UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**ABSORÇÃO DA S-METILCISTEÍNA E DO PEPTÍDEO
 γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA EM ESTUDO MODELO COM
SEGMENTOS INTESTINAIS DE RATO**

ELMA REGINA SILVA DE ANDRADE

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Assoc. Ursula M. L. Marquez

São Paulo
2002

11274

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004851

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andrade, Elma Regina Silva de

A553a Absorção da S-metilcisteína e do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína em estudo modelo com segmentos intestinais de rato / Elma Regina silva de Andrade. -- São Paulo, 2002. 116p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

1. Bioquímica dos alimentos I. T. II. Lanfer Marquez, Ursula Maria, orientador

641.1 CDD

ELMA REGINA SILVA DE ANDRADE

ABSORÇÃO DA S-METILCISTEÍNA E DO PEPTÍDEO
 γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA EM ESTUDO MODELO COM
SEGMENTOS INTESTINAIS DE RATO

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Assoc. Ursula Maria Lanfer Marquez
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 12 de agosto de 2002.

**À Maria José, mãe querida e companheira,
pelos momentos de muito carinho e de
palavras de conforto, e a Gilberto, pai
orgulhoso, pelo grande incentivo.**

**Aos meus pequeninos e adoráveis
sobrinhos, Elmir e Elisandra, pela alegria
que sempre me proporcionaram nos
intermináveis diálogos inocentes e ternos.**

**Aos meus queridos irmãos, Elme e Elna e
minha cunhada, Aparecida, pelo grande
incentivo e apoio, mesmo à distância, que
sempre me estimularam muito nesta
caminhada.**

AGRADECIMENTOS

À prof^a Ursula Maria Lanfer Marquez, pela competência, profissionalismo, ensinamentos e momentos de amizade que se fizeram.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de formação do pesquisador (mestrado).

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), através do pesquisador Roberto Tetsuo Tanaka, pelo fornecimento de sementes de feijão para realização deste trabalho.

Aos meus colegas de curso, pela amizade e carinho, em especial a Patrícia Sinnecker e Renata Alexandra M. Neves, companheiras de curso e dos momentos do dia-a-dia.

À técnica Rosa Maria C. Barros pelo grande apoio e esforço prestados à finalização deste trabalho.

À Lúcia Pedrosa pelo grande incentivo e otimismo à inscrição neste curso de Pós-Graduação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Departamento de Alimentos e Nutrição, pelo trabalho de ensino.

À Dra. Maria Teresa M. Miranda e ao técnico Cleber Wanderlei Liria, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química –USP, pelas valiosas sugestões e orientações.

Ao prof.^o José Luís Guerra do Departamento de Patologia (VPT) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP pelas análises histológicas.

Ao Laboratório de Instrumentação e Partículas (LIP) do Instituto de Física – USP, em particular a Eduardo Luiz Augusto Macchione, pela identificação do peptídeo em estudo.

Aos funcionários Benê, Elaine e Jorge da Secretaria da Pós – Graduação da FCF-USP, pelas informações, presteza e apoio durante o curso.

A todos amigos que, sejam os que estejam próximos e/ou distantes, de forma otimista e carinhosa contribuíram nesta caminhada.

E por fim, a Deus, que me iluminou, deu-me muita serenidade, força e perseverança nesta mais uma jornada.

SUMÁRIO

	pág
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE FOTOMICROGRAFIAS	IV
LISTA DE QUADROS	V
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1- REVISÃO DA LITERATURA	01
1.1 - OCORRÊNCIA EM FUNÇÃO DA S-METILCISTEÍNA E DO PEPTÍDEO γ - GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA	01
1.2 - METABOLISMO DA METIONINA	12
1.3 - IMPORTÂNCIA DO METANOTIOL	19
1.4 - ABSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS	21
1.4.1 - SISTEMAS DE TRANSPORTE PARA AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS	23
1.5 - ABSORÇÃO DE PEPTÍDEOS γ -GLUTAMIL	26
1.6 - ABSORÇÃO INTESTINAL UTILIZANDO A TÉCNICA DE SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS	32
1.7 - DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS POR HPLC COMO MÉTODO ALTERNATIVO À ANÁLISE EM AUTOANALISADOR DE AMINOÁCIDOS..	36
2 - OBJETIVOS	46
3 - MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 - MATERIAL	47
3.1.1 - AMOSTRA	47

3.1.2 - REAGENTES E OUTROS MATERIAIS	47
3.1.3 - ANIMAIS	48
3.2 - MÉTODOS	48
3.2.1 - EXTRAÇÃO DA FARINHA DE FEIJÃO PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	48
3.2.2 - PURIFICAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO	51
3.2.3 - ANÁLISE DE γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA E S-METILCISTEÍNA LIVRE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM AUTOANALISADOR DE AMINOÁCIDOS	52
3.2.4 - ANÁLISE DE γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA E S-METILCISTEÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÊNCIA DE FASE REVERSA	53
3.2.4.1 - ANÁLISE DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA	53
3.2.4.2 - ANÁLISE DA S-METILCISTEÍNA LIVRE	57
3.2.4.5 - IDENTIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	60
3.2.5 - ENSAIOS BIOLÓGICOS COM RATO	63
3.2.5.1 - ABSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM SISTEMA <i>IN VITRO</i> , COM SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS	63
3.2.5.2 - MONITORAMENTO DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DA MUCOSA EPITELIAL	66
3.2.5.3 - ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS ABSORVIDOS E DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	68
3.2.5.4 - ATIVIDADE DA ENZIMA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE EM INTESTINO DE RATO	69
3.2.5.4.1 - PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO DE INTESTINO	69
3.2.5.5 - ATIVIDADE DA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE	69
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	72

4.1 - ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO PARCIALMENTE PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM AUTOANALISADOR DE AMINOÁCIDOS	72
4.2 - ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO PARCIALMENTE PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	74
4.3 - MONITORAMENTO DA INTEGRIDADE MORFÓLOGICA DA MUCOSA INTESTINAL	76
4.4 - ABSORÇÃO INTESTINAL DE AMINOÁCIDOS EM ESTUDO <i>IN VITRO</i>	83
4.5 - ABSORÇÃO INTESTINAL DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA	87
4.6 - ATIVIDADE DA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE NO DUODENO E JEJUNO DE RATO, ANTES E APÓS INCUBAÇÃO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA	92
4.7 - ANÁLISE DE S-METILCISTEÍNA LIVRE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	94
5 - CONCLUSÕES	100
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA E DOS AMINOÁCIDOS S-METILCISTEÍNA E SULFÓXIDO DE S-METILCISTEÍNA, METIONINA E CISTEÍNA	03
FIGURA 2 - METABOLIZAÇÃO DA METIONINA VIA TRANSAMINAÇÃO E TRANSSULFURAÇÃO	15
FIGURA 3 - ESQUEMA DE DIGESTÃO E ABSORÇÃO PROTÉICA	22
FIGURA 4 - TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ATRAVÉS DO EPITÉLIO INTESTINAL	25
FIGURA 5 - ESTRUTURA DA GLUTATIONA, GLICINA γ -GLUTAMILCISTEÍNILA	27
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE NAS CÉLULAS DOS VILOS DO INTESTINO DELGADO DE RATOS, EM COMPARAÇÃO A OUTRAS ENZIMAS.....	28
FIGURA 7 - PRINCÍPIO DA REAÇÃO DE TRANSPEPTIDAÇÃO	30
FIGURA 8 - ESQUEMA DA EXTRAÇÃO DA FARINHA DE FEIJÃO PARA A OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTENDO OS PEPTÍDEOS SULFURADOS	50
FIGURA 9 - ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO PARA A OBTENÇÃO DE UMA FRAÇÃO LIVRE DE CARBOIDRATOS	52
FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA EXTRAÍDO DO EXTRATO BRUTO, ELUÍDO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ACETONITRILA: 60% (A); 20% (B); 10% (C) E 5% (D)	56
FIGURA 11 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA REAÇÃO DO O-FTALALDEÍDO (OPA) COM O AMINOÁCIDO S-METILCISTEÍNA (SMC) E ETANOTIOL (RSH)	58
FIGURA 12 - ESQUEMA PARA O MÉTODO DE DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA UTILIZANDO O REAGENTE O-FTALALDEÍDO (OPA)	59
FIGURA 13- SEPARAÇÃO DE ISOINDOL DE S-METILCISTEÍNA (15 MMOLES/100 ML H ₂ O) EM COLUNA LC 18. FASES MÓVEIS: TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO 20MM (PH 7,0) [SOLVENTE A] E 40% DE ACETONITRILA EM A [SOLVENTE B]. GRADIENTE: 5:95 (% SOLVENTE B) EM 15 MIN., FLUXO 1,0 ML/MIN.	61

FIGURA 14 - ESPECTRO DE ÍONS POSITIVOS DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA PROVENIENTE DO EXTRATO BRUTO DETERMINADO POR PDMS POR TEMPO DE VÔO	62
FIGURA 15 - SISTEMA MODELO <i>IN VITRO</i> PARA ABSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS	65
FIGURA 16 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO ENSAIO BIOLÓGICO RELATIVO AO ESTUDO DE ABSORÇÃO DOS AMINOÁCIDOS S-METILCISTEÍNA, METIONINA E FENILALANINA E DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA	66
FIGURA 17 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PELA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO PARCIALMENTE PURIFICADO ANTES (A) E APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA CONTENDO S-METILCISTEÍNA TOTAL (B) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	73
FIGURA 18 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PELA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO PARCIALMENTE PURIFICADO, POR HPLC, ANTES (A) E APÓS (B) HIDRÓLISE ÁCIDA	75
FIGURA 19 - VELOCIDADE DE ABSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS [METIONINA (MET), FENILALANINA (PHE) E S-METILCISTEÍNA (SMC)], ANALISADOS ISOLADAMENTE, EM SISTEMA <i>IN VITRO</i> , EMPREGANDO SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS DE RATO	85
FIGURA 20 - AMINOGRAMA DO MATERIAL COLETADO DO LADO SEROSO DOS SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS, EVIDENCIANDO A ABSORÇÃO DE S-METILCISTEÍNA PROVENIENTE DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA, APÓS INCUBAÇÃO POR 60 MINUTOS	88
FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA VELOCIDADE DE ABSORÇÃO DE S-METILCISTEÍNA (SMC) PROVENIENTE DO EXTRATO BRUTO COM AMINOÁCIDOS SINTÉTICOS [METIONINA (MET), FENILALANINA (PHE) E S-METILCISTEÍNA] EM SISTEMA <i>IN VITRO</i> , EMPREGANDO SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS DE RATO	90
FIGURA 22 - AMINOGRAMA DO MATERIAL COLETADO DO LADO SEROSO DOS SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS APÓS INCUBAÇÃO COM O PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA, POR 60 MINUTOS, COMO APARECIMENTO DO PEPTÍDEO NA FORMA INTACTA	91
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DE ISOINDOL DE S-METILCISTEÍNA (SMC) (15 μ MOLES/100 mL H ₂ O) POR HPLC. COLUNA LC 18, FASE MÓVEL: TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO 50mM (pH 7,0): ACETONITRILA (v/v 60:40), FLUXO ISOCRÁTICO, 1mL/MINUTO. VERIFICA-SE A INTERFERÊNCIA DE UMA SUBSTÂNCIA JUNTO AO ISOINDOL DE SMC	96

- FIGURA 24 - CROMATOGRAMA DE ISOINDOL DE S-METILCISTEÍNA (15 μ MOLES/100 mL H₂O) POR HPLC. COLUNA LC 18, FASE MÓVEL: TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO 50MM (PH 7,0): ACETONITRILA (V/V 60:40), FLUXO ISOCRÁTICO, 1ML/MINUTO 96**
- FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS DE ISOINDOL DE S-METILCISTEÍNA (15 μ MOLES/100 mL H₂O) POR HPLC EM COLUNA C-18 (A) E A REDUÇÃO DO TAMANHO DO PICO E DA ÁREA DO ELUATO APÓS PERDA DE EFICIÊNCIA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA (B) 97**
- FIGURA 26 - CROMATOGRAMA DE ISOINDOL DE S-METILCISTEÍNA, EVIDENCIANDO 50% DE PERDA DE EFICIÊNCIA DA COLUNA, REDUÇÃO DA ÁREA E FORMAÇÃO DE CAUDA 98**

LISTA DE FOTOMICROGRAFIAS

	pág.
FOTOMICROGRAFIA 1- CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DELGADO DE RATO ANESTESIADO COM ÉTER ETÍLICO, EVIDENCIANDO ÁPICES DAS VILOSIDADES REVESTIDOS POR EPITÉLIO CILÍNDRICO PRESERVADO, ENTREMEADO POR CÉLULAS CALICIFORMES	78
FOTOMICROGRAFIA 2 - DETALHE EM MAIOR AUMENTO DA FOTOMICROGRAFIA ANTERIOR, EVIDENCIANDO O EPITÉLIO DAS MICROVILOSIDADES BEM PRESERVADO E O INFILTRADO DE MONONUCLEARES COM VASOS LINFÁTICOS DILATADOS NA SUBMUCOSA	79
FOTOMICROGRAFIA 3- CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DELGADO DE RATO ANESTESIADO COM PENTOBARBITAL DE SÓDIO E INCUBADO POR 40 MINUTOS, MOSTRANDO VILOSIDADES E CRIPTAS COM ARQUITETURA PRESERVADA, CÉLULAS DE REVESTIMENTO DENTRO DOS PADRÕES DE NORMALIDADE	79
FOTOMICROGRAFIA 4 - DETALHE EM MAIOR AUMENTO DA FOTOMICROGRAFIA ANTERIOR, EVIDENCIANDO AS CÉLULAS DO EPITÉLIO BEM PRESERVADAS, BEM COMO OS ELEMENTOS DA SUBMUCOSA	80
FOTOMICROGRAFIA 5 - CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DELGADO DE RATO SACRIFICADO (CONTROLE), MOSTRANDO VILOSIDADES, CRIPTAS E CAMADA MUSCULAR BEM PRESERVADAS	81
FOTOMICROGRAFIA 6 - DETALHE EM MAIOR AUMENTO DA FOTOMICROGRAFIA ANTERIOR, EVIDENCIANDO O ÁPICE DAS VILOSIDADES, BEM COMO AS CRIPTAS E AS CAMADAS MUSCULAR E SEROSA BEM PRESERVADAS	81
FOTOMICROGRAFIA 7 - CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DELGADO DE RATO SACRIFICADO (INCUBADO), MOSTRANDO DESTRUIÇÃO DO ÁPICE DAS VILOSIDADES	82
FOTOMICROGRAFIA 8 - DETALHE EM MAIOR AUMENTO DA FOTOMICROGRAFIA ANTERIOR, EVIDENCIANDO AUTÓLISE DO ÁPICE DAS VILOSIDADES	82

LISTA DE QUADROS

	pág.
QUADRO 1 - CONDIÇÕES DOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DOS SEGMENTOS INTESTINAIS	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES DE S-METILCISTEÍNA (SMC) NO EXTRATO BRUTO (EB) PARCIALMENTE PURIFICADO NÃO HIDROLISADO E APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA	74
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE TRANSPORTE NA MEMBRANA BORDA EM ESCOVA E BASOLATERAL DO INTESTINO DELGADO, DE ACORDO COM A DEPENDÊNCIA OU NÃO DE Na^+ E ENVOLVIMENTO DE OUTROS ÍONS	86
TABELA 3 - SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NAS MEMBRANAS BORDA EM ESCOVA E BASOLATERAL EM INTESTINO DELGADO	87
TABELA 4 - ABSORÇÃO DA S-METILCISTEÍNA (SMC) PROVENIENTE DO PEPTÍDEO γ -GLUTAMIL-S-METILCISTEÍNA REALIZADA COM SEGMENTOS INTESTINAIS EVERTIDOS DE RATO	89
TABELA 5 - ATIVIDADE DA ENZIMA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE EM HOMOGENATOS DE INTESTINOS DE RATO	93

RESUMO

A S-metilcisteína (SMC) e o peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína (γ -Glu-SMC), presentes em algumas leguminosas comestíveis, principalmente no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), apresentam efeitos biológicos controversos após a sua ingestão por animais de laboratório e humanos. O presente trabalho teve por finalidade investigar a absorção intestinal da SMC e da γ -Glu-SMC, empregando ensaios com segmentos intestinais isolados de rato, comparando-se a assimilação destes com a de aminoácidos protéicos. Os segmentos de duodeno e jejuno foram evertidos e incubados em solução nutritiva contendo isoladamente os aminoácidos (SMC, Phe e Met) ou o peptídeo em estudo, acompanhando-se a taxa de absorção de cada um, em intervalos regulares entre 10 e 60 min. A taxa de absorção foi determinada por cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos. A SMC apresentou valores superiores aos aminoácidos Met e Phe. As mesmas amostras foram analisadas também por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa após derivatização com o-oftalaldeído (Gustine, 1985). Os resultados por esta metodologia não foram conclusivos pois ocorreu perda de eficiência da coluna cromatográfica, provavelmente devido à adsorção irreversível de subprodutos resultantes da reação de derivatização. Sugere-se que sejam estudadas modificações no protocolo analítico. Em relação à absorção do peptídeo γ -Glu-SMC, comprovou-se a sua hidrólise pelo aparecimento de pequenas quantidades de SMC livre no lado seroso dos segmentos intestinais, supondo-se que esta hidrólise tenha ocorrido pela enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT). A reduzida quantidade de SMC livre encontrada poderia ser atribuída a uma eventual perda de atividade desta enzima durante o preparo e manuseio do segmento intestinal. Contudo, em ensaios adicionais, não foi observada perda de atividade desta enzima durante a incubação dos segmentos intestinais em solução nutritiva por 40 minutos. A atividade da enzima γ -GT foi aproximadamente três vezes superior no duodeno do que no jejuno, sendo de relevância em estudos de absorção intestinal. Mais estudos são necessários para um melhor entendimento do processo absorptivo do peptídeo.

ABSTRACT

The biological effects of S-methyl-cysteine (SMC) and the peptide γ -glutamyl-cysteine (γ -Glu-SMC), distributed in some edible legume seeds, mainly in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), are controversial when these compounds are ingested by laboratory animals and humans. In the present study it was investigated the rate of intestinal absorption of SMC and γ -Glu-SMC employing isolated segments of rat intestines and analyzing comparatively the absorption of protein amino acids. The everted segments of duodenum and jejunum were incubated in a nutritive solution and the aminoacids SMC, Phe and Met and the peptide γ -Glu-SMC were added individually in order to measure their absorption rates in intervals of 10 min until reaching 60 minutes of incubation. The absorption rate of each compound was measured by ion exchange chromatography (amino acid analyzer). The absorption rates observed for SMC were higher than those observed for Met and Phe. The same samples were also analyzed by reversed phase-HPLC after derivatization with o-phthalaldehyde (Gustine, 1985). Results did not succeed because the chromatographic column lost efficiency probably due to adsorption of byproducts of the derivatization reaction. We suggest that modifications on the analytical protocol should be developed. Results showed that the peptide γ -Glu-SMC seem to be hydrolyzed supported by the appearance of small amounts of free SMC on the serosal side of the intestines. The hydrolysis was probably catalyzed by the enzyme γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT). The appearance of only small amounts of free SMC could be explained by an eventual loss of the activity of γ -GT during preparation and incubation of the intestinal segments. However, in additional assays, the enzyme did not show any loss of activity during incubation of the segments for 40 min. We observed also that the activity of the enzyme γ -GT was 3 times higher in duodenum than in jejunum. This observation could be relevant for absorption studies employing intestinal segments. Further studies are necessary for a better understanding of the absorption process of the peptide γ -Glu-SMC.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Ocorrência e função da S-metilcisteína e do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína

A S-metilcisteína (SMC) é um aminoácido não-protéico amplamente distribuído nos vegetais, embora predomine nas famílias *Alliaceae*, *Leguminosae* e *Cruciferae* (Kubec *et al.*, 1998). Os estudos concentram-se nestas famílias devido à sua importância econômica e nutricional para a população mundial. Os representantes mais estudados são o alho e a cebola, certas sementes de leguminosas e vegetais folhosos pertencentes as brássicas (Kasai e Larsen, 1980). Nestes vegetais, a SMC participa de um grupo de substâncias importantes, genericamente denominadas S-alc(en)ilcisteínas. Dentre estas, a SMC e o seu respectivo sulfóxido (SMCO) se destacam por representarem a maior parte das substâncias organossulfuradas presentes nos gêneros *Allium* e *Brassica*. Nas sementes de leguminosas, há predominância da SMC na forma de um peptídeo com o ácido glutâmico com a ligação peptídica na posição gama (γ), formando o peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína (γ -Glu-SMC) (Rosenthal e Bell, 1979).

Estas substâncias organossulfuradas mencionadas não participam de estruturas protéicas e a sua função biológica no vegetal vem sendo discutida na literatura, sem ter-se chegado, até o momento, a um consenso. Acredita-se que talvez estejam relacionadas com o armazenamento de compostos orgânicos de nitrogênio e enxofre ou, ainda, que o acúmulo de

alguns aminoácidos livres durante o processo de maturação da semente induziria a planta a sintetizar derivados γ -glutamil, devido à incapacidade de inseri-los em proteínas. Neste caso, o processo seria um mecanismo de detoxificação (Nigam *et al.*, 1969; Benevenga, 1974). Kasai e Larsen (1980) sugerem que função dos derivados γ -glutamil pudesse estar relacionada com o transporte de aminoácidos através de membranas celulares, semelhante ao transporte proposto para animais e microorganismos.

