutos, à sazonalidade, à origem e/ou à forma de cultivo. Observou-se certa tendência de se encontrar concentrações mais elevadas de isotiocianatos para os frutos cultivados de forma orgânica do que para as amostras provenientes do cultivo convencional.

Considerações Finais

O método proposto para análise de isotiocianatos, utilizando o sistema cromatográfico CG-DNP, demonstrou ser simples de ser executado. Ficou evidente a maior sensibilidade e fator de resposta do detector de N e P frente ao analito do que o detector DFC, usado no método original. Observou-se linearidade na faixa de concentração usualmente encontrada neste tipo de matriz. A determinação de isotiocianato de benzila por CG-DNP, demonstrou ser bastante adequada, tendo sido quantificadas concentrações baixas de BITC em algumas amostras de mamão sem se detectar a presença de nenhum interferente.

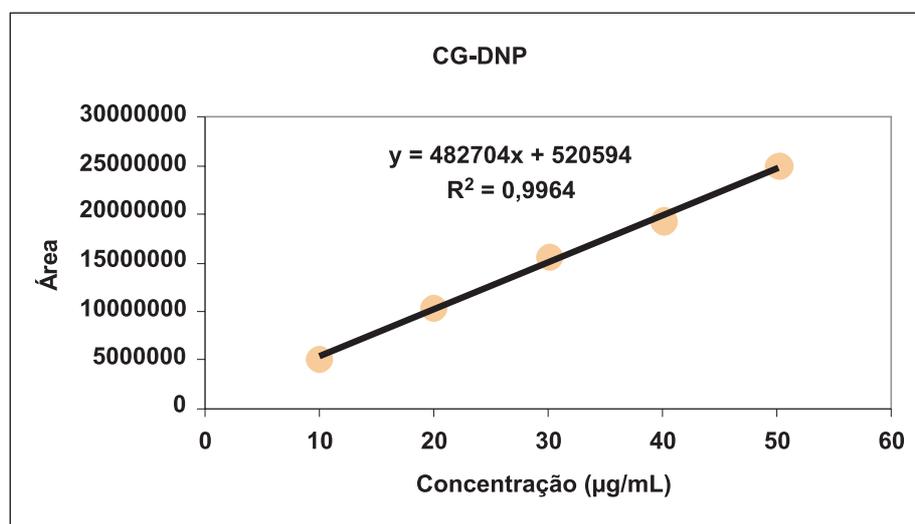


Fig. 2. Curva de calibração de BITC no sistema CG-DNP

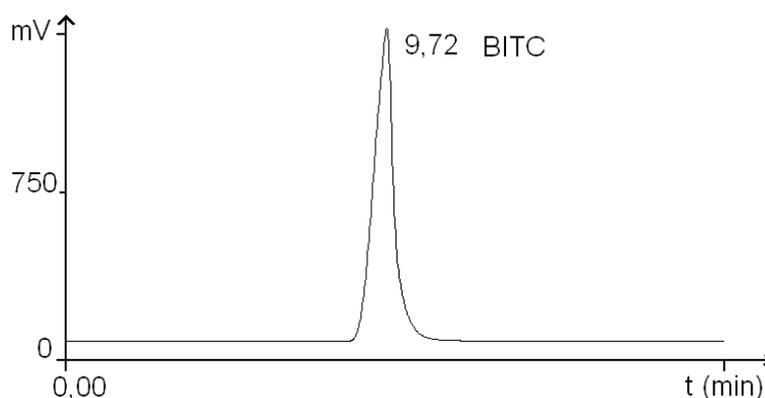


Fig. 3. Cromatograma do BITC em uma amostra de mamão no sistema CG-DNP

Referências Bibliográficas

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, v. 97, p. 194-208, 1996.

CASTRO, I. M.; ANJOS, M. R.; SILVA, A. A.. Determinação de isotiocianato de benzila por CG-DFC em Carica papaya. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2005, Poços de Caldas, MG. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: SBQ, 2005.

FAHEY, J. W.; ZALKMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 5-51, 2001.

FAHEY, J. W.; ZHANG, Y.; TALALAY, P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, v. 94, p. 10367-10372, 1997.

GAMET-PAYRASTRE, L.; LI, P.; LUMEAU, S.; CASSAR, G.; DUPONT, M.-A.; CHEVOLLEAU, S.; GASC, N.; TULJIEZ, J.; TERCE, F. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research*, v. 60, p. 1426-1433, 2000.

KERMANS HAI, R.; MCCARRY, B. E.; ROSENFELD, J.; SUMMERS, P. S.; WERETILNYK, E. A.; SORGER, G. J. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*, v. 57, p. 427-435, 2001.

NAKAMURA, Y.; MORIMITSU, Y.; UZU, T.; OHIGASHI, H.; MURAKAMI, A.; NAITO, Y.; NAKAGAWA, Y.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. A glutathione S-transferase inducer from papaya: rapid screening, identification and structure-activity relationship of isothiocyanates. *Cancer Lett.*, v. 157, n. 2, p. 193-200, 2000.

SHAPIRO, T. A.; FAHEY, J. J. W.; WADE, K. L.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 10, p. 501-508. 2001.

TALALAY, P. The war against cancer: new hope. *Proceedings of the American Philosophical Society*, v. 143, p. 52-72, 1999.

TAWFIQ, N.; HEANEY, R. K.; PLUMB, I. A.; FENWICK, G. R.; MUSK, S. R.; WILLIAMSON, G. Dietary glucosinolates as blocking agents against carcinogenesis: glucosinolate breakdown products assessed by induction of quinone reductase activity in murine hepalcl7 cells. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 1191-1194, 1995.

WATTENBERG, L. W.; HANLEY, A. D.; GARANY, G.; SPAMINS, V. L.; LAM, L. K. T.; FENWICK, G. R. Inhibition of carcinogenesis by some minor dietary constituents. In: DIET, Nutrition & Cancer. Tokyo: Sci. Soc. Press, 1986. p. 193-203.

Comunicado Técnico, 100

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 2410-9500
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9513
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Márcia Nitschke, Ronoel Luiz de O. Godoy e André Luis do Nascimento Gomes*
Secretárias: *Renata Maria Avilla Paldés e Célia Gonçalves Fernandes*

Expediente

Supervisor editorial: *André Luis do N. Gomes*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações*
Normatização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *André Guimarães de Souza e André Luis do N. Gomes*