Giada (1995) confirmou, ainda, que a concentração do peptídeo γ -Glu-SMC decresce em sementes de leguminosas durante o processo germinativo, provavelmente por motivo de uma mobilização e degradação do peptídeo; sem, porém, ocorrer aumento paralelo da SMC livre e do ácido glutâmico, acreditando-se, deste modo, numa possível metabolização dos aminoácidos que o compõem.

Estruturalmente, a SMC se assemelha aos aminoácidos sulfurados: metionina (Met) e cisteína (Cys). A SMC se distingue da Met por possuir um átomo de carbono a menos na cadeia lateral. Em relação à Cys, a SMC difere pela presença do grupo metila ligado ao átomo de enxofre. Devido a estas semelhanças, a SMC poderia, como se supunha a princípio, desempenhar algumas das funções bioquímicas destes aminoácidos aos quais se relaciona estruturalmente. No caso da Met, a de doador de grupamentos metila, pela presença do grupo metiltio ($S-CH_3$), e da Cys pelo aproveitamento do esqueleto carbônico e do átomo de enxofre. A **Figura 1** ilustra as estruturas moleculares do peptídeo e dos aminoácidos descritos acima.

Figura 1 - Estrutura química do peptídeo γ -Glutamil-S-metilcisteína e dos aminoácidos S-metilcisteína e sulfóxido de S-metilcisteína, metionina e cisteína.

Muitos aminoácidos pertencentes à fração nitrogenada não-protéica de vegetais, promovem uma forte interação metabólica (toxicidade) quando ingeridos por outros seres vivos. Tal toxicidade pode ser causada pela grande similaridade quanto ao formato e tamanho molecular, com um aminoácido protéico em particular. O comportamento tóxico destes compostos, provavelmente, estaria relacionado com uma ação antagonista sobre certas reações básicas ou uma inibição competitiva de enzimas específicas, além da possível incorporação em proteínas, levando a uma disfunção (Reese, 1979). A substituição de um átomo ou de um grupo de átomos por outro de tamanho equivalente pode produzir moléculas análogas

que possuam atividade tóxica (Fowden e Pea, 1979). Por exemplo, um análogo da Met que possui efeito tóxico seria a selenometionina devido à substituição do átomo de S da Met por Se. Acredita-se que a toxicidade seria em razão da rápida incorporação deste aminoácido nas proteínas no lugar do aminoácido sulfurado original. Temos como um outro exemplo, a canavanina, originada a partir da arginina pela substituição de um átomo de carbono por um de oxigênio, vizinho a amina secundária. A canavanina é incorporada em proteínas de insetos, competindo no metabolismo da arginina, podendo inibir a reprodução e metamorfose dos mesmos. Não foram encontradas na literatura informações recentes sobre a efetiva função metabólica destas substâncias nos vegetais, nem resultados conclusivos sobre a ação biológica que elas poderiam exercer se ingeridas por animais.

Nos vegetais pertencentes à família *Alliaceae*, como na cebola e no alho, estas substâncias, principalmente os sulfóxidos de S-alc(en)ilcisteínas, são descritas na literatura como sendo precursores dos aromas e sabores característicos desses vegetais (Lancaster e Shaw, 1991, Chin e Lindsay, 1994).

Ao contrário dos vegetais da família *Alliaceae*, a SMC e o respectivo peptídeo, a γ -Glu-SMC na forma não oxidada, são encontrados em diversas leguminosas comestíveis, mas não participam na formação de aromas, aparentemente por falta de um sistema enzimático específico.

Entre os anos de 1970 a 1975, alguns poucos autores estudaram a distribuição de peptídeos sulfurados em gêneros e espécies de leguminosas, e a maior quantidade de γ -Glu-SMC foi encontrada no feijão *Phaseolus*

vulgaris, em concentração da ordem de 11,5 μ moles/g de feijão (Zacharius, 1970) e de 14,1 μ moles/g de feijão (Evans e Boulter, 1975).

Giada *et al.*, (1998) deram início aos estudos no Brasil, identificando e quantificando o teor de SMC e o respectivo peptídeo em variedades de feijão *Phaseolus vulgaris*, tendo encontrado um teor médio de 10,9 μ moles de SMC por grama de semente o que equivale aproximadamente a 1,5 g de SMC por 100 g de semente seca, sendo que 80% do aminoácido se apresentava na forma de peptídeo. As quantidades não foram muito diferentes das encontradas na literatura (Zacharius, 1970; Evans e Boulter, 1975). Foi observado também que a proporção entre Met e SMC no feijão *Phaseolus vulgaris* é de cerca de 2:1.

Dando continuidade às pesquisas com outras variedades, espécies e gêneros de leguminosas comestíveis encontradas no Brasil, Barros *et al.* (1999) observaram que as maiores concentrações de γ -Glu-SMC se encontram no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L) indicando ser uma característica genética para esta espécie. O valor médio entre 9 variedades de feijão *Phaseolus vulgaris* foi de 8,31 μ moles de SMC/g de feijão (base seca) enquanto os valores para *Vigna radiata* (n=7) foram de 3,95 μ moles de SMC/g de semente, 2,68 μ moles de SMC/g na semente de *Vigna unguiculata* (n=9), não tendo sido encontrado em sementes de *Vigna mungo* (n=3).

Nos vegetais da família *Alliaceae*, as substâncias mais estudadas têm sido os compostos sulfurados. Estes incluem tiosulfinais, sulfóxidos de S-alcenil-cisteínas, peptídeos γ -glutamil sulfurados e outros. Estima-se

que aproximadamente 80% dos compostos sulfurados do alho correspondam à aliina (sulfóxido de S-2-propenil-L-cisteína) e aos peptídeos γ -glutamil sulfurados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Algumas destas substâncias existem no vegetal na forma de precursores e a sua transformação em compostos com ação biológica, depende da manutenção da atividade de sistemas enzimáticos específicos durante o manuseio e preparo do vegetal (Kubec *et al.*, 1998).

O alho e a cebola vêm sendo usados há milênios pela medicina popular, mas nos últimos anos os produtos comerciais contendo extratos destes vegetais estão mais valorizados. Evidências epidemiológicas atestam efeitos anticancerígenos em pacientes portadores de tumores malignos, pelo aumento do consumo de plantas da família *Alliaceae*, e Organizações de Saúde rotulam o alho e a cebola, como candidatos a “Alimentos Funcionais”. Os efeitos mais importantes descritos na literatura, sob ponto de vista clínico, são as atividades antimicrobianas, aumento da imunidade geral e o efeito sobre o sistema cardiovascular (Milner, 1996; Sundaram e Milner, 1996; Krest e Keusgen, 1999; Ankri e Mirelman, 1999; Siegers *et al.*, 1999). O efeito antimicrobiano é atribuído ao SMCO, por ser precursor do metilmetanotiossulfinato (Kyung e Fleming, 1994). Pesquisadores apontam ainda para outros efeitos benéficos tais como: ação hipoglicemiante, anticolesterolêmica, antifúngica e inibidora da agregação plaquetária (Maw, 1982; Aquel *et al.*, 1991; Kumari e Augusti, 1995; Sheela *et al.*, 1995). A literatura relata também o aumento da secreção de adrenalina e noradrenalina plasmáticas em ratos alimentados com dieta suplementada

com pó de alho (8 mg/kg de dieta) (Oi *et al.*, 1999). Outros estudos também demonstram efeitos anticarcinogênicos da SMC sintética na forma reduzida (Ip e Ganther, 1992; Takada *et al.*, 1997 e Fukushima *et al.* 1997).

A SMC pode ser encontrada na hemoglobina de muitas espécies animais (Bailey *et al.*, 1981), e a sua origem tem sido descrita como sendo endógena, sintetizada a partir da reação da cadeia lateral da Cys com agentes metilantes (Segerback *et al.*, 1978). Conforme Jacob *et al.* (1994), as reações de metilação são de suma importância para processos bioquímicos, incluindo a regulação da expressão de genes pela metilação de DNA e RNA, modulação da função da membrana através da metilação de fosfolipídeos e biossíntese de lipídeos, proteínas, derivados de ácido nucléico, hormônios e neurotransmissores.

Da mesma forma, a SMC presente nas proteínas séricas de indivíduos expostos ao brometo de metila, usado como fumegante, confirma a ocorrência das reações de metilação endógenas, originalmente demonstradas em animais (Baker, *et al.*, 1985, Goergens, *et al.*, 1994, Müller, *et al.*, 1994).

Myrnes *et al.* (1984), estudando tecidos humanos neoplásicos, confirmaram que os compostos N-nitrosos, provenientes da dieta ou de origem endógena, promovem a metilação do DNA (alquilação do oxigênio na guanina), sendo esta alteração correlacionada diretamente com a carcinogenicidade destas substâncias. Todavia, o organismo lança mão de mecanismos de reparação do DNA pela transferência da metila da guanina para resíduos de Cys, sintetizando a SMC através da enzima O-

metilguanina-DNA transferase. Desta forma, os estudos realizados por Myrnes *et al.* (1984), e mais recentemente por outros pesquisadores (Ip e Ganther, 1992; Fukushima *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 1997), justificam a presença da SMC também em tecidos animais.

Acreditamos que a SMC endógena poderia ser o produto de um processo de reparação do DNA, danificado por agentes metilantes, podendo ser considerada assim, uma substância com atividade anticarcinogênica.

Na literatura existem vários relatos sobre a atividade anticarcinogênica de compostos orgânicos contendo selênio em modelos de tumor em animais. Entretanto, tornam-se mais freqüentes os trabalhos que relacionam também o efeito protetor de compostos sulfurados contra o câncer, uma vez que estes se encontram em maior quantidade nos alimentos em relação ao selênio. Ip e Ganther (1992) foram os primeiros a observar efeito anticarcinogênico da SMC em ratos.

Os autores testaram a atividade quimiopreventiva de compostos selênio-orgânicos (selenocistamina, Se-metilselenocisteína e selenobetaína) e análogos sulfurados (cisteamina, SMC e sulfobetaína) em tumor mamário induzido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA). O estudo revelou atividade anticancerígena apenas para a SMC e a cisteamina, embora o requerimento para supressão do tumor por estes compostos tenha sido 500 a 750 vezes mais elevados do que para os compostos contendo selênio. Ainda, não se sabe como a SMC age no retardo da proliferação das células modificadas durante a fase de promoção da carcinogênese.

As poliaminas basicamente estão envolvidas com a divisão e o aumento da proliferação das células epiteliais, possibilitando a ocorrência de carcinogênese, pela ação enzimática da ornitina descarboxilase. Somando-se a isto, a enzima espermina/espermidina N-acetiltransferase atua como limitante da taxa de biodegradação dessas poliaminas.

Em estudo realizado por um grupo de pesquisadores do Japão (Takada *et. al.*, 1997 e Fukushima *et al.* 1997) com compostos organossulfurados, incluindo a SMC e a Cys, observou-se que a administração intragástrica de 100 mg de SMC/Kg de peso corporal inibia a formação de focos hepatocelulares para a glutathione S-transferase na forma placentária em ratos, nos quais se havia induzido a neoplasia com dietilnitrosamina. Da mesma forma, foi verificada uma redução significativa no número de focos, quando a SMC ou a Cys foram administradas na fase de promoção. Além disso, uma simples administração de SMC ou Cys ocasionou a redução das atividades da ornitina carboxilase e da espermina N-acetiltransferase. Os autores especulam que tais aminoácidos sulfurados poderiam estar relacionados diretamente na regulação do metabolismo das poliaminas. Nestes trabalhos, também foi verificada a influência da SMC na expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (proliferating cell nuclear antigen - PCNA) e de "protooncogene *c-jun*" durante a resposta da multiplicação celular precoce no fígado após hepatectomia parcial. O aumento das células positivas de PCNA teve um decréscimo significativo e a expressão de *c-jun* de RNAm, associada à regeneração, foi controlada. Portanto, a supressão da síntese de poliaminas, assim como o controle de

indução da expressão de *c-jun* permitem acreditar que a SMC e a Cys exercem um papel importante na ação quimiopreventiva, inibindo os estágios de iniciação e promoção de hepatocarcinogênese em ratos.

Existe ainda um relato na literatura relativo à atividade inibitória da SMC sobre o crescimento tumoral em ratos. A ingestão de ração AIN 93-G (Reeves *et al.*, 1993), adicionada de 0,34% de SMC, resultou em menor crescimento de células tumorais em relação ao controle, isento de SMC (Allred, *et al.*, 1999). A explicação dada pelos autores se baseia no fato de que células neoplásicas possuem um alto requerimento para a Met. Os autores sugerem que a SMC poderia atuar como um bloqueador no metabolismo da Met, induzindo a sua deficiência e, por conseguinte, inibindo o crescimento tumoral.

Contudo, em trabalho realizado no Laboratório de Análise de Alimentos (FCF-USP), foi observado que o consumo de uma ração experimental contendo 10% de caseína acrescida de 0,34% de SMC causou em ratos uma significativa redução na ingestão voluntária de ração, da ordem de 27%, acompanhada do crescimento desses animais 51% menor em relação ao grupo de animais controle. Este efeito foi proporcional à concentração de SMC na ração, na faixa de 0,6 a 1,2%. Foi verificado também que a suplementação da ração com 0,3% de cistina, na presença de SMC, foi capaz de reverter apenas parcialmente a redução do crescimento dos animais. Nestas condições, os animais cresceram 38% menos do que os animais controle sem a SMC (Padovese, *et al.*, 2001).

Com base nestas informações, em nossa opinião, a SMC pode não estar relacionada diretamente com a redução de tumores independentes de estrógeno, como citado no trabalho de Allred, *et al.* (1999), por interferir no metabolismo da Met, mas sim, por uma ação indireta da SMC que provocaria uma diminuição no consumo de ração pelos ratos, e conseqüentemente reduzindo também a ingestão de nutrientes, em particular a Met, não suprimindo o requerimento indispensável ao crescimento das células tumorais. Esses efeitos fazem supor, num primeiro momento, que a SMC poderia apresentar um efeito biológico antinutricional.

Em contrapartida às ações benéficas citadas anteriormente, vale salientar que os primeiros efeitos adversos em animais foram atribuídos aos sulfóxidos de S-alc(en)il-cisteína, quando bovinos foram alimentados com folhas de brássicas por um período de uma a três semanas. Os animais desenvolveram sintomas de anemia hemolítica aguda iniciada com o aparecimento de agregados de hemoglobina desnaturada dentro dos eritrócitos, seguida de uma acentuada queda do nível de hemoglobina no sangue, perda de apetite, icterícia entre outros sintomas. Entretanto, foi observada uma recuperação dos animais quando a alimentação com couve foi suspensa (Greenhalgh, 1969; Griffiths *et al.*, 1994).

Esses efeitos deletérios foram atribuídos ao dimetilssulfeto e ao metanotiol produzidos a partir do SMCO pela ação das bactérias presentes no rúmen dos animais. Bovinos foram mais susceptíveis do que animais monogástricos, tais como o porco e o coelho. Nestes casos, e ao contrário dos efeitos benéficos verificados após a ingestão de alho e de cebola, o

dimetilssulfeto foi considerado o agente causador da intoxicação por reduzir os níveis de glutathione reduzida (GSH) no eritrócito. Acredita-se que o mecanismo envolvido seria uma oxidação da GSH ou então uma reação do dimetilssulfeto com grupos sulfidril na membrana da hemácia, alterando a permeabilidade da mesma com perda da capacidade do eritrócito em reter a hemoglobina (Maw, 1982; D'Mello, 1992). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a SMC permanece um longo período na circulação sangüínea dando indício de ocorrer uma lenta metabolização para formação de metanotiol e outros metabólitos (Padovese *et al.*, 2001). Estes, por sua vez, podem estar relacionados com alguns efeitos tóxicos, já descritos na literatura (Benevenga *et al.*, 1976; Maw, 1982; D'Mello, 1992).

1.2 Metabolismo da metionina

Procuramos encontrar na literatura informações concernentes às vias de metabolização da Met que pudessem ajudar a explicar os efeitos biológicos adversos observados, quando a ração para ratos era suplementada com SMC (Padovese *et al.*, 2001).

A Met é um aminoácido essencial imprescindível para o crescimento e desenvolvimento normais dos mamíferos, devendo ser ingerido com a dieta. A via de metabolização mais conhecida é a via de transsulfuração/transmetilação, ocorrendo primariamente no fígado.

Esta via inicia-se pela conversão da Met em S-adenosilmetionina (S-AdoMet), considerada uma substância chave, por ser o principal doador de

grupamentos metila no organismo animal, participando dos processos de síntese protéica, transmetilação e biossíntese de poliaminas, cistationina, Cys e outros metabólitos (Stipanuk, 1986). Os aceptores dos grupos metila da S-AdoMet incluem DNA, RNA, proteínas, lipídeos e numerosas moléculas pequenas, tais como a glicina (formando a sarcosina), guanidinoacetato (formando a creatinina) e a fosfatidilcolina (formando a lecitina) (Finkelstein e Martin, 1990; Toborek e Hennig, 1996). Em mamíferos, o conteúdo tecidual de S-AdoMet é uma função do órgão específico e da disponibilidade de Met (Finkelstein, 1990).

Estima-se que entre 70 a 95% da S-AdoMet produzida participa das reações de transmetilação, sendo que a glicina e o guanidinoacetato representam quantitativamente os receptores mais importantes (Griffith, 1987; Stipanuk, 1986). Esta transferência dos grupos metila transforma a S-AdoMet em S-adenosilhomocisteína, que por sua vez, é hidrolisada enzimaticamente em adenosina e homocisteína. A enzima responsável é inibida por um processo de “feed back”, de modo que este processo parece regular inúmeras reações fisiologicamente importantes. A homocisteína ocupa um ponto de ramificação no ciclo metabólico. Cerca de metade da homocisteína formada reage com a serina formando a cistationina, que é, em seguida, convertida irreversivelmente a Cys, α -cetobutirato e amônia. O restante da homocisteína é remetilado em reações catalisadas pela metionina sintase ou pela betáína-homocisteína metiltransferase, envolvendo o metabolismo de folatos e colina endógenos. Esta parece ser a única reação de transmetilação do organismo que não envolve a S-AdoMet.

Daqui se conclui que a SMC só poderá atuar como doador de metilas se participar de uma metabolização semelhante à via Met → S-AdoMet

Em vegetais, e microorganismos, a reação homocisteína → Cys ocorre também no sentido inverso, sendo esta a chave na biossíntese da Met (Giovanelli *et al.*, 1980). O restante da homocisteína é remetilado em reações catalisadas enzimaticamente, dentre estas a reação de transmetilação é a única independente de S-AdoMet.

Benevenga, em 1974, propôs que a metabolização da Met poderia ocorrer por uma via alternativa, sem a formação da S-AdoMet, o que explicaria os efeitos tóxicos observados, quando a Met é ingerida em excesso. Por esta via, a Met é transaminada por transaminases citoplasmáticas ou mitocondriais a α -ceto- γ -metiolbutirato na presença de piruvato ou fenilpiruvato. O α -ceto- γ -metiolbutirato é descarboxilado na mitocôndria para formar o 3-metiltiopropionato que é metabolizado a metanotiol (Steele e Benevenga, 1979; Cooper, 1983). Na **Figura 2** são representadas as duas vias de metabolização da Met, a título de comparação.

Estudos, tanto **in vitro**, como **in vivo**, confirmaram a ocorrência da via de transaminação (Benevenga, 1974; Benevenga *et al* 1976; Case e Benevenga, 1976; Benevenga & Steele, 1984; Livesey, 1984). Experimentos **in vivo** realizados por Benevengan e Egan (1983) demonstraram que em ratos e carneiros, 60-80% da Met não é metabolizada pela via de transsulfuração, sugerindo, em particular, que a transaminação poderia ser importante nestas espécies. A importância desta via no metabolismo da Met

em mamíferos, no entanto, ainda não está bem caracterizada (Finkelstein e Martin, 1986).

Figura 2- Metabolização da metionina via transaminação e transsulfuração (adaptado de Blom *et al.*, 1988).

Em estudos realizados por Blom *et al.* (1989), foi observado que a transaminação pode ocorrer em indivíduos saudáveis com ingestão normal de Met, embora pareça ser pouco relevante, quando comparada à taxa de

transsulfuração que parece ser a via predominante. Todavia, a questão necessita de maiores investigações, pois existem controvérsias na literatura. Scislowski e Pickard (1994), estudando a produção de metanotiol, a partir da Met, em mitocôndrias de fígados de ratos, concluíram que a via de transaminação desempenha um papel importante na metabolização da Met nestes animais, mas reconheceram que as suas conseqüências fisiológicas ainda necessitem de maiores estudos.

Entretanto, Finkelstein e Martin (1986) observaram, num estudo feito com ratos, uma adaptação da via de transsulfuração para a metabolização de quantidades excessivas de Met. Os autores variaram a concentração de Met nas dietas oferecidas a ratos, entre 0,3 e 3,0%, sendo que a concentração de 0,3% atende às necessidades do rato em crescimento. A adição de 1,5% da Met resultou num aumento significativo da quantidade de S-adenosilhomocisteína no fígado, sugerindo uma metabolização pela via de transsulfuração. Resultados semelhantes foram observados com os acréscimos de até 3%, revelando também significativo aumento da concentração de S-adenosil-metionina, o que confirma a existência de um processo adaptativo do processo de transsulfuração a elevadas concentrações de Met.

O excesso de Met, devido ao acúmulo de homocisteína, pode induzir um estresse oxidativo e injúrias nas células endoteliais e finalmente resultar em aterosclerose (Toborek e Hennig, 1996). A explicação para este fato seria a autooxidação de compostos com tióis livres como a homocisteína, que podem ser a fonte de radicais livres, responsáveis pelo estresse oxidativo

celular. A reação inicial e a taxa limitante na formação do radical do tiol é a transferência de elétron do ânion tiolato para um íon de um metal de transição, como o ferro e o cobre, a partir daí, são formados radicais de oxigênio e tiila (Munday, 1989). Devido a sua alta reatividade, os radicais tiila são capazes de degradar e inativar diversas enzimas e outras substâncias biológicas importantes. Eles podem, também, iniciar a peroxidação lipídica (Grisham e McCord, 1989) e oxidarem LDL (Heinecke *et al.*, 1993). Apesar da Met não ser substrato para a autooxidação, seus metabólitos (homocisteína e tióis ligados à proteína) são suscetíveis a este tipo de reação oxidativa (Parthasarathy, 1987; Munday, 1989).

Por outro lado, Finkelstein e Martin (1986) sugerem que a transaminação, que não parece ser de importância no fígado, possa ser significativa em outros tecidos cujo ciclo da Met não seja completo, excetuando o fígado. Os autores propõem também que esta mesma via alternativa por transaminação seria ativa somente em níveis extremamente elevados de Met. É plausível acreditar que o excesso de Met possa ser degradado pela via de transaminação, porém, Engstrom e Benevenga (1987) sustentam que a demonstração da via de transaminação exige concentrações de Met, impossíveis de ocorrer **in vivo**.

Friedman e Gumbmann (1984) estudaram diversos análogos da Met, dentre eles, a SMC. Uma dieta à base de uma mistura de aminoácidos, deficiente em Met, foi suplementada com análogos e observado o crescimento em camundongos em relação ao da dieta normal, e foi verificado que a dieta suplementada com SMC deprimiu drasticamente o

crescimento dos animais (13% do valor observado com a dieta normal). Este resultado levou os autores à conclusão de que se tratava de um aminoácido tóxico. Contudo, em outras circunstâncias, Eyre *et al.* (1981) suplementaram diferentes fontes protéicas (albumina do ovo, proteína microbiana, *Vicia faba* L. e mistura de aminoácidos) com SMC, visando conhecer o papel biológico que este aminoácido desempenha em ratos. De acordo com os resultados concluíram que este aminoácido não exerce nenhum efeito sobre o valor biológico das fontes utilizadas atribuindo-lhe um papel nutricional passivo.

Benevenga (1974) acredita que o grupo metila da SMC pode ser convertido a CO₂ no rato e que este aminoácido seria incapaz de recuperar um animal deficiente em Cys. Também, considerando que a incubação de SMC com uma preparação contendo metionina adenosiltransferase não aumenta o fosfato inorgânico liberado a partir de ATP sugere que este aminoácido não é ativado a um composto parecido a S-AdoMet, e que, portanto, não seja metabolizado pela via de transsulfuração.

Pode-se, então, concluir que a SMC parece ser metabolizada primariamente pela via de transaminação, enquanto que a Met parece ser degradada por essa via somente quando em altas concentrações, devido à saturação da via de transsulfuração, e que a presença do metanotiol (um dos metabólitos da via de transaminação), nestes aminoácidos induz manifestações tóxicas. Entretanto, o mecanismo pelo qual a Met e a SMC exercem seus efeitos adversos necessita de maiores estudos.

Padovese *et al.* (2001) demonstraram em estudo com ratos *in vivo* o aparecimento do peptídeo γ -Glu-SMC na forma de SMC livre na circulação

sanguínea periférica, após a sua ingestão. No entanto, não foi comprovado se esta hidrólise seria realizada por enzimas hepáticas ou intestinais.

Estes mesmos autores observaram um retardo na absorção do peptídeo quando comparado com a SMC livre. E apesar da semelhança estrutural com a Met, foi observado um maior tempo de permanência da SMC no sangue em relação à Met. O que poderia prevenir o aparecimento de efeitos tóxicos mais pronunciados.

1.3 Importância do Metanotiol

O metanotiol é o metabólito característico na via de transaminação da Met. De acordo com Benevenga *et al.* (1976), os metabólitos produzidos por essa via podem estar relacionados com a toxicidade da Met.

Alguns estudos revelaram que a mitocôndria seria o principal local da oxidação da Met pela via transaminação, devido à presença da enzima metionina transaminase, à descarboxilação oxidativa do ácido 2-oxo-4-metiltiobutírico e à oxidação do ácido 3-metiltiopropiônico (Jones e Yeaman, 1986; Lau *et al.*, 1989; Scislowski e Pickard, 1994). No referido trabalho foram examinados, **in vitro** com mitocôndrias isoladas de rato, fatores metabólicos que controlam a produção de metanotiol pela Met. Foi sugerido também que o metanotiol seria formado no trato intestinal (Conn e Lieberthal, 1979).

O metanotiol é uma molécula muito reativa e, normalmente, não é encontrada no sangue na sua forma livre; quando adicionado a este, torna-

se completamente adsorvido pelos eritrócitos, isto é, estaria ligado à hemoglobina (Tangerman *et al.*, 1985). Entretanto, Doizaki e Zieve (1977) acreditam que este composto formaria uma ligação dissulfídica covalente com proteínas do sangue. Logo em seguida à formação do metanotiol, poderia haver formação de dimetilssulfeto (CH_3SCH_3), proteína-S-S- CH_3 (um dissulfeto misto de metanotiol e um outro tiol cujo componente X é desconhecido) e sulfato (Blom *et al.*, 1989; Scislowski e Pickard, 1994).

O dimetilssulfeto é considerado o agente causador direto da intoxicação, provavelmente por provocar uma diminuição nos níveis de GSH reduzida através de sua ação oxidante, ou pela reação com grupos sulfidríla na membrana do eritrócito, alterando, desta forma, sua permeabilidade, tornando a hemácia incapaz de reter a hemoglobina (Maw, 1982; D'Mello, 1992).

Blom e Tangerman (1988) demonstraram, *in vitro*, que 80 a 90% do metanotiol, quando incubado com sangue, é oxidado, reagindo com os eritrócitos, ou seja, resultando num rompimento da cadeia central de carbono-enxofre. Em geral, o átomo carbono é oxidado a ácido fórmico e o enxofre, a sulfeto ou sulfato. Neste mesmo estudo, os autores revelam que o metanotiol é metilado a dimetilssulfeto na membrana eritrocitária, e que apenas 10% permanecem ligados a eritrócitos. Os autores acrescentam, ainda, que existem sérios problemas metodológicos nesta área representados pela dificuldade em isolar e quantificar estas substâncias.

Suarez *et al.* (1998) descrevem no seu trabalho que, em estudos realizados por Keith *et al.* (1984) e Weisiger *et al.* (1980), foi observado que

o mecanismo de detoxificação tecidual primário para sulfeto de hidrogênio (H_2S) e metanotiol ocorre por metilação catalizada pela tiol S-metiltransferase, ou seja, esta reação converte H_2S a metanotiol, e este a dimetilssulfeto.

Blom *et al.* (1990) citam um estudo feito por Zieve *et al.* em 1974, em que o metanotiol seria um composto extremamente tóxico, e uma interação sinergista deste, com amônia e ácidos graxos, poderia induzir o coma.

1.4 – Absorção de aminoácidos e peptídeos

A assimilação de dietas protéicas no intestino do homem e outros mamíferos inicia-se pela digestão das proteínas no lúmen intestinal a fim de gerar produtos menores que são absorvidos nos enterócitos. Os produtos finais da digestão protéica não são exclusivamente aminoácidos livres, mas uma mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos.

A **Figura 3** ilustra esquematicamente o processo de assimilação das proteínas no intestino delgado. A digestão inicia-se com ativação de proteases e peptidases gástricas e pancreáticas, liberando aminoácidos, di e tripeptídeos (representando a maioria, cerca de 60%) e peptídeos grandes. Os aminoácidos livres são absorvidos pelo enterócito por sistemas de transporte específicos. Os di e tripeptídeos são transportados intactos pela membrana por um sistema de transporte específico para peptídeos, e em seguida, na sua maioria, hidrolisados por peptidases citossólicas altamente ativas, produzindo aminoácidos livres. Estes, por sua vez, são transportados

para a corrente sanguínea atravessando a membrana basolateral. Os peptídeos maiores são hidrolisados por uma variedade de peptidases presentes na borda em escova da membrana do epitélio intestinal, resultando em aminoácidos livres ou pequenos peptídeos que poderão ser absorvidos (Ganapathy *et al.*, 1994, Johnson, 1997, Roberts *et al.*, 1999).

Figura 3 – Esquema de digestão e absorção proteica. A digestão no lúmen produz 40% de aminoácidos livres e 60% de peptídeos consistindo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos (adaptado de Johnson, 1997).

O epitélio intestinal apresenta mecanismos de transportes eficientes para absorver tanto aminoácidos livres, bem como di e tripeptídeos, por meio de múltiplos sistemas de transporte no epitélio intestinal para carrear os produtos finais da digestão, sendo esta uma característica singular para a assimilação proteica. Também se caracteriza pela grande complexidade e especificidade de transporte. De acordo com Rajan *et al.* (2000) os sistemas

de transportes de aminoácidos diferem pela especificidade e sua força motriz.

1.4.1 Sistemas de transporte para aminoácidos e peptídeos

Estruturalmente o enterócito é polarizado com membranas distintas, ou seja, apical e basolateral, separadas pelas junções de oclusão (**tight junctions**) cuja funcionalidade pode ser observada na **Figura 4** (Barthe *et al.*, 1999; Balimane *et al.*, 2000; Szachowicz-Petelska, *et al.*, 2001). O transporte passivo, também chamado de difusão passiva ocorre, ou através da membrana do enterócito (transcelular), ou via junções de oclusão, isto é, passando entre as células absorptivas (paracelular). O transporte mediado por carreador envolve uma interação específica entre a molécula e o transportador, constituindo um mecanismo saturável utilizado por moléculas pequenas e hidrofílicas. São dois tipos de transporte existentes: - ativo (ligado a Na^+ ou H^+ com transportadores bifuncionais) e passivo mediado por transportadores. O ativo é um processo que requer energia metabólica e pode agir contra um gradiente de concentração do substrato, diferente do passivo que apenas é influenciado pela concentração do substrato.

Endocitose é um processo que requer energia e serve para absorção de macromoléculas.

As vias pelas quais os nutrientes ou mesmo medicamentos atravessam o enterócito, podem ser divididas em dois grupos principais: - processos que não dependem de fornecimento de energia, isto é transporte

passivo e; mecanismos que necessitam de aporte de energia, denominados de transporte ativo.

No transporte passivo, moléculas pequenas em meio aquoso atravessam a membrana por simples difusão. Entretanto, a maioria das substâncias penetra na membrana apenas na presença de proteínas de transporte responsáveis por esta passagem (carreadores ou canais). O transporte por meio de carreadores pode se denominar passivo ou ativo. É designado passivo quando a passagem ocorre através de canais. Já no transporte ativo, uma proteína carreadora deve executar algum trabalho para deslocar um íon ou uma molécula contra um gradiente de concentração. Este mecanismo só pode ser realizado por carreadores específicos com o fornecimento de energia para o processo de transporte (Szachowicz-Petelska, *et al.* 2001).

Em 1952, Christensen e cols. iniciaram os estudos relativos aos sistemas de transporte de aminoácidos em mamíferos, tendo sido os principais responsáveis por esta caracterização (Kilberg *et al.*, 1993; Ganapathy *et al.*, 1994).

Foram descritos no mínimo sete sistemas de transporte de aminoácidos, na membrana da bordadura em escova do intestino delgado (Kilberg *et al.*, 1993; Ganapathy *et al.*, 1994), e na membrana basolateral, responsável pela passagem dos aminoácidos para a corrente sanguínea, foram reportados no mínimo quatro sistemas de transporte (Ganapathy *et al.*, 1994; Johnson, 1997).

Figura 4 – Transporte de moléculas através do epitélio intestinal: (1) difusão passiva através da membrana; (2/3) transporte mediado por carreador; (4) endocitose; (5) transporte paracelular e (6) P-glicoproteína. Adaptado de Barthe *et al*, 1999.

Enquanto a absorção de aminoácidos envolve um mecanismo bastante complexo com a participação de múltiplos sistemas de transporte, a assimilação de peptídeos intactos parece ser mediada predominantemente por um único sistema transportador (PEPT 1) (Rajan *et al.*, 2000; Leibach e Ganapathy, 1996). Este transportador, expresso na membrana bordadura em escova das células intestinais, é responsável pela absorção de di e tripeptídeos (Ganapathy *et al.*, 1994; Leibach e Ganapathy, 1996).

O PEPT 1 é um sistema de transporte ativo, sendo acoplado a H^+ , dependente de energia metabólica, saturável e, ainda, pode ocorrer inibição mútua do transporte entre os compostos (Leibach e Ganapathy, 1996; Walter *et al.*, 1996; Ganapathy *et al.*, 1997).

1.5 Absorção de peptídeos γ -glutamil

Em diversos vegetais, especialmente nas espécies de *Allium*, em vegetais folhosos da família *Cruciferae* e em sementes de algumas leguminosas comestíveis, como no feijão, existem inúmeros γ -glutamil peptídeos, entre eles os γ -glutamilpeptídeos contendo enxofre na sua molécula.

Merece destaque a γ -Glu-SMC e o seu sulfóxido, como já citado anteriormente, e apesar da sua crescente importância na área da nutrição, pouco se conhece sobre a sua absorção intestinal, devido à quase inexistência de peptídeos semelhantes com ligação amida na carboxila da posição γ . Constitui exceção a GSH, um tripeptídeo (γ -Glu-Cys-Gly) amplamente distribuído em tecidos vegetais, de mamíferos e de microrganismos, possuindo importantes funções fisiológicas, que fez com que essa molécula fosse exaustivamente estudada sob os mais diversos aspectos fisiológicos e bioquímicos, servindo de modelo para estudos comparativos com moléculas análogas (**Figura 5**).

Sabe-se que a GSH é hidrolisada exclusivamente pela enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT). Esta especificidade se deve à ligação pouco comum entre o glutamato e a Cys através da carboxila γ , ao invés da ligação convencional na carboxila alfa (α).

Figura 5 - Estrutura da glutathiona, glicina γ-glutamilcisteínila. O grupo amino terminal do glutamato e a cisteína são ligados pelo grupo γ-carboxil do glutamato. Adaptado de Lu, 1999.

– γ-Glutamyltranspeptidase

A γ-GT, nos mamíferos, encontra-se bem caracterizada e possui várias e importantes funções de âmbito fisiológico e fármaco-toxicológico (Martin e Slovin, 2000).

Como reportado por Carrière *et al.* (1998) a presença da γ-GT no intestino delgado é bem documentada. No intestino, esta enzima é localizada na porção apical das células epiteliais, envolvendo o vilo jejunal e sendo assim, prontamente, considerada uma enzima da membrana bordadura em escova. A γ-GT é uma enzima glicoprotéica ligada às membranas da bordadura em escova nos ápices das vilosidades intestinais e nas membranas dos túbulos proximais dos rins de ratos (Marathe *et al.*, 1979). Esta enzima faz parte de vias de metabolização e de síntese para seqüestrar, transportar e modular a atividade de hormônios, neurotransmissores e outros compostos biologicamente ativos (Meister, 1988; Pace-Asciak *et al.*, 1990; Ishikawa, 1992; Carter *et al.*, 1997).

A γ -GT existe em vários tecidos, tais como, rins, pâncreas, glândula mamária, fígado, intestino, pulmão, baço, tireóide, medula e retina (Szasz, 1974). Possuindo elevadas atividades enzimáticas nas células epiteliais dos túbulos proximais renais, nos vilos do jejuno, plexos coronários, dutos biliares, vesículas seminais, epidídimo e corpos ciliares, conforme o seu desempenho nos processos de transporte (Meister e Tate, 1976; Meister *et al.*, 1976). Estudos realizados por Curthoys e Shapiro (1975) e Meister e Tate (1976) com γ -GT no intestino, demonstraram que esta enzima situa-se primariamente nas células apicais dos vilos do jejuno, sendo considerada uma enzima da bordadura em escova intestinal (Kuno *et al.*, 1983). Foi observada também a existência de um gradiente de atividade enzimática no jejuno, onde se verifica uma atividade muito maior nas células diferenciadas apicais dos vilos em comparação à encontrada nas células das criptas (Curthoys e Shapiro, 1975; Cornell e Meister, 1976). A **Figura 6** ilustra o gradiente, onde se observa o local de maior concentração da γ -GT.

Figura 6 – Localização da atividade de γ -glutamiltanspeptidase nas células dos vilos do intestino delgado de ratos, em comparação a outras enzimas (adaptado de Curthoys e Shapiro, 1975).

A γ -GT catalisa a hidrólise da ligação peptídica na posição γ da GSH, da glutathiona oxidada (GSSG), bem como de diversos conjugados da GSH, transferindo o grupamento γ -glutamil (γ -Glu) para um outro acceptor (Meister, 1988; Lu, 1999).

Alguns trabalhos apontam também para uma hidrólise de outros γ -glutamil di e tripeptídeos (Martin e Slovin, 2000) e dos substratos sintéticos γ -glutamil-*p*-nitroanilida e γ -L-glutamil (7-amido-4-metilcumarina) (Szasz, 1974). Apesar de não mencionar especificamente, a princípio, supõe-se que esta enzima poderia hidrolisar a γ -Glu-SMC também, o que explicaria o aparecimento da SMC livre no plasma sanguíneo de ratos, que receberam o peptídeo por intubação gástrica (Padovese *et al.*, 2001).

Na **Figura 7** podemos observar a ação enzimática da γ -GT sobre a γ -glutamil-*p*-nitroanilida. Esta reação deu origem a um método para se medir a atividade da γ -GT (Szasz, 1974), utilizando a γ -glutamil-*p*-nitroanilida como substrato e a glicilglicina como acceptor para o grupamento γ -Glu. A atividade da γ -GT é diretamente proporcional à quantidade de *p*-nitroanilina liberada por unidade de tempo.

Até agora, foram identificadas poucas enzimas que agem sobre a posição da ligação peptídica γ . Além da γ -GT, existe a γ -glutamil-leucotrienase, embora esta tenha uma especificidade extrema sendo incapaz de atuar sobre a GSH e seus conjugados e o substrato sintético γ -glutamil-*p*-nitroanilida (Heisterkamp *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1997), e a γ -GT

de levedura que catalisa a hidrólise, porém não promove a transpeptidação (Pennickx e Jasper, 1985).

Figura 7 – Princípio da reação de transpeptidação.

Neste processo de hidrólise, o grupamento γ -Glu é transferido para a água, para um outro aminoácido aceptor, (L-Met, L-Phe, L-Trip, L-Ala, por exemplo) ou um di ou tripeptídeo, formando um novo peptídeo com ligação na posição γ .

Contudo, paralelamente à transpeptização, a GSH pode ser absorvida intacta por meio de um sistema de transporte único, existente nos dois pólos do enterócito o que permite a sua rápida passagem para o sangue e vice-versa (Hunjan e Evered, 1985; Vincenzini *et al.*, 1988; Vincenzini *et al.*, 1989).

De acordo com Vincenzini *et al.*, (1992) não há uma interação deste sistema com outros compostos γ -glutamil e nem com di e tripeptídeos normais o que excluiria a possibilidade do peptídeo γ -Glu-SMC ser

transportado da mesma maneira. Da mesma forma, Ganapathy (1994) relaciona a absorção da GSH a um transportador específico distinto dos transportadores de outros pequenos peptídeos, provenientes da dieta, atribuindo esta especificidade à presença da ligação γ . Assim, há dúvidas com relação ao comportamento da γ -Glu-SMC, uma vez que nenhum dos autores, que verificou a absorção da GSH, realizou estudos concomitantes à γ -Glu-SMC. Não se sabe se a γ -Glu-SMC atravessa a parede intestinal e atinge a corrente sangüínea, intacta, ou se a molécula é hidrolisada por alguma peptidase antes ou após o seu transporte para o sangue, liberando seus dois aminoácidos. Alguns trabalhos sugerem a segunda opção, como sendo a via predominante. A absorção na forma intacta envolve diversas enzimas e o gasto de ATP, tornando-se o processo pouco econômico sob ponto de vista metabólico. Por outro lado, a enzima γ -GT que seria específica para o transporte da GSH, de acordo com Vincenzini *et al* (1992), poderia atuar também sobre aminoácidos, dipeptídeos e derivados e análogos da GSH (Tate e Meister, 1974; Garvey *et al.*, 1976; Hughey e Curthoys, 1976; Carter *et al.*, 1997).

Resultados prévios no Laboratório de Análise de Alimentos (FCF-USP) demonstraram que a γ -Glu-SMC é absorvida após a sua hidrólise, aparecendo no soro sangüíneo a SMC na sua forma livre, como já mencionado. Supõe-se que a hidrólise seria catalisada pela enzima γ -GT, portanto a mesma enzima que atua sobre a GSH.

1.6 Absorção intestinal utilizando a técnica de segmentos intestinais evertidos

A literatura descreve vários métodos para acompanhar e medir a absorção intestinal de nutrientes e medicamentos utilizando ensaios **in vitro**. Aqui serão relacionadas as vantagens e desvantagens das seguintes técnicas: segmentos intestinais evertidos, **Ussing chamber**, cultura de células Caco-2 e perfusão intestinal.

Segmentos intestinais evertidos:

A partir de 1950, iniciou-se o estudo de transporte de açúcares e aminoácidos, do lado mucoso para o seroso, com a técnica de intestinos evertidos (Wilson e Wiseman, 1954). O ensaio realizado pelos autores se deu pela incubação da região intestinal de interesse num meio salino contendo o açúcar e os aminoácidos. Segmentos intestinais foram incubados e em vários intervalos de tempo analisou-se a concentração do açúcar no espaço seroso.

Com o passar dos anos, modificações foram adicionadas a esta técnica, tais como, oxigenação constante (através de borbulhamento com O₂) dos tecidos durante a etapa de incubação; aumentando, assim a viabilidade dos tecidos. Este modelo tornou-se adequado para o estudo do mecanismo de absorção dos nutrientes e drogas permitindo que os transportes ativo e passivo, pudessem ser estudados.

Este modelo apresenta uma vantagem analítica sobre outros de absorção **in vitro** devido ao volume relativamente pequeno da amostra no

lado seroso, e à rapidez no acúmulo das substâncias absorvidas. Constitui uma técnica simples e de baixo custo com uma boa reprodutibilidade. É um sistema de dois compartimentos que permite calcular a cinética de absorção da substância nas células, e também a sua transferência, pela medição da concentração desta substância presente no lado seroso ao final da incubação (Barthe *et al.*, 1999, Balimane *et al.*, 2000). Segundo Barthe *et al.* (1999), esta técnica oferece muitas vantagens sendo bastante útil no estudo da liberação, absorção e metabolismo de compostos (medicamentos e nutrientes) e serve para avaliar o efeito de ativadores da absorção. Por outro lado, alguns problemas poderiam ser causados pela morte celular decorrente da parada da circulação sanguínea que poderia levar à perda rápida da capacidade absorptiva. Além do mais, a inversão do intestino pode prejudicar a sua morfologia, modificando a sua funcionalidade (Balimane *et al.*, 2000). Somando-se a isto, o processo continua apenas um modelo e o resultados de absorção podem não refletir o perfil real de absorção no ser humano.

“Ussing chambers”:

O **ussing chamber** é um sistema **in vitro**, no qual pequenas seções da mucosa intestinal são grampeadas entre duas câmaras contendo tampão, onde é feita a medição do transporte epitelial de moléculas. Uma característica única para este método é a possibilidade de se medir a resistência elétrica da membrana durante o ensaio. Esta técnica é ideal para estudar o mecanismo de absorção de nutrientes e medicamentos, incluindo

o transporte ativo e passivo; limitação de absorção pelo metabolismo intestinal e regiões intestinais diferenciadas na absorção de substâncias. Como em muitos estudos **in vitro** esta técnica apresenta algumas desvantagens que incluem: interrupção da circulação sanguínea e terminações nervosas, perda rápida da viabilidade dos tecidos ao longo do experimento e mudanças morfológicas e funcionais de proteínas carreadoras durante o processo cirúrgico e montagem do sistema (Barthe *et al.*, 1999, Balimane *et al.*, 2000)

Cultura de células (Caco-2)

Para se observar o transporte de compostos através dos enterócitos, é de suma importância que se tenha um sistema polarizado mimetizando as condições de funcionamento do intestino. As culturas de enterócitos não possuem uma boa disponibilidade e não formam uma monocamada organizada e diferenciada. Sendo assim, é comum a utilização de culturas celulares obtidas a partir de linhagens de células originadas de tecido normal, tumores quimicamente induzidos ou de cânceres de cólon humano, sendo este último o mais utilizado. Estas linhagens de células têm a capacidade de se diferenciarem e se tornarem polarizadas na cultura (Barthe *et al.*, 1999, Balimane *et al.*, 2000).

As principais linhagens de células intestinais provenientes de câncer de cólon humano são: Caco-2, HT-29 e T-84.

A Caco-2 tem sido o modelo celular bastante utilizado para se estudar a funcionalidade dos transportadores intestinais, bem como os dois

principais mecanismos de transporte (transcelular e paracelular). A principal vantagem que esta técnica oferece é o fato destas células serem de origem humana, de modo que não existem diferenças entre as espécies nas características morfológicas e fisiológicas das células intestinais. Além do mais, não há a necessidade do uso de animais para os ensaios. Por outro lado, são várias as limitações desta técnica. Inicialmente, as células são derivadas de células cancerosas e, por conseguinte, podem ter propriedades diferentes das células normais. As monocamadas celulares Caco-2 são isentas de células **goblet** produtoras de mucina, em vista disso não se pode avaliar o impacto da camada de muco existente no epitélio intestinal. Este método exige uma ótima padronização da cultura e condições experimentais e dispêndio de tempo para a preparação das células. Podem ocorrer divergências nos resultados entre diferentes laboratórios devido a possíveis diferenças nas condições de obtenção das culturas celulares. A sua maior desvantagem é a reduzida taxa de absorção; o nível de expressão de algumas enzimas ou proteínas transportadoras pode ser distinto em relação aos enterócitos normais (Barthe *et al.*, 1999, Balimane *et al.*, 2000).

Hidalgo e Jibin (1996) comparam valores obtidos de alguns aminoácidos (fenilalanina, ácido aspártico e ácido glutâmico) pelas células Caco-2, apresentando-se inferiores aos verificados nas células intestinais normais.

Vesículas de membranas isoladas

As vesículas de membranas são preparadas a partir de tecidos intestinais e são capazes de averiguar a interação de compostos para uma membrana específica; Hopfer *et al* (1973) foram os pioneiros na utilização desta técnica. Através destas vesículas é possível o estudo das propriedades de transportes de nutrientes e medicamentos em nível celular (tanto bordadura em escova, bem como basolateral).

Estas vesículas têm como vantagem principal a sua utilização prolongada por serem criopreservadas. Contudo, durante o processo de isolamento das vesículas quase sempre ocorre o prejuízo das proteínas transportadoras e enzimas (Balimane *et al.*, 2000).

1.7 Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência como método alternativo à análise em autonalisador de aminoácidos

Apesar da cromatografia por troca iônica (IEC) ainda ser o principal método em uso para análise de aminoácidos, devido às vantagens em relação à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nos últimos anos, o HPLC tem sido preferido nas determinações de hidrolisados protéicos pelo tempo reduzido das análises e o limite de detecção melhorado.

No caso específico da análise de aminoácidos, estes necessitam de derivatização para que possam ser detectados. São descritas na literatura duas metodologias básicas distintas: a derivatização dos aminoácidos antes

da separação cromatográfica e a derivatização realizada após a cromatografia (Cohen e Strydom, 1988; Sarwar e Botting, 1993; Fountoulakis e col. 1998).

Outros métodos de análise que não são de uso comum, se referem à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por ionização à pressão atmosférica (Chromatography atmosphere pressure ionization mass spectrometry); à eletroforese capilar (CE) que ainda se encontra em desenvolvimento; à cromatografia eletrocinética micelar modificada por ciclodextrinas (Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography) e à cromatografia em fase gasosa (GC), muito utilizada no passado, mas que perdeu espaço, para a cromatografia de troca iônica (Fountoulakis e col., 1998; Smith, 1997).

Os métodos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por ionização à pressão atmosférica e de cromatografia eletrocinética micelar modificada por ciclodextrina ainda são muito recentes e não têm sido comparados com outras metodologias mais usuais (Fountoulakis e cols. 1998).

Vários trabalhos publicados na literatura se referem à quantificação de aminoácidos por eletroforese capilar, originalmente desenvolvida para a separação de íons inorgânicos (Fountoulakis e cols. 1998). A vantagem aparente desta metodologia reside na sua alta resolução e sensibilidade. Entretanto, é um método ainda de pouco uso na análise bioquímica de aminoácidos, especialmente quando se trata de amostras complexas e com

alto número de aminoácidos distintos. Este fato dificulta a comparação de resultados com outros métodos.

A técnica de GC foi muito usada no período de 1960 - 1980 e se acoplada a espectrometria de massa ainda pode ser considerada um método analítico alternativo (Fountoulakis e cols., 1998).

Quanto à cromatografia em camada delgada (TLC), bastante utilizada no passado, esta vem sendo empregada exclusivamente para testes qualitativos ou semi-quantitativos (Sherwood, 1990).

Em 1958, Spackman e cols., foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem a separação por cromatografia de troca iônica (IEC), seguida de derivatização pós-coluna com um cromóforo ou fluoróforo. A ninhidrina é o reagente mais utilizado para esta finalidade, sendo a detecção realizada por colorimetria. Tanto a separação, quanto a quantificação dos aminoácidos livres ou liberados após hidrólise é feita através de analisador automático de aminoácidos. Este método é bastante confiável e a resolução dos aminoácidos é muito boa, proporciona também uma alta reprodutibilidade, contudo requer um tempo mais longo para a análise (ao redor de 1h) e possui um nível de detecção limitado, não sendo capaz de detectar quantidades inferiores a 100 pmol de cada aminoácido.

Uma grande vantagem da derivatização pós-coluna é a separação cromatográfica de substâncias interferentes, antes da reação, especialmente importante quando a amostra é constituída de misturas complexas de composição desconhecida. Em geral, as colunas de troca iônica permitem também a separação de um número considerável de aminoácidos

homólogos (Fountoulakis e cols., 1998). Por outro lado, a automação do sistema, incluindo um “reator on-line”, tornou o sistema bastante complexo, originando picos mais largos e um ruído da linha de base. É um método que também requer dois comprimentos de onda para detecção, 440 nm para prolina e 570 nm para outros aminoácidos. No entanto, vale salientar, que uma outra grande vantagem do analisador de aminoácidos em relação a todos os demais métodos, consiste na possibilidade de análise concomitante de um elevado número de aminoácidos (40 ou mais) numa única corrida (Smith, 1997; Fountoulakis e cols., 1998).

Passaremos a discutir os pontos mais importantes na utilização do HPLC como um método para separação e quantificação de aminoácidos. Vários autores descrevem esta metodologia como sendo um procedimento bastante sensível, acurado, rápido e simples (Müller *et al.*, 1994, Smith, 1997). A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa é considerada a mais adequada para análise de peptídeos, devido à eficiência e rapidez de separação, quando comparada às outras técnicas por HPLC e à análise por IEC (Ozols, 1990). Sobretudo, o uso de solventes voláteis o torna ideal para separação tanto analítica como preparativa, eliminando assim a necessidade de purificação (dessalinização) de amostras que se destinam a outras análises subseqüentes (Mant *et al.*, 1997). No entanto, o comportamento das colunas é variável, de acordo com o fabricante; além disso, as mesmas perdem resolução com o tempo de uso e também podem desenvolver pressão de retorno mais rápido de que as colunas de IEC.

O HPLC pode ser utilizado na separação de aminoácidos em colunas por troca iônica com derivatização pós-coluna, usando ninhidrina ou o-ftalaldeído (OPA) ou com derivatização pré-coluna, seguida de separação por fase reversa. Porém, a metodologia de derivatização pré-coluna é, na maioria das vezes, a mais usada devido à utilização de equipamento mais simples e ao custo mais baixo de tal sistema em comparação à derivatização pós-coluna (Engelhardt, 1986; Cohen e Strydom, 1988). O uso de resinas com partículas de tamanho reduzido (3 - 5 μ m), colunas de espessura pequena, bombas de alta pressão e válvulas de injeção, permitem a separação de misturas de aminoácidos derivatizados em 10 minutos. Acoplados a detectores extremamente sensíveis, estes equipamentos possibilitam, ainda, detectar aminoácidos numa concentração igual ou abaixo de pmol (Cohen e Strydom, 1988; Darvey e Ersser, 1990; Sarwar e Botting, 1993). Smith (1997) citou no seu trabalho que todos os métodos de pré-coluna são dotados de uma excelente exatidão e precisão na análise de peptídeos purificados em HPLC. Estes métodos exigem a derivatização dos aminoácidos na mistura hidrolisada e a subsequente separação e identificação dos derivados por HPLC em fase reversa. A detecção de fluorescência é empregada em dois dos métodos, o que proporciona um aumento de 5 a 10 vezes na sensibilidade sobre os procedimentos de detecção por UV.

Considerando as vantagens dos métodos que empregam a derivatização pré-coluna, faremos uma análise crítica das metodologias de derivatização mais utilizadas.

Existem vários reagentes que são utilizados para a derivatização, principalmente eletrófilos que podem reagir com o grupo α -amino livre (Smith, 1997; Cohen e Strydom, 1988). Os mais comuns são: cloreto 5-dimetilaminanaftaleno-1-sulfonila (cloreto de dansila); cloreto 4-dimetilaminazobenzeno-4-sulfonila (cloreto de dabsila); cloroformato 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl); O-ftalaldeído (OPA) e fenilisotiocianato (PITC). Outros reagentes utilizados em menor proporção são: 2,4-dinitrobenzeno-1-flúor (FNDB); amido-5-L-alanina-2,4-dinitrofenil-1-flúor (DNPA); cloreto 4-N,N-dimetilaminobenzeno-4-sulfonila (DABS-Cl); carbamato 6-aminoquinolila-N-hidroxissuccinimidila (AQC); 3-5-dicarbaldeído-1-metoxycarbonilindolisina (LDA) e 2-oxa-1,3-diazol-4-cloro-7-nitrobenzeno (NDB-Cl). O OPA e o PITC são os reagentes mais utilizados para a derivatização pré-coluna de hidrolisados protéicos (Sherwood, 1990; Sarwar e Botting, 1993).

O cloreto de dansila produz derivados fluorescentes, que apesar de sua elevada sensibilidade para detecção, podem apresentar problemas. A derivatização tanto por cloreto de dansila, bem como por cloreto de dabsila proporciona baixo rendimento, a menos que sejam adicionados em excesso (Lin e Wang, 1980; Rutledge e Rudy, 1987). Sendo, portanto, necessária uma extração para remover ácidos sulfônicos, produzidos pela reação, e que podem acarretar interferência na separação cromatográfica (Sherwood, 1990). O tempo para a derivatização, de acordo com dados da FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION (1991), é razoavelmente longo, ou seja, 30 minutos em comparação com o

OPA de 30 segundos e FMOC-Cl de 5 minutos. E o seu uso é indicado para análise de cistina livre ou peptídeos de cadeia curta (Sarwar e Botting, 1993), assim como foi usado para a análise de hidrolisados de colágeno e elastina (Negro *et al.*, 1987).

O FMOC-Cl reage rapidamente com aminoácidos primários e secundários para formar produtos altamente fluorescentes; embora, seja preferencialmente recomendado para a determinação das aminas secundárias. Entretanto, na reação ocorre a formação de álcool fluorenilmetílico que deve ser removido antes da análise (Einarsson *et al.*, 1983, Cunico, 1986). Busto e cols. (1997) sugerem a utilização deste mesmo reagente para determinação do conteúdo de aminas biogênicas em alimentos. Quanto à sensibilidade pode alcançar a detecção de até fmol (Cohen e Strydom, 1988; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991), apesar de apresentar um sério problema na análise da histidina, devido à formação de um derivado mono- ou dissustituído. Um outro inconveniente é o fato de que o produto de hidrólise com água (FMOC-OH) também fluoresce, e quando o FMOC é usado em excesso (por exemplo, com uma amostra traço desconhecida), a interferência provocada pelo reagente pode ser significativa.

O FDNB e DNPAAs são pouco utilizados e discutidos na literatura. Apresentam interferência dos produtos secundários e podem ser usados para determinar aminas secundárias, possuindo sensibilidade em nível de picomole (pmol) e o tempo de derivatização é bastante longo, 30 minutos

para FDNB e 50 minutos para DNPA (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991).

Em relação às vantagens e/ou desvantagens do DABS-Cl, AQC e LDA, poucos comentários existem na literatura, porém Stocchi *et al.* (1989) usou a derivatização pré-coluna com o primeiro, determinando aminoácidos primários e secundários. Os derivados de AQC se mostraram mais estáveis do que os derivados de feniltiocarbamila (PTC) (Cohen *et al.*, 1993). Já a técnica usando o LDA exige um gradiente binário sofisticado para alcançar limites de detecção de 0,2 fmol para leucina e 200 fmol para metionina. Prolina, tirosina e triptofano não podem ser analisados por este método (Fountoulakis e cols. 1998).

A aplicação do PITC para derivatização pré-coluna é bastante difundida e os resultados obtidos podem ser considerados equivalentes ao IEC clássico. O PITC reage com aminoácidos livres para formar derivados de feniltiocarbamila (PTC), os quais podem ser separados por coluna de HPLC de fase reversa, e possuem uma forte absorção na faixa ultravioleta. Sendo assim, os seus derivados são detectados pela absorção dos raios UV em um único comprimento de onda, isto é 254 nm, com uma sensibilidade de 1pmol (Cohen e Strydom, 1988; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991; Sarwar e Botting, 1993; Fountoulakis e cols., 1998). O PITC forma o mesmo cromóforo com aminas primárias e secundárias, sem a necessidade de um procedimento adicional para analisar aminoácidos secundários. No entanto, a utilização deste comprimento de onda para detecção apresenta seus

próprios problemas, em particular com amostras biológicas. O excesso de PITC não reagente também absorve neste comprimento de onda, sendo necessária a sua remoção antes da análise (Sheerwood, 1990). A detecção pela absorbância no UV é geralmente menos sensível do que a determinação por fluorescência ou por detector eletroquímico. Os derivados de PITC são bastante estáveis, chegando a meses sua estabilidade, se forem estocados secos em congelador (Heinrikson e Meredith, 1984, Cohen e Strydom, 1988). O tempo de derivatização é cerca de 20 minutos e pode ocorrer interferência por contaminantes presentes no eluente.

Um outro reagente bastante usado para a derivatização de aminoácidos é o OPA. Esta substância não é fluorescente por si própria, mas na presença de um tiol, produz um intermediário, que por sua vez irá reagir com aminas primárias produzindo adutos isoindólicos, fluorescentes, facilmente identificáveis e quantificáveis (Lindroth e Mopper, 1979; Turnell e Cooper, 1982; Sherwood, 1990; Sarwar e Botting, 19938; Kok *et al.*, 1997; Parmentier, *et al.*, 1998). Busto (1997) observou que uma das maiores vantagens do OPA, sobre outros reagentes de derivatização, é a capacidade de reagir rapidamente com aminas, possibilitando a detecção de aminas biogênicas em concentração de fmol.

O tempo de derivatização com OPA é de no mínimo 30 segundos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION 1991) e a maior desvantagem do método inclui a instabilidade dos indóis e a não reatividade do OPA com aminoácidos secundários, além de apresentar baixa reprodutibilidade (Cohen e Strydom,

1988; Sherwood, 1990). Por conseguinte, a maior dificuldade deste reagente é não reagir com a prolina e a hidroxiprolina, sendo necessária a adição de cloramina T, um agente oxidante altamente reativo, antes do OPA. Além disso, a cistina produz um derivado com fluorescência mínima. Este problema é contornado através de um pré-tratamento da cistina/cisteína com ácido iodoacético antes da derivatização. A derivatização com OPA na presença de um reagente redutor, para os aminoácidos primários, e com FMOC-Cl para os secundários, é bastante utilizada. Os derivados são separados em colunas de HPLC de fase reversa e a quantificação se baseia nas propriedades fluorescentes dos mesmos. O tempo total de análise, incluindo derivatização pré-coluna, separação, lavagem da coluna e ciclos de calibração, é de aproximadamente 20 minutos, sendo de 45 minutos para a análise de fluidos biológicos (Cohen e Strydom, 1988; Sarwar e Botting, 1993; Fountoulakis e cols., 1998). A utilização do método OPA é preferível para análises rotineiras de aminoácidos primários livres, excetuando-se a cistina (Sarwar e Botting, 1993).

Diante das vantagens e desvantagens citadas anteriormente para cada um dos agentes derivatizantes, de acordo com a literatura, vimos que a utilização da derivatização com OPA parece ser adequada para a análise da SMC, visto que este procedimento não apresenta dificuldades com amostras biológicas, diferente dos problemas que ocorrem com o PITC. Adotamos a técnica de derivatização com OPA como método para ser usado com HPLC.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da absorção intestinal da SMC e do peptídeo γ -Glu-SMC através de ensaios utilizando segmentos intestinais isolados de ratos, avaliando-se a velocidade de absorção por comparação com a taxa de assimilação de aminoácidos protéicos.

Os ensaios laboratoriais compreenderam:

- 1) Ensaios de absorção com segmentos intestinais evertidos de ratos.
- 2) Análise das taxas de absorção de aminoácidos empregando cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos.
- 3) Análise das taxas de absorção por método alternativo de cromatografia líquida de alta eficiência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostra

Foi utilizado feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar IAC-Carioca, proveniente do Instituto Agrônomo de Campinas – SP, armazenado em câmara fria a 4 °C até o momento de uso. As sementes foram moídas em moinho analítico POLYMIX – KCH – Analytical Mill A 10 (KINEMATICA AG, Luzern) e tamisadas em peneira de 0,250 mm (mesh 60).

3.1.2 Reagentes e outros materiais

S-metil-L-cisteína (SMC), γ -glutamil-*p*-nitronanilida, glicilglicina, TRIZMA®-tris[hidroximetil]aminometano, reagente “spray” ninhidrina e reagente “spray” iodoplatinato de potássio, o-ftalaldeído (OPA) e tetraborato de potássio (todos da Sigma); acetonitrila e metanol (grau HPLC – Carlo Erba e Merck); ácido trifluoracético (TFA - grau espectroscopia – Merck), tampões eluentes, tampão citrato (NaS Beckman® Coulter Inc. pH=2,2, Fullerton, CA), reagente de ninhidrina e mistura padrão de aminoácidos; resina de troca catiônica Amberlite IR-120 Plus (Fluka); membrana de filtração de 0,22 μ m e de 0,45 μ m (Millipore Corporation); etanotiol (Aldrich); e nembutal (pentobarbital sódico).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.3 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. albinus) da linhagem "Wistar", machos, adultos, pesando entre 180 e 270g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Para a análise histológica foram usados ratos da mesma linhagem do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração da farinha de feijão para obtenção do extrato bruto

O peptídeo γ - Glu-SMC foi extraído e purificado a partir do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), em quantidade suficiente para todos os experimentos, conforme procedimento descrito por Kasai *et al.* (1986), e modificado em nosso laboratório por Giada *et al.* (1998).

- 50 g da farinha do feijão foram extraídos com 250 mL de etanol 70% por 2 dias, em câmara fria a 4°C, sob agitação. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada em centrífuga Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments®) a 12.100x g por 30 minutos a uma temperatura de 10°C, e o resíduo foi reextraído com o mesmo volume de etanol 70% empregado na primeira extração e nas mesmas condições de tempo e temperatura. Os

sobrenadantes das duas extrações, então, foram combinados e concentrados à vácuo em rotaevaporador (Heidolph Elektro GmbH e Co. KG, Kelheim) a uma temperatura de no máximo 40° C até um volume de 25 mL.

O extrato, assim obtido, foi lavado 4 vezes com 20 mL de clorofórmio e as duas fases separadas em funil de separação, recolhendo-se a fase superior aquosa. A lavagem com clorofórmio teve por finalidade remover o álcool do extrato, provocando a precipitação de proteínas co-extraídas; estas se posicionam na interface entre a fase aquosa e a de clorofórmio. Na etapa seguinte, a fase aquosa contendo o peptídeo e parte das proteínas precipitadas, foi centrifugada a 12.100 g a 10° C por 20 minutos para que as proteínas contaminantes pudessem ser removidas. O resíduo foi desprezado e o sobrenadante completado com água destilada para 100 mL em balão volumétrico. Este extrato, então foi denominado de extrato bruto (EB), contendo o peptídeo em questão, aminoácidos livres e açúcares de baixo peso molecular.

No total, foi realizada a extração de cerca de 400 g de feijão, fornecendo aproximadamente 800 mL de EB, que foi, então, concentrado e liofilizado. O armazenamento foi em congelador a -20°C, até a utilização nos ensaios.

Na **Figura 8** apresentamos o esquema de extração da farinha de feijão para obtenção do EB.

Figura 8 - Esquema da extração da farinha de feijão para a obtenção do extrato bruto contendo os peptídeos sulfurados. Adaptado de Giada *et al.* (1998).

3.2.2 Purificação parcial do extrato bruto

Foi realizada uma purificação parcial, por cromatografia de troca iônica, com a finalidade de remover os carboidratos presentes no EB.

Uma coluna de vidro de 30 cm de comprimento com 1,8 cm de diâmetro foi empacotada com resina de troca iônica Amberlite IR - 120 (H^+ , 1,9 meq/mL). Após cada uso, a mesma era regenerada pela passagem de 100 mL de NaOH (0,5M) para remoção de íons, seguido de lavagem com água até pH neutro. A coluna foi ativada com 500 mL de HCl 1,0 M, promovendo a substituição dos íons Na^+ por H^+ , e em seguida, removeu-se o excesso de íons H^+ por lavagem exaustiva com água.

2 g de EB liofilizado foram dissolvidos em aproximadamente 10 mL de H_2O sendo esta solução aplicada na coluna. A coluna foi lavada com aproximadamente 400 mL de água num fluxo de 100 mL/hora até reação negativa para carboidratos [reação com fenol e ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Os aminoácidos adsorvidos na coluna foram eluídos com NH_4OH 1,0 M e recolhidas várias frações, 20 mL cada, até que não fossem mais detectados compostos sulfurados reduzidos (Met e SMC), borrifando-se o iodoplatinato em um papel de filtro com aproximadamente 0,2 mL da solução a ser testada. A presença de manchas brancas sobre um fundo róseo indica a presença de tais compostos (Toennies e Kolb, 1951). As frações contendo os aminoácidos e o peptídeo foram concentradas, liofilizadas e armazenadas em congelador até o momento de uso.

O procedimento de purificação parcial (**Figura 9**) foi repetido por diversas vezes para a obtenção de material suficiente para a realização dos ensaios com animais.

Figura 9 - Esquema de purificação do extrato bruto para a obtenção de uma fração livre de carboidratos. Adaptado de Padovese (1997).

3.2.3 Análise do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína e da S-metilcisteína livre por cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos

A composição em aminoácidos do EB e de outras amostras foi determinada por cromatografia de troca iônica (IEC) em autoanalisador de

aminoácidos Beckman® modelo 7300 Gold system (Beckman Instr. Palo Alto, CA), empregando: coluna única de sódio, reagente de ninhidrina e tampões eluentes em condições padronizadas, descritas pelo fabricante do equipamento, para a análise de hidrolisados protéicos. As áreas dos picos de cada aminoácido, lidas em 570nm, foram integradas e comparadas com as áreas correspondentes aos padrões.

O peptídeo γ -Glu-SMC foi identificado e quantificado, medindo-se a quantidade de SMC após a hidrólise ácida do peptídeo, comparando-se as áreas sob as curvas, com aquela da SMC padrão. Foram hidrolisados 6 mg de EB, parcialmente purificado e liofilizado, com 1 mL de HCl 6 N em ampola à vácuo, durante 3 horas à 110°C. Após este período, as ampolas foram abertas e o HCl foi removido em dessecador contendo pastilhas de NaOH e o hidrolisado dissolvido e convenientemente diluído em tampão citrato pH=2,2. Todas as amostras foram filtradas em unidades filtrantes de 0,22 μ m (Millipore, JBR 610268). A análise do EB parcialmente purificado, antes e após a hidrólise permitiu a identificação e quantificação do peptídeo no EB.

3.2.4 Análise do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína e da S-metilcisteína por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

3.2.4.1 Análise do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína

A análise de peptídeos pode ser realizada por HPLC em fase reversa sem a necessidade de derivatização da amostra. O procedimento foi

baseado nos métodos descritos para peptídeos (Varanda e Miranda, 1997; Miranda *et al.*, 1993; Mant e Hodges, 1991; Fogaça *et al.*, 1999), tendo sido adotado os seguintes detalhes quanto aos equipamentos e reagentes, condições cromatográficas e preparo da amostra:

- Equipamentos e reagentes:

Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, Tokyo, Japan (Class – M 10A) com duas bombas (LC-10 AD VP), injetor automático (SIL-10AD VP), forno com controle de temperatura (CTO-10 AS VP), detector de arranjo de diodos (SPD- M 10 AVP), detector de fluorescência (RF-10 AXL) e um sistema de software (Class VP 5.032) para a aquisição dos dados.

A separação foi feita em coluna analítica Vydac C18 (5 μ , 250 mm x 4,5 mm i.d., 300 Å), tendo sido anteposta uma coluna de guarda Vydac (5 μ m, 4,6 mm i.d.).

Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC e foram previamente filtrados em membrana HV 0,45 μ m (Durapore, HLVP04700). Os solventes foram deaerados durante 10 minutos em desgaseificador da marca Shimadzu, modelo DGU– 2A.

- Condições cromatográficas:

Para a separação do peptídeo foi utilizado um sistema com dois solventes, formando a fase móvel.

Solvente A: TFA – 0,1%

Solvente B: 20% de acetonitrila no solvente A.

- Gradiente de eluição:

Iniciou-se o gradiente com 5% solvente B, atingindo 75% solvente B ao final da corrida em 23 minutos.

Fluxo: 1,0 mL/minuto

Volume de injeção: 10 μ L

Detector: arranjo de fotodiodos; detecção em 210 nm.

As condições empregadas nesta análise seguiram as recomendações e sugestões da Prof^a Assoc. Maria Tereza Macchini Miranda do Laboratório de Química de Peptídeos, do Departamento de Bioquímica - Instituto de Química da USP.

Testes prévios, empregando solvente B contendo 60 % de acetonitrila, resultaram na eluição do peptídeo em 5,6 minutos, muito próximo à frente do solvente ($\pm$ 3 minutos).

Reduzindo-se a concentração de ACN para 30% e depois para 20%, a eluição do peptídeo ocorreu em 7,7 minutos e, ainda, foi verificada a separação de uma substância interferente que se encontrava embutida ao utilizar uma concentração mais elevada de acetonitrila. Já, a redução da concentração de acetonitrila para 10% provocou a aproximação entre o peptídeo e a substância interferente, e a 5%, houve co-eluição de ambas as substâncias.

A partir destes testes preliminares, foi estabelecida a concentração de 20% a 30% de acetonitrila no solvente B como sendo aquela que oferece a melhor integração da área referente ao peptídeo. A opção pela

concentração de 20% foi tomada por uma questão de economia de solventes.

Nas **Figura 10** (a-d) podem ser observados os cromatogramas referentes à eluição do peptídeo nas diferentes concentrações de acetonitrila.

Figura 10 – Cromatogramas do peptídeo γ -glutamyl-S-metilcisteína extraído do extrato bruto, eluído nas diferentes concentrações de ACN: 60% (A); 20% (B); 10% (C) e 5% (D).

- Análise da amostra:

Uma quantidade de aproximadamente 12 mg de EB, contendo o peptídeo γ -Glu-SMC foi dissolvido em 100 mL de água deionizada, sendo 10 μ L desta solução injetados no cromatógrafo. A identificação do peptídeo foi feita fracionando-se manualmente o eluato da coluna, coletando-se o material eluído em 8,7 minutos e testando-o quanto a sua reatividade com iodoplatinato.

Para tal, uma amostra do EB foi injetada em duplicata e 2,5 minutos antes do início da eluição do peptídeo foi realizada a coleta manual de 4,5 mL do eluato. As duas frações obtidas foram combinadas e liofilizadas. Ressuspendeu-se o material liofilizado em 0,1 mL de água, que foi transferido para um papel de filtro e borrifado com iodoplatinato, resultando numa mancha clara sobre um fundo róseo, confirmando a identidade do peptídeo.

3.2.4.2 – Análise da S-metilcisteína livre

A análise da SMC por HPLC, ao contrário da determinação do peptídeo γ -Glu-SMC necessita de uma derivatização para a sua correta quantificação.

Foi escolhida a metodologia de derivatização descrita por Gustine (1985) para a análise de sulfóxido de SMC, empregando o-ftalaldeído (OPA) como agente derivatizante.

O mecanismo simplificado da reação entre o OPA, e o grupamento amina do aminoácido SMC, na presença de etanotiol, produzindo um derivado fluorescente, está representado na **Figura 11**. O etanotiol reage inicialmente com o OPA conferindo uma maior estabilidade (Cronin, *et al*, 1979; Hill, *et al.*, 1979), embora reduza um pouco a fluorescência do produto final (Fleury e Ashley, 1983).

Figura 11 – Esquema simplificado da reação do o-ftalaldeído (OPA) com o aminoácido S-metilcisteína (SMC) e etanotiol (RSH).

Diversos tióis foram empregados em estudos encontrados na literatura, tendo sido obtidos os melhores resultados com etanotiol e metanotiol (Cronin *et al.*, 1979; Hill *et al.*, 1979; Fleury e Ashley, 1983).

Procurou-se validar a metodologia preparando inicialmente uma curva padrão de SMC com soluções de concentração crescente (7,5, 15,0, 30,0, 45,0, 60,0 e 75,0 μ moles de SMC/100 mL de água deionizada).

Para a etapa de derivatização, 10 μ L destas soluções foram completados para 700 μ L com metanol, adicionando-se, a seguir, 200 μ L de tetraborato de potássio 0,5 M (pH 10,4) e 100 μ L do derivatizante OPA (20 μ L

de etanotiol e 20 mg de OPA p/ mL de metanol). A solução de OPA deverá ser preparada diariamente e permanecer em frasco âmbar. A reação de derivatização da amostra se completa dentro de 1 minuto. O tempo de reação (temperatura ambiente) foi padronizado exatamente em 2 minutos, injetando-se a solução no cromatógrafo imediatamente após decorridos os 2 minutos. O esquema para a derivatização é apresentado na **Figura 12**.

Figura 12 – Esquema para o método de derivatização da amostra utilizando o reagente o-ftlaldeído (OPA) (de acordo com a metodologia de Gustine, 1985).

Equipamentos e reagentes:

Foi utilizado o mesmo equipamento de HPLC utilizado para a análise do peptídeo, substituindo-se o detector de arranjo de fotodiodos pelo detector de fluorescência (RF-10 AXL).

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau HPLC, tendo sido filtrados em membrana HV 0,45 μm (Durapore, HLVP04700).

Condições cromatográficas:

A separação foi feita em coluna LC 18 (5 μm , 150mm x 4,6 mm i.d., 120 Å) Supelcosil™ Supelco, seguindo-se os procedimentos descritos por Marks *et al.* (1992), com algumas modificações, aumentando-se a concentração da acetonitrila para 30% e utilizando-se gradiente.

Foram utilizadas fases móveis constituídas de tampão fosfato de potássio (20 mM pH 7,0) (solvente A) e acetonitrila 40% em A (solvente B). A condição inicial se deu com 50% de solvente B, a um fluxo de 1,0 mL/minuto, finalizando-se com 95% de solvente B no tempo de 15 minutos. Os autores mencionados utilizaram o acetonitrila na concentração de 16% no mesmo tampão (50mM) e fluxo isocrático. O volume de injeção foi de 10 μL e a detecção por detector de fluorescência (excitação 329 nm e emissão 450 nm).

Na **Figura 13** é apresentado um cromatograma referente à análise do padrão de SMC.

3.2.4.5 Identificação do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína por espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa foi utilizada para confirmar a identidade do peptídeo separado por HPLC.

Figura 13 - Separação de isoindol de S-metilcisteína (15 mmoles/100 mL H₂O) em coluna LC 18. Fases móveis: tampão fosfato de potássio 20mM (pH 7,0) [solvente A] e 40% de acetonitrila em A [solvente B]. Gradiente: 5:95 (% solvente B) em 15 min., fluxo 1,0 mL/min.

Uma amostra de peptídeo purificado foi obtida por HPLC, conforme descrito em **3.2.4.3**, liofilizada e ressuspensa em 1,5 mL de TFA. Desta solução foram tomados 10 µL e aplicados num suporte aluminizado de 1,5 µm de espessura e secos sob fluxo de nitrogênio. A análise foi realizada, em cooperação técnica com o Dr. Eduardo Macchione, por espectrometria de massa por desorção de plasma (PDMS – Plasma Desorption Mass Spectrometry) num espectrômetro de massa compacto por tempo de voo (25 cm de comprimento de voo), desenvolvido no Laboratório de Instrumentação e Partículas do Instituto de Física da USP (Macchione *et al.*, 1994).

A metodologia PDMS é uma técnica bastante utilizada para a determinação de biomoléculas não-voláteis (MacFarlane e Torgerson, 1974; Chait *et al.*, 1981), tendo como fundamento a fissão espontânea de radionuclídeo ²⁵²Cf. Este método se baseia na formação de um par de íons

energeticamente carregados, por cada fissão, e que se movem em direções opostas. Um destes íons irá se chocar com um detector (de partida), que imediatamente irá disparar um cronômetro eletrônico de alta precisão, na medida em que o outro íon colide com a amostra, ionizando as moléculas da superfície. A partir daí, os íons secundários emitidos da superfície da amostra, percorrerão uma região de campo livre com velocidade constante antes de ir de encontro a um segundo detector (de chegada). O intervalo de tempo entre os sinais de partida e chegada dá a informação do tempo de voo (Macchione *et al.*, 1994) que pode ser convertido na massa dos íons secundários por um procedimento de calibração.

Na **Figura 14**, apresentamos o espectro de massa do peptídeo γ -Glu-SMC apontando os sinais correspondentes aos íons moleculares cationizados, similares aos obtidos por Giada *et al.* (1998).

Figura 14 – Espectro de íons positivos do peptídeo γ -glutamyl-S-metilcisteína proveniente do extrato bruto determinado por PDMS por tempo de voo. Os picos correspondentes aos íons cationizados da molécula do peptídeo foram identificados como $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ e $[M + 2Na-H]^+$.

3.2.5 Ensaio biológico com rato

3.2.5.1 Absorção de aminoácidos em sistema *in vitro*, com segmentos intestinais evertidos

Animais

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração comercial. Doze a 14 horas antes do experimento, foram submetidos a jejum com acesso à água *ad libitum*.

Para determinar a velocidade de absorção e metabolização do peptídeo γ -Glu-SMC e do aminoácido SMC em comparação a aminoácidos protéicos, foram realizados ensaios *in vitro*, utilizando segmentos intestinais evertidos de ratos, otimizando-se inicialmente as condições experimentais.

Crane e Wilson, em 1958, utilizaram originalmente a metodologia de segmentos intestinais evertidos de ratos anestesiados com éter para medir a absorção de glicose. Entretanto, é conhecida a dificuldade em se trabalhar com este anestésico devido à dose necessária para provocar a anestesia se situar no limiar da dose letal. Em 1983, Karasov e Diamond utilizaram o anestésico nembutol (Pentobarbital sódico) de efeito mais duradouro e com menor risco para a vida do animal. Outros ensaios de absorção de nutrientes, por deslocamento cervical dos animais, isto é, não usando anestésicos, foram realizados, sem, no entanto, mencionar os prováveis prejuízos à integridade e funcionalidade das microvilosidades intestinais em

função do tempo decorrido após a parada circulatória (Wilson e Wiseman, 1954; Zdunczky *et al.*, 1996).

Medimos a absorção *in vitro* com segmentos intestinais evertidos, baseando-nos no método descrito por Karasov e Diamond (1983) com algumas modificações, utilizando isoladamente os aminoácidos Phe, Met e SMC. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (5 g/100 mL solução fisiológica) na proporção de 80 mg do anestésico/Kg de peso do animal (Wayforth, 1980).

O abdômen foi aberto por uma incisão na linha média para a retirada do segmento intestinal que se deu por um corte na parte proximal do duodeno e um outro na porção distal do íleo; o mesentério foi removido, permanecendo uma pequena quantidade de gordura ao longo da linha de ligamento do mesentério. De cada animal foi utilizado um segmento do intestino delgado de aproximadamente 20 cm. O segmento intestinal foi lavado com solução gelada de *Ringer* [128 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM, KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ e 20mM NaHCO₃ (pH 7,3 - 7,4 a 37°C)], e evertido com um bastão de alumínio de 2,8 mm de diâmetro e 55 cm de comprimento. Este foi usado para empurrar o final do íleo para dentro do lúmen até aparecer a abertura duodenal, para completa inversão. Foram cortados segmentos de aproximadamente 10 cm do duodeno e do jejuno, pesando cerca de 0,7 a 1 g, e novamente lavados, agora do lado mucoso, com solução gelada de *Ringer*. Uma das extremidades do segmento intestinal foi conectada a uma cânula de vidro (**Figura 15 A**) e a outra amarrada (formato de um saco) e, então, imersa num tubo de vidro (20 cm

de comprimento x 2,3 cm de diâmetro - **Figura 15 B**), contendo 70 mL de solução de *Ringer* (a 37°C), adicionada do aminoácido ou peptídeo cuja absorção se procurara medir. A concentração de cada aminoácido nesta solução foi 5 mM (Phe, Met ou SMC). O conjunto foi mantido a 37°C, sob oxigenação através do borbulhamento de mistura carbogênica (5% de CO₂ - 95% O₂ - **Figura 15 D**). O segmento intestinal recebeu através da cânula de vidro 2 mL da solução de *Ringer*. Mediu-se a concentração da substância absorvida, retirando alíquotas de 100 µL do interior da cânula a partir do tempo zero, em intervalos de 10 minutos até completar 60 minutos. Passado o tempo final de incubação, foram cortadas as extremidades amarradas de cada segmento intestinal, em seguida os segmentos foram pesados e levados para estufa a 105°C, por 4h, para a remoção da umidade, visto que os resultados são expressos em µmoles/g de intestino seco. A **Figura 16** apresenta o esquema simplificado para o ensaio de absorção.

Figura 15 – Sistema modelo *in vitro* para absorção de aminoácidos. (A) cânula de vidro; (B) tubo de vidro; (C) rolha de borracha; (D) agulha para entrada da mistura carbogênica; (E) Agulha para saída de gás.

Figura 16 – Esquema simplificado do ensaio biológico relativo ao estudo de absorção dos aminoácidos S-metilcisteína, metionina e fenilalanina e do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína.

Os primeiros ensaios tiveram a finalidade de otimizar o modelo experimental e nos ensaios subseqüentes foram avaliadas as velocidades relativas de absorção dos aminoácidos e do peptídeo γ -Glu-SMC.

3.2.5.2 Monitoramento da integridade morfológica da mucosa epitelial

Para que não houvesse nenhum comprometimento no estudo da absorção foram realizadas análises histológicas, avaliando-se o efeito do tipo de anestesia e do tempo decorrido entre a parada de circulação

sangüínea e a incubação do segmento intestinal em solução fisiológica, sobre a integridade estrutural da mucosa intestinal.

Para tal, foram removidos dois segmentos (10 cm) do intestino (de cada animal), um analisado imediatamente após a anestesia e o outro, de acordo com o tempo despendido até a montagem do sistema. Foram avaliados, também, segmentos intestinais analisados 7 e 10 minutos após a parada circulatória do animal conforme **Quadro 1**.

Quadro 1 – Condições dos ensaios para avaliação da integridade morfológica dos segmentos intestinais.

N.º de animais	tipo de anestésico	Tempo decorrido para a retirada do segmento intestinal após a parada circulatória	tempo total anterior ao início da incubação (minutos) *
03	pentobarbital	imediate	7
02	éter	imediate	7
02	éter	imediate	8
02	éter	imediate	10
01	éter	imediate	12
01	éter	07 minutos	17
01	éter	10 minutos	17

* A incubação para todos os ensaios se deu por um tempo de 40 minutos.

Três ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (5% em solução fisiológica) e dez, por inalação com éter etílico em câmara saturada.

Foram realizados ensaios paralelos, observando o efeito do tempo de incubação dos segmentos intestinais evertidos por 40 minutos em solução nutritiva, sobre a integridade morfológica das vilosidades.

Análise histológica

Pequenos anéis de 0,5 cm de comprimento do duodeno e jejuno foram fixados em solução Carnoi (metanol, clorofórmio e ácido acético glacial na proporção de 6:3:1) por 10 h e em seguida, desidratados em álcool etílico 70%.

Foram preparadas lâminas com cortes histológicos, coradas com hematoxilina/eosina e os cortes analisados por microscopia óptica com um aumento de 100 a 400 vezes. Nesta etapa, contamos com o auxílio do Prof. Dr. Luís Guerra da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

3.2.5.3 Análise da concentração dos aminoácidos absorvidos e do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína por cromatografia de troca iônica

As alíquotas retiradas do compartimento seroso dos segmentos intestinais incubados foram acrescidas de 300 μ L de tampão citrato pH=2,2 (NaS Beckman®) e filtradas em membrana de 0,22 μ m. As amostras foram analisadas por IEC em autoanalisador de aminoácidos para avaliação da absorção dos aminoácidos e do peptídeo por comparação das áreas com os respectivos padrões.

3.2.5.4 - Atividade da enzima γ -glutamyltranspeptidase em intestino de rato

3.2.5.4.1 - Preparação do homogenato de intestino

A atividade da enzima γ -GT foi medida em homogenatos de intestinos (duodeno e jejuno) de ratos, previamente mantidos em jejum. Os tecidos foram triturados (aproximadamente 0,7 a 0,9 g) por 2 minutos a 30000 rpm, em homogeneizador (OMNI TH, Gainesville), na presença de 15 mL de solução contendo 0,21 M manitol, 0,07 M sacarose e 0,1 mM EDTA, ajustada para pH 7,4. Ao final, o volume foi completado para 25 mL em balão volumétrico. O homogenato foi centrifugado a 12.100 g à temperatura ambiente (25° C) por 15 minutos e alíquotas (100 μ L) foram utilizadas para determinar a atividade da γ -GT. Este procedimento foi semelhante ao descrito por Oliveira e Fujimori (1996).

Os homogenatos foram preparados a partir de intestino de ratos, imediatamente após o sacrifício dos animais, e depois da inversão e incubação dos mesmos em solução de Ringer por 45 minutos.

3.2.5.5 - Atividade da γ -glutamyltranspeptidase

A atividade da γ -GT do homogenato no intestino foi verificada através da liberação de *p*-nitroanilina pela hidrólise do substrato sintético γ -glutamyl-*p*-nitroanilida na presença de glicilglicina como aceptor do grupo γ -

glutamil, conforme metodologia descrita por Oliveira e Fujimori (1996) que se baseou no trabalho original de Szasz (1974). Foi tomado 0,1 mL do homogenato do intestino e adicionado de 1,0 mL do substrato consistindo de 2 mM de γ -glutamil-*p*-nitronanilida, 50 mM de tampão Tris (pH 8,25) e 50 mM de glicilglicina em cubetas de 1 cm³. As cubetas foram agitadas e as leituras foram realizadas exatamente após 1, 2 e 3 minutos, correspondendo a $\Delta A/\text{minutos}$ (diferença das absorbâncias por minuto), em espectrofotômetro em 405nm.

Foi preparado um “branco”, inativando a enzima, previamente à reação. Para isto, foram tomados 25 mL de homogenato do duodeno e jejuno, preparados da mesma forma como referido acima, e adicionados de 0,1 mL de uma solução de ácido perclórico frio (1,2N) contendo 2 mM de EDTA.

Todos os ensaios foram realizados com dois homogenatos de cada segmento intestinal e quatro análises de atividade para cada segmento.

Cálculos:

ε – absortividade molar específica da *p*-nitroanilina = $9900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (405 nm)

(Szasz, 1969)

A - absorbância

ΔA – absorbância diferencial

V - volume do reação (1,1 mL)

v – alíquota do homogenato (0,1 mL)

Δt – variação de tempo (min.)

d – caminho ótico

$$\text{Concentração da } p\text{-nitroanilina (C)} = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon \times d} \quad [\mu\text{moles/mL na cubeta}] \quad (1)$$

$$\frac{\text{Concentração da } p\text{-nitroanilina}}{\text{g intestino}} = \frac{C \times V \times 25^*}{v \times \text{g intestino}} \quad [\mu\text{moles/min./g intestino}] \quad (2)$$

* volume total do homogenato.

(1) Seguindo a fórmula para reações químicas conforme Bergmeyer *et al.*, 1974.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do extrato bruto parcialmente purificado por cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos

Inicialmente, apresentamos os resultados referentes à caracterização parcial do EB, utilizado em todos os ensaios biológicos subsequentes.

A **Figura 17 A** representa o cromatograma do EB parcialmente purificado, isto é do EB do qual foram removidos os carboidratos e que foi analisado por cromatografia de troca iônica em autoanalisador de aminoácidos.

A eluição do peptídeo γ -Glu-SMC ocorreu em 8,4 minutos, muito próximo ao tempo de eluição do ácido aspártico. Observamos também a presença de outros aminoácidos, tais como, serina, ácido glutâmico, alanina, cistina, valina, bem como a SMC livre. O perfil de eluição foi semelhante a um outro EB obtido anteriormente em nosso laboratório, indicando que o EB em estudo possui características semelhantes àquele (Giada *et al.*, 1998).

A quantificação do peptídeo γ -Glu-SMC foi feita após hidrólise ácida do mesmo, medindo-se a quantidade de SMC liberada por comparação com a área do padrão sintético de SMC. O cromatograma correspondente onde se observa o desaparecimento do peptídeo e o aumento da área da SMC livre pode ser observado na **Figura 17 B** (17,5 minutos).

O tempo de retenção da SMC coincide com o da prolina, confirmando dados da literatura. A leitura das absorbâncias do produto da

reação dos aminoácidos com ninhidrina é realizada pela somatória das absorbâncias 570+440nm. Portanto, a leitura teve que ser feita em 570nm apenas, visando excluir a interferência da prolina que absorve a luz em 440 nm.

Figura 17 – Cromatogramas obtidos pela análise do extrato bruto parcialmente purificado antes **(A)** e após hidrólise ácida contendo S-metilcisteína total **(B)** por cromatografia de troca iônica.

A quantificação da SMC total, isto é, aquela proveniente da hidrólise do peptídeo somada à SMC presente no EB na forma livre resultou em 9,5 mg/100 mg de EB liofilizado parcialmente purificado. Deste total, aproximadamente 24% correspondem ao aminoácido na forma livre.

A partir da concentração da SMC total subtraída da SMC livre, foi possível calcular a concentração do peptídeo, considerando o peso molecular igual a 264 Da (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Concentrações de S-metilcisteína (SMC) no extrato bruto (EB) parcialmente purificado não hidrolisado e após hidrólise ácida

<i>Amostra</i>	<i>μmoles/100mg EB</i>	<i>mg/100mg EB</i>	<i>%</i>
SMC Total (EB hidrolisado)	70,8	9,5	100
SMC livre (EB não hidrolisado)	17,0	2,3	24
SMC provinda do peptídeo	53,8	7,2	76

4.2 Análise do extrato bruto parcialmente purificado por cromatografia líquida de alta eficiência

O EB foi analisado também por HPLC em fase reversa, como uma metodologia alternativa à análise pelo autoanalisador de aminoácidos.

O cromatograma obtido é apresentado na **Figura 18A** e representa o EB antes da hidrólise ácida.

Pela falta de um padrão do peptídeo γ -Glu-SMC, comercialmente disponível, a quantificação poderia ser realizada de forma indireta, pela

análise da SMC total após a hidrólise, de maneira semelhante à determinação em autoanalisador de aminoácidos.

Na **Figura 18 B** apresentamos o cromatograma após hidrólise do peptídeo, e derivatização dos aminoácidos com OPA (Gustine, 1985)

Figura 18 – Cromatogramas obtidos pela análise do extrato bruto parcialmente purificado, por HPLC, antes (A) e após (B) hidrólise ácida.

A quantificação da SMC, por razões que passaremos a discutir mais adiante, ainda não foi possível por este método.

Entretanto, ressaltamos que, a princípio, a análise do peptídeo por HPLC representa um método analítico alternativo promissor, uma vez que o

tempo de análise é de apenas 10 minutos, enquanto uma análise por IEC leva em média 60 minutos.

4.3 Monitoramento da integridade morfológica da mucosa intestinal

Com a finalidade de observar a preservação da integridade morfológica das preparações intestinais a serem utilizadas nos ensaios de absorção intestinal *in vitro*, foram realizados estudos prévios, estabelecendo-se os procedimentos que pudessem manter as vilosidades intestinais intactas do ponto de vista estrutural.

Uma perda progressiva da integridade morfológica e uma concomitante perda da capacidade absorptiva da bordadura em escova do intestino, poderia ser causada pela interrupção da circulação sanguínea no animal. Esta suspensão teria como consequência um reduzido aporte de oxigênio aos tecidos após o isolamento do segmento intestinal e manipulação do mesmo, implicando nos ensaios de absorção em resultados de pouca ou nenhuma confiabilidade.

Estes testes foram realizados devido às observações feitas por Plumb et al., (1987) que constataram em seu trabalho que mucosas do jejuno de ratos recém-mortos, apresentavam edema intersticial severo nas vilosidades e criptas, quando incubadas mesmo por apenas 20 minutos a 37°C, demonstrando prejuízo na capacidade absorptiva de nutrientes. Ainda, de acordo com estes mesmos autores, os animais anestesiados com éter e mortos por atordoamento e deslocamento cervical (com a preparação imediata dos intestinos e seguido de perfusão por 20, 40 ou 60 minutos),

revelaram uma destruição dos vilos do jejuno nos primeiros 20 minutos da perfusão, e após 1 h foi observado um prejuízo crítico e extensivo na mucosa. Aparentemente, o sucesso do ensaio *in vitro* depende do fornecimento ininterrupto de oxigênio antes e durante o estabelecimento do sistema de perfusão. Desta forma, o tempo decorrido entre a parada circulatória e o início da incubação dos segmentos intestinais na solução nutritiva com oxigenação adequada, é fundamental para garantir a funcionalidade da superfície absorviva. Da mesma forma, Levine *et al.* (1970) observaram uma perda progressiva da integridade estrutural devido a mudanças na morfologia, isto é, aparecimento de edema crescente nos vilos e danos em algumas estruturas da submucosa, a partir de 5 minutos de incubação dos segmentos intestinais evertidos. Aos 30 minutos, estes mesmos pesquisadores verificaram que 50-70% do epitélio normal havia desaparecido e decorrido 1 h, rompimento total da borda epitelial.

A preocupação com relação à capacidade absorviva da mucosa, nos motivou a monitorar a integridade dos segmentos intestinais e estabelecer um protocolo de trabalho para os ensaios de absorção *in vitro*.

Efeito do anestésico

Os resultados evidenciaram não haver alteração na morfologia das microvilosidades intestinais utilizando como anestésico para os animais, o pentobarbital sódico ou o éter etílico, podendo ser utilizados indiferentemente. Decidimos pelo uso da anestesia por injeção intraperitoneal

de pentobarbital, devido à maior segurança no uso deste anestésico em relação ao éter etílico. Contudo, observamos em todos os cortes histológicos um leve achatamento nos vilos dos intestinos incubados, provavelmente causado pela inversão do segmento intestinal, ou pela pressão exercida pelo líquido circulante durante a incubação (**Fotomicrografias 1 - 4**).

Fotomicrografia 1 - Corte histológico de intestino delgado de rato anestesiado com éter etílico, evidenciando ápices das vilosidades revestidos por epitélio cilíndrico preservado, entremeado por células caliciformes. Nota-se na submucosa um infiltrado moderado de células mononucleares. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 140x.

Fotomicrografia 2 - Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando o epitélio das microvilosidades bem preservado e o infiltrado de mononucleares com vasos linfáticos dilatados na submucosa. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 340x.

Fotomicrografia 3 – Corte histológico de intestino delgado de rato anestesiado com pentobarbital de sódio e incubado por 40 minutos, mostrando vilosidades e criptas com arquitetura preservada, células de revestimento dentro dos padrões de normalidade. O tecido conjuntivo vascularizado da submucosa também se apresenta sem alterações. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 140x.

Fotomicrografia 4 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando as células do epitélio bem preservadas, bem como os elementos da submucosa. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 340x.

Efeito da parada circulatória

Os segmentos intestinais removidos e analisados imediatamente após a parada circulatória dos animais não mostraram alterações nas vilosidades, criptas e camada muscular (**Fotomicrografias 5 e 6**). Todavia, a incubação desses segmentos por 40 minutos evidenciou que a remoção do intestino, depois de passados 10 minutos à parada circulatória, provoca a destruição do ápice das vilosidades, confirmando as observações feitas por Plumb *et al.* (1987) de que o tempo decorrido após a morte do animal até a montagem do intestino para a incubação é de importância primordial para a integridade estrutural do segmento intestinal (**Fotomicrografias 7 e 8**).

Fotomicrografia 5 - Corte histológico de intestino delgado de rato sacrificado (controle), mostrando vilosidades, criptas e camada muscular bem preservadas. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 140x.

Fotomicrografia 6 - Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando o ápice das vilosidades, bem como as criptas e as camadas muscular e serosa bem preservadas. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 340x.

Fotomicrografia 7 - Corte histológico de intestino delgado de rato sacrificado (incubado), mostrando destruição do ápice das vilosidades. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 140x.

Fotomicrografia 8 - Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando autólise do ápice das vilosidades. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 340x.

Os resultados obtidos nestes ensaios evidenciaram não haver alteração morfológica no epitélio das microvilosidades quando os segmentos intestinais são evertidos, montados em sistema adequado de oxigenação e incubados por até 40 minutos em solução nutritiva. Todavia, vale salientar, que o tempo decorrido entre a remoção do segmento intestinal e a incubação do mesmo em sistema com oxigenação adequada é fundamental para a preservação da morfologia, não devendo ultrapassar em hipótese nenhuma, 10 minutos. Tempos superiores a 10 minutos para a preparação (remoção, lavagem, inversão e montagem do sistema de incubação) causaram a destruição do ápice das vilosidades supondo-se prováveis danos à capacidade absorptiva.

A partir desses resultados estabelecemos o seguinte protocolo para o estudo da absorção de aminoácidos:

- Anestesia dos animais com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico

- Remoção do segmento intestinal, lavagem com solução gelada de Ringer e montagem no sistema de incubação no menor prazo de tempo possível, no máximo em 10 minutos.

4.4 Absorção intestinal de aminoácidos em estudo “in vitro”

Foi objetivo deste ensaio verificar a absorção intestinal da SMC utilizando sistema **in vitro** com segmentos intestinais evertidos, uma vez que

não foram encontrados dados na literatura que indicassem a velocidade de absorção deste aminoácido.

Esse estudo relativo à velocidade de absorção da SMC assume importância uma vez que o peptídeo γ -Glu-SMC parece ser hidrolisado no trato gastrointestinal aparecendo no sangue periférico na forma de SMC livre (Padovese *et al.*, 2001). A diferença no tempo de assimilação entre o peptídeo e a SMC deverá corresponder, seguindo um raciocínio, à etapa de hidrólise do peptídeo. Dentre os diversos modelos apresentados na literatura para o estudo da absorção de nutrientes, o modelo descrito por Karasov e Diamond (1983) utilizando segmentos intestinais evertidos, foi adotado por nós.

Inicialmente, foram analisados os três aminoácidos isoladamente: SMC, Met e Phe em concentrações equimolares. Acompanhou-se a taxa de absorção de cada um dos aminoácidos em intervalos de 10 minutos até atingir um total de 60 minutos. Os resultados das taxas de absorção estão apresentados na **Figura 19** e representam a média de 15 ensaios para cada aminoácido.

Verificamos pelos resultados que dentre os aminoácidos estudados, a SMC foi absorvida mais rapidamente em relação a Met e Phe. A SMC atingiu após 60 minutos de incubação uma concentração média de 252,3 μ moles/g de intestino seco, enquanto a Phe atingiu 125,7 μ moles/g de intestino seco e a Met, apenas 65,4 μ moles/g de intestino seco.

Figura 19 – Velocidade de absorção de aminoácidos [Metionina (Met), fenilalanina (Phe) e S-metilcisteína (SMC)], analisados isoladamente, em sistema *in vitro*, empregando segmentos intestinais evertidos de rato. Média de 15 ensaios.

Procuramos uma explicação para a grande diferença nas velocidades de absorção entre a SMC e Met, baseando-nos nos sistemas de transporte descritos para os diversos aminoácidos, segundo Ganapathy *et al.* (1994) e Johnson (1997) (**Tabelas 2 e 3** respectivamente).

A análise destas tabelas sugere que os aminoácidos em questão poderiam ser transportados através da membrana da borda em escova do intestino pelos sistemas B, B⁰⁺ ou mesmo b⁰⁺ responsáveis pelo transporte de aminoácidos dipolares neutros pela membrana borda em escova do intestino. Já, na travessia da membrana basolateral este transporte seria efetuado pelo sistema L para a Phe e pelo sistema A para a SMC e Met. A semelhança estrutural entre a Met e a SMC que pressupõe a princípio, a utilização de um mesmo sistema de transporte não permite inferir que as diferentes taxas de absorção observadas estejam relacionadas com os

mecanismos de transporte. De qualquer forma, parece não haver limitação na absorção da SMC livre para a circulação sanguínea.

Tabela 2 – Classificação de sistemas de transporte nas membranas borda em escova e basolateral do intestino delgado, de acordo com a dependência ou não de Na^+ e envolvimento de outros íons.

Sistema de transporte	Substratos	Dependência de um gradiente de Na^+	Envolvimento de outros íons
Membrana borda em escova			
B	α -Aminoácidos dipolares	Sim	Nenhum
B^{0+}	α -Aminoácidos dipolares Aminoácidos básicos Cistina	Sim	Nenhum
b^{0+}	α -Aminoácidos dipolares Aminoácidos básicos Cistina	Não	Nenhum
y^+	Aminoácidos básicos	Não	Nenhum
IMINO	Iminoácidos	Sim	Cl^-
β	β -Aminoácidos dipolares Aminoácidos não protéicos (taurina)	Sim	Cl^-
X_{AG}^-	Aminoácidos ácidos	Sim	K^+
Membrana basolateral			
A	α -aminoácidos dipolares Iminoácidos	Sim	nd*
ASC	3 e 4 carbonos de aminoácidos dipolares	Sim	nd
Asc	3 e 4 carbonos de aminoácidos dipolares	Não	nd
L	Aminoácidos dipolares, hidrofóbicos e volumosos	Não	nd
y^+	Aminoácidos básicos	Não	nd

Adaptado de Ganapathy *et al*, 1994.

*nd – não determinado

Tabela 3 - Sistemas de transporte de aminoácidos nas membranas borda em escova e basolateral em intestino delgado

Sistema de transporte		Substratos	Gradiente dependente de Na⁺
Membrana	borda em		
escova			
Neutro		Todos *AA aromáticos e alifáticos neutros	Sim
PHE		Fenilalanina e metionina	Sim
Ácido		Glutamato e aspartato	Sim
Imino		Prolina, hidroxiprolina	Sim
y ⁺		AA básicos	Não
L		AA neutros c/ cadeias laterais hidrofóbicas	Não
Membrana basolateral			
A		AA neutros pequenos	Sim
ASC		AA neutros c/ 3 e 4 carbonos	Sim
L		AA neutros c/ cadeias laterais hidrofóbicas	Não
y ⁺		AA básicos	Não

Adaptado de Johnson, 1997.

*AA - aminoácidos

4.5 Absorção intestinal do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína

A absorção do peptídeo γ -Glu-SMC, nos ensaios *in vitro*, resultou no aparecimento de SMC no lado seroso do segmento intestinal, confirmando a princípio os resultados obtidos por Padovese *et al.* (2001).

Segundo Padovese *et al.* (2001), foi observado que na circulação periférica surgia apenas a SMC livre, indicando ter havido hidrólise do peptídeo. As enzimas responsáveis seriam provavelmente aquelas ligadas à bordadura em escova ou presentes no interior do enterócito. Entretanto, não se podia, naquele momento, excluir a possibilidade do peptídeo ter sido absorvido intacto e ter sido hidrolisado por enzimas hepáticas.

Pelo fato do ensaio atual ter sido realizado com segmentos intestinais isolados, excluimos a possibilidade da hidrólise do peptídeo pela ação de enzimas hepáticas. A atividade enzimática ocorre supostamente na bordadura em escova ou no citosol do enterócito, uma vez que o segmento intestinal utilizado para o ensaio, foi lavado previamente com solução de Ringer.

Na **Figura 20**, apresentamos um aminograma, obtido por cromatografia de troca iônica, de uma amostra do material coletado do lado seroso do segmento intestinal após por 60 minutos de absorção. Como esperado, foi observado o aparecimento de SMC, eluída em, aproximadamente, 18,7 minutos, sendo este tempo, similar ao do padrão SMC.

Figura 20 – Aminograma do material coletado do lado seroso dos segmentos intestinais evertidos, evidenciando a absorção de S-metilcisteína proveniente do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína, após incubação por 60 minutos.

A taxa de absorção do peptídeo γ -Glu-SMC foi avaliada por meio de 14 ensaios, medindo-se a concentração de SMC a cada 10 minutos. Estes resultados estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Absorção da S-metilcisteína (SMC) proveniente do peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína realizada com segmentos intestinais evertidos de rato*

t incubação		0'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
Ensaio								
1		0,0	0,0	0,7	2,1	4,4	8,2	10,5
2		0,0	0,4	4,0	4,9	7,8	8,7	8,4
3		0,0	0,8	2,1	4,1	14,2	8,0	10,7
4		0,0	nd	3,1	nd	nd	16,8	nd
5		0,0	nd	0,9	5,9	7,8	7,1	7,7
6		0,0	1,0	5,3	5,9	11,1	7,2	14,5
7		0,0	0,6	1,7	5,5	7,6	10,1	10,7
8		0,0	2,2	3,7	7,1	8,5	11,1	14,8
9		0,0	0,0	2,3	1,0	4,6	12,4	17,6
10		0,0	1,8	3,1	6,0	6,6	10,7	15,6
11		0,0	nd	2,7	8,9	12,6	18,8	30,7
12		nd	nd	nd	1,0	2,1	10,4	12,0
13		0,0	nd	nd	2,3	30,4	37,3	38,9
14		0,0	0,0	0,0	0,8	0,8	14,5	4,7
Médias		0,0	0,8	2,5	4,3	9,1	13,0	15,1
d.p.		0,0	0,8	1,5	2,6	7,5	7,8	9,5

‡ Resultados expressos em μ moles de SMC/g de intestino seco.

* médias $\pm$ d.p.

n.d. – não determinado.

As taxas de absorção atingiram ao final de 60 minutos, valores reduzidos, embora variáveis, entre 7,7 e 38,9 μ moles de SMC/g de intestino (base seca). Nos ensaios 11 e 13, observamos uma concentração desproporcionalmente elevada da SMC após 40 minutos de absorção, o que eventualmente pode estar relacionado ao fato de termos utilizado segmentos intestinais, correspondentes ao duodeno, na maioria das vezes, e

ocasionalmente, partes do jejuno. Dessa forma, a atividade enzimática e os locais de absorção, correspondentes a cada segmento intestinal, deverão ser confirmados. Considerando o maior valor (38,9 μ moles de SMC/g de intestino seco) este representa 59,5% e 30,9% quando comparado aos valores de absorção dos aminoácidos sintéticos Phe e Met, respectivamente. A taxa de absorção de SMC proveniente do peptídeo foi muito reduzida se comparada com a da SMC sintética, atingindo apenas 15,4% (**Figura 21**).

Supondo que exista um sistema enzimático eficiente para hidrolisar o peptídeo, poderíamos esperar uma taxa de absorção da SMC proveniente do peptídeo, semelhante aos valores obtidos para a SMC sintética, embora pudesse haver um certo retardo no aparecimento da SMC do peptídeo do lado seroso do intestino, causado pelo processo de hidrólise.

Figura 21 – Comparação da velocidade de absorção de S-metilcisteína (SMC) proveniente do extrato bruto com aminoácidos sintéticos [Metionina (Met), fenilalanina (Phe) e S-metilcisteína] em sistema *in vitro*, empregando segmentos intestinais evertidos de rato.

Em 27 aminogramas de um total de 87 aminogramas das alíquotas retiradas do conteúdo intestinal contido no lado seroso, correspondentes aos 14 ensaios x 6 tempos de absorção, foi observada a presença de pequenas quantidades do peptídeo intacto, na maioria das vezes em quantidades não quantificáveis. O tempo de retenção desse peptídeo, nas condições analíticas empregadas, foi de aproximadamente 8,3 minutos, conforme mostra o aminograma da **Figura 22**.

Figura 22 – Aminograma do material coletado do lado seroso dos segmentos intestinais evertidos após incubação com o peptídeo γ -glutamil-S-metilcisteína, por 60 minutos, com o aparecimento do peptídeo na forma intacta.

A quantidade de peptídeo intacto encontrado no lado seroso foi desprezível em relação à SMC. Acreditamos na possibilidade, de que nesse caso, a absorção do peptídeo tenha ocorrido por transporte passivo

paracelular através das assim chamadas junções de oclusão (**tight junctions**) entre os enterócitos (Balimane, *et al.*, 2000).

Paralelamente levantamos algumas hipóteses que pudessem explicar a reduzida absorção da SMC a partir da hidrólise do peptídeo.

- 1) A enzima γ -GT perdeu atividade durante a incubação.
- 2) O peptídeo não foi hidrolisado, por não ser substrato para a enzima γ -GT.
- 3) Por tratar-se de um teste **in vitro** a ausência de um acceptor para o γ -Glu, poderia ter influenciado na reação de transpeptização do peptídeo.
- 4) Apenas a SMC livre, que estava contaminando o EB, foi absorvida.

4.6 Atividade da γ -glutamyltranspeptidase no duodeno e jejuno de rato, antes e após incubação em solução nutritiva

A literatura reporta a presença da enzima γ -GT nas células apicais da bordadura em escova tanto dos intestinos, como nos túbulos proximais dos rins (Marathe, 1979), o que permitiria a hidrólise do peptídeo, considerando ser este também um substrato para esta enzima.

Com a finalidade de esclarecer a primeira hipótese levantada relativa à manutenção da atividade da enzima γ -GT durante a manipulação e incubação dos segmentos intestinais dos ratos, realizamos um ensaio para verificar a sua atividade nos segmentos intestinais de ratos. Pelo fato de tratar-se de uma transpeptidase foi empregada a γ -glutamyl-*p*-nitroanilida como um substrato sintético e a glicilglicina como acceptor para o ácido glutâmico. (Oliveira & Fujimori, 1996; Szasz, 1974).

A atividade da enzima γ -GT presente nos homogenatos do duodeno e do jejuno, antes e após incubação por 45 minutos é apresentada na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Atividade da enzima γ -glutamiltanspeptidase em homogenatos de intestinos de rato

	<i>Atividade enzimática U*</i>
Duodeno s/ incubação	2,27 $\pm$ 0,40
Duodeno (45 minutos incubação)	3,27 $\pm$ 0,40
Jejuno s/ incubação	0,80 $\pm$ 0,08
Jejuno (45 minutos incubação)	1,18 $\pm$ 0,22

* U = μ moles de *p*-nitroanilina liberados/minutos/g de intestino (16 ensaios).

Foi observado que a enzima γ -GT se manteve ativa mesmo após incubação dos homogenatos por 45 minutos em solução nutritiva, levando-nos a eliminar a hipótese de que o peptídeo não fora hidrolisado por falta da enzima específica ou por perda de atividade desta enzima nas condições do ensaio. Os resultados ainda podem indicar que a incubação na solução de Ringer serviu para ativar a enzima.

Em 1974, Szasz reportou a atividade da enzima γ -GT em diversos tecidos animais. Em ratos, o autor encontrou 1,2 U/g de peso fresco no cólon e 0,13 U/g de peso fresco no fígado. Já no cólon e fígado de sagüis, 5,5 e 1,3 U/g de peso fresco. Para cães, os valores encontrados foram de 0,15, 1,5 e 0,9 U/g de peso fresco na musculatura e mucosa intestinais e fígado, respectivamente. Assim, nos ensaios por nós realizados, encontramos valores na mesma ordem de grandeza aos relatados pelo autor, que podem levar a conclusão de que a enzima γ -GT encontra-se ativa no intestino.

No entanto, gostaríamos de salientar que a maior atividade desta enzima está concentrada, na superfície de várias células epiteliais, especialmente na membrana bordadura em escova do rim (Matsuda *et al.*, 1983).

Estudos com a membrana da borda em escova renal e jejunal demonstraram que a enzima se localiza no ápice dessas vilosidades catalisando o primeiro passo no metabolismo da glutatona (Marathe *et al.*, 1979).

Além do mais, verificamos uma diferença considerável na atividade entre os dois segmentos de intestinos testados, concentrando-se a atividade no duodeno. Não foi encontrado nenhum outro trabalho que mencionasse o estudo comparativo da atividade enzimática da γ -GT entre cada porção do intestino delgado (duodeno e jejuno).

4.7 Análise de S-metilcisteína livre por cromatografia líquida de alta eficiência

Uma vez que foi verificada a atividade da enzima γ -GT nos segmentos intestinais de ratos, objetivamos confirmar a ação sobre o peptídeo γ -Glu-SMC, já que não existem dados conclusivos na literatura a este respeito. Apenas é mencionada a sua atividade em relação a GSH na sua forma reduzida ou oxidada e alguns outros análogos e derivados da GSH contendo uma ligação γ (Tate & Meister, 1974, Garvey *et al.*, 1976, Hughey & Curthoys, 1976, Vincenzini *et al.*, 1992, Carter *et al.*, 1997).

Idealizamos um modelo **in vitro** utilizando homogenatos do duodeno, seguindo o mesmo procedimento realizado para a verificação de atividade da γ -GT em intestinos de ratos. Porém, substituindo o substrato sintético de p-nitroanilida pelo peptídeo γ -Glu-SMC, contido no EB parcialmente purificado, na presença de glicilglicina como acceptor do grupo γ -Glu. O produto da reação, a SMC livre, seria então quantificado por HPLC em fase reversa por derivatização pré-coluna.

Contudo, as inúmeras tentativas para se estabelecer uma curva padrão e de se determinar os limites de detecção e de quantificação por esta metodologia, não foram bem sucedidas.

A injeção da SMC sintética na sua forma de isoindol, conforme o procedimento descrito por Gustine (1985), resultou consistentemente em perda de eficiência da coluna cromatográfica. Havia alargamento do pico, formação de cauda, aparecimento de ombros e as áreas abaixo das curvas não mantinham coerência com a concentração do padrão e nem reprodutibilidade.

Nas **Figuras 23 e 24**, podemos observar a redução gradual de eficiência da coluna, à medida que as amostras foram injetadas. Havia decréscimo da área, formação de ombro, e posteriormente, a não separação propriamente dita, resultando assim numa perda de eficiência da coluna. Estes resultados foram obtidos utilizando-se uma concentração de tampão fosfato 50 mM.

Figura 23 – Cromatograma de isoindol de S-metilcisteína (15 μ moles/100 mL H_2O) por HPLC. Coluna LC 18, fase móvel: tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0):acetonitrila (v/v 60:40), fluxo isocrático, 1mL/minuto. Verifica-se a interferência de uma substância junto ao isoindol de S-metilcisteína.

Figura 24. – Cromatograma de isoindol de S-metilcisteína (15 μ moles/100 mL H_2O) por HPLC. Coluna LC 18, fase móvel: tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0):acetonitrila (v/v 60:40), fluxo isocrático, 1mL/minuto.

Sendo assim, algumas modificações foram introduzidas. Suspeitando que certos subprodutos da reação com o agente derivatizante ou produtos de degradação do mesmo pudessem ter formado cristais no frasco de reação, filtrou-se as amostras, após a derivatização, por membrana de 0,22 μ m (Millipore, JBR 610268). Todavia, o problema se

repetiu e, a coluna nova que havia sido adquirida perdeu a sua eficiência rapidamente (**Figura 25**).

Figura 25 – Cromatogramas de isoindol de S-metilcisteína (15 μ moles/100 mL H₂O) por HPLC em coluna C-18 (A) e a redução do tamanho do pico e da área do eluato após perda de eficiência da coluna cromatográfica (B). Fases móveis: tampão fosfato de potássio 20mM (pH 7,0) [Solvente A] e acetonitrila 40% em solvente A [Solvente B]. Gradiente: 50:95 (% solvente B) em 15 minutos, fluxo 1 mL/ minuto.

Procurou-se recuperar a coluna pela lavagem da mesma, seguindo os procedimentos sugeridos pelo fabricante, tanto para a remoção de

substâncias solúveis em água, quanto para as insolúveis, alternando-se a polaridade de diversos solventes orgânicos.

O processo de recuperação é demorado, gastando-se em torno de 6 a 8 horas. Em cada tentativa, o teste de eficiência da coluna foi feito por comparação com uma coluna nova, de mesma marca e tamanho, injetando-se 10 μ l de naftaleno numa concentração de 50 μ g/mL de metanol, em fluxo isocrático de 1 mL/minuto, utilizando metanol 100% como fase móvel. Após as injeções para cada coluna foi feita uma sobreposição dos picos resultantes que revelou ter havido uma perda de 50% na eficiência da coluna, o que impossibilitou a continuidade das análises (**Figura 26**). Acreditamos que essa explicação para os problemas surgidos esteja relacionada ao excesso de reagente utilizado para derivatização resultando em forte adsorção do mesmo na coluna cromatográfica.

Figura 26 – Cromatograma de isoindol de S-metilcisteína, evidenciando 50% de perda de eficiência da coluna, redução da área e formação de cauda. Fases móveis: tampão fosfato de potássio 20mM (pH 7,0) [Solvente A] e acetonitrila 40% em solvente A [Solvente B]. Gradiente: 50:95 (% solvente B) em 15 minutos, fluxo 1 mL/ minuto.

Apresentamos como sugestão para continuidade do trabalho a adoção de um protocolo de análise, descrito por Teerlink *et al* (1994). A grande diferença com o método, por nós utilizado, consiste na redução da concentração do reagente OPA. Para uma mesma quantidade de amostra (10 μ L) acrescenta-se 1,96 mg de OPA em solução, conforme a metodologia descrita por Gustine (1985), enquanto pelo método de Teerlink *et al.* se acrescenta apenas 0,02 mg de OPA em solução, seguido de uma solução tampão neutralizadora. Portanto, a diferença na concentração do agente derivatizante é de aproximadamente 100 vezes.

6 Conclusões

- 1- Estudos de absorção intestinal da SMC em ensaio *in vitro*, utilizando segmentos intestinais evertidos de ratos, revelaram que este aminoácido é rapidamente absorvido, atingindo taxas de absorção mais elevadas do que a Met e a Phe, no mesmo período de tempo, quando incubados isoladamente.
- 2- O peptídeo γ -Glu-SMC quando submetido ao ensaio de absorção intestinal resultou no aparecimento de pequena quantidade de SMC livre no lado seroso da mucosa intestinal, indicando ter havido ação de enzimas ligadas à bordadura em escova ou presentes no interior do enterócito. Supõe-se que a enzima envolvida com a hidrólise do peptídeo γ -Glu-SMC seja a γ -GT.
- 3- Em 31% dos aminogramas referentes aos ensaios de absorção intestinal do peptídeo γ -Glu-SMC, foi observada a presença de pequenas concentrações, não quantificáveis, do peptídeo intacto, o que sugere que este poderia ter sido transportado por via paracelular.
- 4- A reduzida quantidade de SMC livre encontrada no lado seroso da mucosa intestinal, após incubação com o peptídeo, poderia ser atribuída à uma eventual perda de atividade da enzima γ -GT durante o preparo e manuseio do segmento intestinal. Contudo, em ensaios

adicionais, não foi observada perda de atividade desta enzima durante a incubação dos segmentos intestinais em solução nutritiva.

- 5- A atividade da enzima γ -GT foi aproximadamente três vezes superior no duodeno do que no jejuno, fato que não havia sido descrito ainda na literatura, sendo de relevância em estudos de absorção intestinal.
- 6- O procedimento de derivatização de aminoácidos, descrito por Gustine (1985), para a análise de SMC livre por HPLC, causou rápida perda de eficiência da coluna cromatográfica. Provavelmente, isto ocorreu devido à forte adsorção do agente derivatizante (OPA) ou de produtos intermediários da reação. Possivelmente, outros protocolos de análise empregando quantidades menores do reagente derivatizante, não resultem na perda de eficiência da coluna.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRED, K.F., JUNG, N., GARROW, T.A., HELFERICH, W.G. Effects of S-methylcysteine on growth of estrogen-independent human breast carcinoma (MDA-MB-231) cells in athymic mice. **FASEB J.**, Bethesda, v.13, n.4 (suppl.), p.A585, part 1, 1999.

ANKRI, S., MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes Infect.**, Paris, v.1, n.2, p.125-129, 1999.

AQUEL, M.B., GHARAIBAH, M.N., SALHAB, A.S. Direct relaxant effects of garlic juice on smooth and cardiac muscle. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.33, p.13-19, 1991.

BAILEY, E., CONNORS, T.A., FARMER, P.B., GORF, S.M., RICKARD, J. Methylation of cysteine in hemoglobin following exposure to methylating agents. **Cancer Res.**, Birmingham, v.41, n.6, p.2514-2517, 1981.

BAKER, I., SHUKER, D.E.G., TANNENBAUM, S. A method for the determination of S-methylcysteine by high-performance liquid-chromatography: application to the study of carcinogenic methylating agents. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.329, n.1, p.202-205, 1985.

X BALIMANE, P.V., CHONG, S.H., MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharm. Toxicol. Methods**, New York, v.44, n.1, p.301-312, 2000.

BARROS, R.M.C., MANJUMDER, I., FONSECA JUNIOR, N.S., LANFER MARQUEZ, U.M. Gamma-glutamil peptídeos sulfurados em sementes de leguminosas comestíveis. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6, Salvador, 1999. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA, 1999. v.1, p.877-880.

BARTHE, L., WOODLEY, J., HOUIN, G. - Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. **Fundam. Clin. Pharm.**, v.13, n.2, p.154-168, 1999.

BENEVENGA, N.J. Toxicities of methionine and other amino acids. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.22, p.2-9, 1974.

BENEVENGA, N.J., EGAN, A.R. In: **SULFUR amino acids**: biochemical and clinical aspects. New York: Alan R. Liss, 1983. p.327.

De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2001[Cd-rom].

- BENEVENGA, N.J., STEELE, R.D. Adverse-effects of excessive consumption of amino-acids. **Ann. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.4, p.157-181, 1984.
- BENEVENGA, N.J., YEH, M.H., LALICH, J.J. Growth depression and tissue reaction to the consumption of excess dietary methionine and S-methyl-L-cysteine. **J. Nutr.**, Bethesda, v.106, p.1714-1720, 1976.
- BERGMEYER, H.U., BERNT, E., GRASSI, M., MICHAL, G. Evaluation of experimental results. In: BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag Chemie Weinheim: Academic Press, 1974. p.309-317.
- BLOM, H.J., BOERS, G.H.J., VANDENELZEN, J.P.A.M., GAHL, W.A., TANGERMAN, A. Transamination of methionine in humans. **Clin. Sci.**, Colchester, v.76, n.1, p.43-49, 1989.
- BLOM, H.J., CHAMULEAU, R.A.F.M., ROTHUIZEN, J., DEUTZ, N.E.P., TANGERMAN, A. Methanethiol metabolism and its role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in rats and dogs. **Hepatology**, Baltimore, v.11, n.4, p.682-689, 1990.
- BLOM, H.J., TANGERMAN, A. Methanethiol metabolism in whole blood. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.111, p.606-610, 1988.
- BLOM, H.J., VANDENELZEN, J.P.A.M., YAP, S.H., TANGERMAN, A. Methanethiol and dimethylsulfide formation 3-methyltiopropionate in human and rat hepatocytes. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.972, n.2, p.131-136, 1988.
- BUSTO, O., MIRACLE, M., GUASCH, J., BORRULL, F. Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v.757, p.311-318, 1997.
- CARRIERE, V., DUSSAULX, E., ROUSSET, M., ZWEIBAUM, A., CAMBIER, D. Decreased expression of gamma-glutamyltranspeptidase in the intestinal cell line Caco-2 by inducers of cytochrome P450 1A1. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.56, n.7, p.817-823, 1998.
- CARTER, B.Z., WISEMAN, A.L., ORKISZEWSKI, R., BALLARD, K.D., OU, C.N., LIEBERMAN, M.W. Metabolism of leukotriene C₄ in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. **J. Biol. Chem.**, Waltham, v.272, n.19, p.12305-12310, 1997.
- CASE, G.L., BENEVENGA, N.J. Evidence for a S-adenosylmethionine independent catabolism of methionine in the rat. **J. Nutr.**, Bethesda, v.106, n.12, p.1721-1736, 1976.

- CHAIT, B.T., AGOSTA, W.C., FIELD, F.H. Fission fragment ionization (^{252}Cf) mass spectrometry: positive and negative spectra and decomposition for seven compounds. **Int. J. Mass. Spectrom.**, Amsterdam, v.39, p.339-366, 1981.
- CHIN, H.W., LINDSAY, R.C. - Mechanisms of formation of volatile sulfur-compounds following the action of cysteine sulfoxide lyases. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, n.7, p.1529-1536, 1994.
- COHEN, S.A., MICHAUD, D.P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6 aminoquinolyl-N-hidroxisuccinimidyl carbamate and its application for the analysis of hidrolisate amino acids via high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.211, p.279-287, 1993.
- COHEN, S.A., STRYDOM, D.J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.174, p.1-16, 1988.
- CONN, H.O., LIEBERTHAL, M.M. Methionine and mercaptans. In: **HEPATIC coma syndromes and lactulose**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1979. p.86.
- COOPER, A.J.L. Biochemistry of sulfur-containing amino-acids. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.52, p.187-222, 1983.
- CORNELL, J.S., MEISTER, A. Glutathione and gamma-glutamyl cycle enzymes in crypt and villus tip cells of rat jejunal mucosa. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.73, n.2, p.420-422, 1976.
- CRANE, R.K., WILSON, T.H. In vitro method for the study of the rate of intestine absorption of sugars. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v.12, n.1, p.145-146, 1958.
- CHRISTENSEN, H.N., RIGGS, T.R., FISCHER, H., PALATINE, I.M. Amino acid concentration by a free cell neoplasm: relations among amino acids. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.198, n.1, p.1-15, 1952.
- CRONIN, J.R., PIZZARELLO, S., GANDY, W.E. Amino acid analysis with o-phthaladehyde detection: effects of reaction temperature and thiol on fluorescence yields. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.93, p.174-179, 1979.
- CUNICO, R., MAYER, A.G., WEB, C.T., SHEEHAN, T.L. BioChromatography, v.1, p.1-22, 1986. Apud: COHEN, S.A., STRYDOM, D.J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.174, p.1-16, 1988.

- CURTHOYS, N.P., SHAPIRO, R. Gamma-glutamyltranspeptidase in intestinal brush-border membranes. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.58. n.1, p.230-233, 1975.
- DARVEY, J. P., ERSSER, R. S. - Amino acid analysis of physiological fluids by high-performance liquid chromatography with phenylisothiocyanate derivatization and comparison with ion-exchange chromatography, **J. Chromatogr.**, London, v. 528, p. 9-23, 1990.
- D'MELLO, J.P.F. Toxic amino acids. In: D'MELLO, J.P.F., DUFFUS, C.M., DUFFUS, H. **Toxic substances in crop plants**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992. p.22-48.
- DOIZAKI, W.M., ZIEVE L. Improved method for measuring blood mercaptans. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.90, p.849-855, 1977.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Columbus, v.28, p.350-356, 1956.
- EINARSSON, S., JOSEFSSON, B., LAGERKVIST, S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.282, p.609-618, 1983.
- ENGELHARDT, H. In: ENGELHARDT, H., ed. **Practice of high-performance chromatography**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 409p.
- ENGSTROM M.A., BENEVENGA N.J. Rates of oxidation of the methionine and S-adenosylmethionine methyl carbons in isolated rat hepatocytes. **J. Nutr.**, Bethesda, v.117, n.11, p.1820-1826, 1987.
- EVANS, R.J., BOULTER, D. S-methylcysteine content of various legumes meals. **Qual. Plant. Plant Foods. Hum. Nutr.**, Hague, v.24, p.257-261, 1975.
- EYRE, M.D., PHILLIPS, D.E., EVANS, I.M., THOMPSON, A. The nutritional role of S-methyl-L-cysteine. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.34, p.696-700, 1983.
- FINKELSTEIN, J.D. Methionine metabolism in mammals. **J. Nutr. Biochem.**, Bethesda, v.1, p.228-237, 1990.
- FINKELSTEIN, J.D., MARTIN, J.J. Methionine Metabolism in mammals - adaptation to methionine excess. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.261, n.4, p.1582-1587, 1986.

- FLEURY, M., ASHLEY, D. High performance liquid chromatographic analysis of amino acid in physiological fluids: on-line precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.133, p.330-335, 1983.
- FOGAÇA, A.C., SILVA, P.I., MIRANDA, T.M., BIANCHI, A.G., MIRANDA, A., RIBOLLA, P.E.M., DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.**, Waltham, v.274, p.25330-25334, 1999.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert consultation, protein quality evaluation, food and nutrition. Rome: FAO, WHO, 1991. paper 151.
- FOUNTOULAKIS, M., LAHM, H.W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.826, n.2, p.109-134, 1998.
- FOWDEN, L., PEA, P.J. Mechanism of plant avoidance of autotoxicity by secondary metabolites, especially by nonprotein amino acids. In: ROSENTHAL, G.A., JANZEN, D.H., eds. **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979. p.135-160.
- FRIEDMAN, M., GUMBMANN, M.R. The utilization and safety of isomeric sulfur-containing amino acids in mice. **J. Nutr.**, Bethesda, v.114, p.2301-2310, 1984.
- FUKUSHIMA, S., TAKADA, N., HORI, T., WANIBUCHI, H. S-methylcysteine and cysteine are inhibitors of induction of glutathione S-transferase placental form-positive foci during initiation and promotion phases of rat hepatocarcinogenesis. **Jpn. J. Cancer Res.**, Tokyo, v.88, n.5, p.435-442, 1997.
- GANAPATHY, V., BRANDSCH, M., LEIBACH, F.H. Intestinal transport of Aminoacids and peptides. In: JOHNSON, L.R., ed. **Physiology of gastrointestinal tract**. 3.ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 52, p.1773-1794.
- GANAPATHY, M., PRASAD, P.D., MACKENZIE, B. GANAPATHY, V. Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT 1 and PEPT 2, **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1324, p.296-308, 1997.
- GARVEY, T.Q., HYMAN, P.E., ISSELBACHER, J.J. γ -Glutamyltranspeptidase of rat intestine: localization and possible role in amino acid transport. **Gastroenterology**, Orlando, v.71, p.778-785, 1976.

- GIADA, M.L. Isolamento, caracterização e quantificação de peptídeos γ -glutamil sulfurados no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). São Paulo, 1995. 86p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- GIADA, M.L.R., MIRANDA, M.T.M., MARQUEZ, U.M.L. Sulphur γ -glutamyl peptides in mature seeds of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chem.**, Amsterdam, v.61, n.1/2, p.177-184, 1998.
- GIOVANELLI, J., MUDD, S.H., DATKO A.H. Sulfur amino acids in plants. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E., eds. **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1980. v.5, p.453-505.
- GOERGENS, H.W., HALLIER, E., MULLER, A., BOLT, H.M. Macromolecular adducts in the use of methyl-bromide as fumigant. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.72, p.199-203, 1994.
- GREENHALGH, J.F., SHARMAN, G.A.M., AITKEN, J.N. Kale anaemia. I. Toxicity to various species of animal of 3 types of kale. **Proc. Nutr. Soc.**, Wallingford, v.28, p.128-131, 1969.
- GRIFFITH, O.W. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.143, p.367-371, 1987.
- GRIFFITHS, D.W., MACFARLANESMITH, W.H., BOAG, B. The effect of cultivar, sample date and grazing on the concentration of S-methylcysteine sulfoxide in oilseed and forage rapes (brassica-napus). **J. Sci. Food Agric.**, Sussex, v.64, n.3, p.283-288, 1994.
- GRISHAM, M.B., McCORD, J.M. Cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: TAYLOR, A.E., MATALON, S., WARD, P.A., eds. **Physiology of oxygen radicals**. Bethesda: American Physiological Society, 1989. p.1-18.
- GUSTINE, D.L. Determination of S-Methyl Cysteine Sulfoxide in brassica extracts by high-performance liquid-chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 319, n.3, p.450-453, 1985.
- HEINECKE, J.W., KAWAMURA, M., SUZUKI, L., CHAIT, A. Oxidation of low-density-lipoprotein by thiols-superoxide-dependent and superoxide-independent mechanisms. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.34, n.12, p.2051-2061, 1993.
- HEINRIKSON, R.L., MEREDITH, S.C. Amino acid analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylisothiocianate. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.136, p.65-74, 1984.

- HEISTERKAMP, N., RAJPERTDEMEYTS, E., URIBE, L., FORMAN, H.J., GROFFEN, J. Identification of a human γ -glutamyl cleaving enzyme related to but distinct from γ -glutamyl transpeptidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.88, n.14, p.6303-6307, 1991.
- HIDALGO, I.J., JIBIN, L. – Carrier-mediated and efflux mechanisms in Caco-2 cells. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.22, p.53-66, 1996.
- HILL, D.W., WALTERS, F.H., WILSON, T.D., STUART, J.D. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. **Anal. Chem.**, Columbus, v.51, n.8, p.1338-1341, 1979.
- HOPFER, U., NELSON, K., PERROTTO, J., ISSELBAC, K.J. - Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small-intestine. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.248, p.25-32, 1973.
- HUGHEY, R.P., CURTHOYS, N.P. Comparison of size and physical properties of a γ -glutamyltranspeptidase purified from rat kidney following solubilization with papain or Triton X-100. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.251, p.7863-7870, 1976.
- HUNJAN, M.K., EVERED, D.F. Absorption of glutathione from the gastrointestinal tract. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.815, n.2, p.184-188, 1985.
- IP, C., GANTHER, H. E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. **Carcinogenesis**, Oxford, v.13, n.7, p.1167-1170, 1992.
- ISHIKAWA, T. The ATP-dependent glutathione s-conjugate export pump. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v.17, n.11, p.463-469, 1992.
- JACOB A., BUDHIRAJA, S., QIAN, X.B., CLEVIDENCE, D., COSTA, R.H., REICHEL, R.R. Retinoic acid-mediated activation of hnf-3- α during ec stem-cell differentiation. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.22, n.11, p.2126-2133, 1994.
- JOHNSON, L.R. **Gastrointestinal physiology**. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1997. 190p.
- JONES, S.M.A., YEAMAN, S.J. Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex. **Biochem. J.**, Essex, v.237, p.621-623, 1986.
- KARASOV, W.H., DIAMOND, J.M. A simple method for measuring intestinal solute uptake in vitro. **J. Comp. Physiol.**, Berlin, v.152, p.105-116, 1983.

- KASAI, T., LARSEN, P.O. Chemistry and biochemistry of γ -glutamyl derivatives from plants including mushrooms (*Basidiomycetes*). **Prog. Chem. Org. Nat. Prod. orschr.**, Wien, v.39, p.173-285, 1980.
- KASAI, T., SHIROSHITA, Y., SAKAMURA, S. γ -Glutamyl peptides of *Vigna radiata* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, p.679-682, 1986.
- KEITH, R.A., JARDINE, I., KERREMANS, A., WEINSHILBOUM, R.M. Human erythrocyte membrane thiol methyltransferase S-methylation of captopril, n-acetylcysteine and 7-thio-spirolactone. **Drug. Metab. Dispos.**, Bethesda, v.12, n.6, p.717-724, 1984.
- KILBERG, M.S., STEVENS, B.R., NOVAK, D.A. - Recent advances in mammalian amino-acid-transport. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.13, p.137-165, 1993.
- KOK, R.J., VISSER, J., MOOLENAAR, F., DEZEEUW, D., MEIJER, D.K.F. Bioanalysis of captopril: two sensitive high-performance liquid chromatographic methods with pre- or postcolumn fluorescent labeling. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.693, n.1, p.181-189, 1997.
- KREST, I., KEUSGEN, M. Stabilization and pharmaceutical use of alliinase. **Pharmazie**, Eschborn, v.54, n.4, p.289-293, 1999.
- KUBEC, R., DRHOVA, V., VELISEK, J. Thermal degradation of S-methylcysteine and its sulfoxide - important flavor precursors of brassica and allium vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, p.4334-4340, 1998.
- KUMARI, K., AUGUSTI, K.T. Antidiabetic effects of s-methylcysteine sulfoxide on alloxan diabetes. **Planta Med.**, Stuttgart, v.61, n.1, p.72-74, 1995.
- KUNO, T., MATSUDA, Y., KATUNUMA, N. The conversion of the precursor form of gamma-glutamyl-transpeptidase to its subunit form takes place in brush-border membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.114, n.2, p.889-895, 1983.
- KYUNG, K.H., FLEMING, H.P. S-methyl-L-cysteine sulfoxide as the precursor of methyl methanethiolsulfinate, the principal antibacterial compound in cabbage. **J. Food Sci.**, Chicago, v.59, n.2, p.350-355, 1994.
- LANCASTER, J.E., SHAW, M.L. Metabolism of gamma-glutamyl peptides during development, storage and sprouting of onion bulbs. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, n.9, p.2857-2859, 1991.
- LAU, S.M., BRANTLEY, R.K., THORPE, C. 4-thia-trans-2-alkenoyl-CoA derivatives: properties and enzymatic-reactions. **Biochemistry**, Columbus, v.28, n.20, p.8255-8262, 1989.

- LEIBACH, F.H., GANAPATHY, V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.16, p.99-119, 1996.
- LEVINE, R.R., MCNARY, W.F., KORNGUTH, P.J., LEBLANC, R. Histological reevaluation of everted gut technique for studying intestinal absorption. **EUR. J. PHARMACOL.**, Amsterdam, v.9, n.2, p.211-219, 1970.
- LIN, J.K., WANG, C.H. Determination of urinary amino acids by liquid chromatography with 'dabsyl chloride. **Clin. Chem.**, Washington, v.26, p.579-583, 1980.
- LINDROTH, P., MOPPER, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with O-phthalaldehyde. **Anal. Chem.**, Columbus, v.51, p.1667-1674, 1979.
- LIVESEY, G. Methionine degradation: anabolic and catabolic. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v.9, p.27-29, 1984.
- LU, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies, **FASEB J.**, Bethesda, v.13, p.1169-1183, 1999.
- MACCHIONE, E.L.A., KOIDE, K., HIRATA, J.H., SALEM-VASAND DIETZSCH, O. A time of flight spectrometer for analysis of biomolecules. In: WORKSHOP ADVANCED METHODS IN STRUCTURAL ANALYSIS OF BIOMOLECULES, São Carlos, 1994. **Proceedings**. São Carlos, 1994. p.19.
- MACFARLANE, R.D., TORGERSON, D.F. Californium-252 plasma desorption mass spectrometry. **Science**, Washington, v.191, p.920-925, 1974.
- MANT, C.T., HODGES, R.S. **High performance liquid chromatography of peptides and proteins**: separation, analysis and conformation. Boca Raton: CRC Press, 1991. 938 p.
- MANT, C.T., KONDEJEWSKI, L.H., CACHIA, P.J., MONERA, O.D., HODGES, R.S. Analysis of synthetic peptides by high-performance liquid chromatography. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.289, p.426-469, 1997.
- MARATHE, G.V., NASH, B., HASCHEMEYER, R.H., TATE S.S. Ultrastructural localization of gamma-glutamyl transpeptidase in rat-kidney and jejunum. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.107, n.2, p.436-440, 1979.

- MARKS, H.S., HILSON, J.A., LEICHTWEIS, H.C., STOEWSAND, G.S. S-methylcysteine Sulfoxide in Brassica Vegetables and formation of methyl methanethiosulfinate from brussels sprouts. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, p.2096-2101, 1992.
- MARTIN, M.N., SLOVIN, J.P. Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. **Plant Physiol.**, Rockville, v.122, n.4, p.1417-1426, 2000.
- MATSUDA Y., TSUJI A., KUNO T., KATUNUMA N. Biosynthesis and degradation of gamma-glutamyl-transpeptidase of rat kidney. **J. Biochem.**, Tokyo, v.94, n.3, p.755-765, 1983.
- MAW, G.A. Biochemistry of S-methyl-L-cysteine and its principal derivatives. **Sulfur. Rep.**, Jersey, v.2, p.1-32, 1982.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.263, n.33, p.17205-17208, 1988.
- MEISTER, A., TATE, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.45, p.559-604, 1976.
- MILNER, J.A. Garlic: its carcinogenic and antitumorigenic properties. **Nutr. Rev.**, Secaucus, v.54, n.11(pt.2), p.S82-S-86, 1996.
- MIRANDA, M.T., LIDDLE, R.A., REEVE JUNIOR, J.R., RIVIER, J. Synthesis of human CCK₂₆₋₃₃ and CCK₃₃ related analogues on 2,4-DMBHA and TMBHA. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.36, n.12, p.1681-1688, 1993.
- MÜLLER, A.M.F., HALLIER, E., WESTPHAL, G., SCHRÖDER, R., BOLT, H.M. Determination of methylated globin and albumin for biomonitoring of exposure to methylating agents using HPLC with precolumn fluorescent derivatization. **Frenesius' J. Anal. Chem.**, Berlin, v.350, p.712-715, 1994.
- MUNDAY, R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free radical species. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.7, p.659-673, 1989.
- MYRNES, B., NORSTRAND, K., GIERCKSKY, K.E., SJUNNESKOG, C., KROKAN, H. A simplified assay for O⁶-methyl guanine-DNA methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissues. **Carcinogenesis**, Oxford, v.5, n.8, p.1061-1064, 1984.

- NEGRO, A., GARBISA, S., GOTTE, L., SPINA, M. The use of reversed-phase high-performance liquid chromatography and pre-column derivatization with dansyl chloride for quantitation of specific amino acids in collagen and elastin, **Anal. Biochem.**, Orlando, v.160, p.39-46, 1987.
- NIGAM, S.N., TU, J.I., MCCONNEL, W.B. Distribution of Selenomethyl-selenocysteine and some other amino acids in species of *Astragalus*, with special reference to their distribution during growth of a *Bisulcatus*. **Phytochemistry**, Oxford, v.8, p.1161-1165, 1969.
- OI, Y., KAWADA, T., SHISHIDO, C., WADA, K., KOMINATO, Y., NISHIMURA, S., ARIGA, T., IWAI, K. Allyl-containing sulfides in garlic increase uncoupling protein content in brown adipose tissue, and noradrenaline and adrenaline secretion in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 129, n.2, p.336-342, 1999
- OLIVEIRA, M.V., FUJIMORI, E. Liver gamma-glutamyltranspeptidase activity and glutathione levels in lactating rats and pups: Effect of dietary protein quantity and feed intake. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.7, p.93-98, 1996.
- OZOLS, J. Amino acids analysis. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.182, p.587-601, 1990.
- PACE-ASCIAC, C.R., LANEUVILLE, O., GUREVICH, N., WU, P., CARLEN, P.L., SU, W.G., COREY, E.J., REDDY, C.C. Novel hepoxilin glutathione conjugates with biological activity. In: REDDY, C.C., HAMILTON, G.A., KDYASTHA, K.M. **Biological oxidation systems**. New York: Academic Press, 1990. p.725-735.
- PADOVESE, R. Importância biológica da γ -glutamil-S-metilcisteína do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). São Paulo, 1997. 86p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- PADOVESE, R., KINA, S.M., BARROS, R.M.C., BORELLI, P., LANFER MARQUEZ, U.M. Biological importance of γ -glutamil-S-methylcysteine of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chem.**, Amsterdam, v.73, p.291-297, 2001.
- PARMENTIER, C., LEROY, P., WELLMAN, M., NICOLAS, A. Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.719, p.37-46, 1998.
- PARTHASARATHY, S. Oxidation of low-density-lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl ldl receptor. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.917, n.2, p.337-340, 1987.

- PENNICKX, M.J., JASPER, C.J. Molecular and kinetic properties of purified gamma-glutamyl from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Biochem. J.**, Essex, v.67, p.999-1006, 1985.
- PLUMB, J.A., BURSTON, D., BAKER, T.G., GARDNER, M.L.G. A comparison of the structural integrity of several commonly used preparations of rat small-intestine in vitro. **Clin. Sci.**, London, v.73, n.1, p.53-59, 1987.
- RAJAN, D.P., KEKUDA, R., HUANG, W., DEVOE, L.D., LEIBACH, F.H., PRASAD, P.D., GANAPATHY, V. Cloning and functional characterization of a Na⁺-independent, broad-specific neural amino acid transporter from mammalian intestine. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1463, n.1, p.6-14, 2000.
- REESE, C.J. Interaction of allelochemicals with nutrients in herbivore food. In: ROSENTHAL, G.A., JANZEN, D.H., eds. **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. - AIN-93 purified diets for laboratory rodents - final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the ain-76a rodent diet. **J. Nutr.**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- ROBERTS, P.R., BURNEY, J.D., BLACK, K.W., ZALOGA, G.P. - Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. **Digestion**, v.60, n.4, p. 332-337, 1999.
- ROSENTHAL, G.A., BELL, E.A. Naturally occurring, toxic nonprotein amino acids. In: ROSENTHAL, G.A., JANZEN, D.H., eds. **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979. p.353-385.
- RUTLEDGE, J.C., RUDY, J. HPLC qualitative amino acid analysis in clinical laboratories. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v.87, p.614-618, 1987.
- SARWAR, G., BOTTING, H.G. Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.615, p.1-22, 1993.
- SCISLOWSKI, P.W., PICKARD, K. The regulation of transaminative flux of methionine in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.314, p.412-416, 1994.

- SEGERBACK, D., CALLEMAN, C.J., EHRENBORG, L., LOFROTH, G., OSTERMANGOLKAR, S. Evaluation of genetic risks of alkylating-agents. 4. quantitative-determination of alkylated amino-acids in hemoglobin as a measure of dose after treatment of mice with methyl methanesulfonate. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.49, n.1, p.71-82, 1978.
- SHEELA, C.G., KUMUD, K., AUGUSTI, K.T. Antidiabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats, **Planta Med.**, Stuttgart, v.61, n.4, p.356-357, 1995.
- SHERWOOD, R.A. Amino acid measurement by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. **Neurosci. Methods**, London, v.34, p.17-22, 1990.
- SIEGERS, C.P., STEFFEN, B., ROBKE, A., PENTZ, R. The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. **Phytomedicine**, Jena, v.6, n.1, p.7-11, 1999.
- SMITH, A.J. Amino acid. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.289, p.419-426, 1997.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, Columbus, v.30, p.1190-1206, 1958.
- STEELE, R.D., BENEVENGA, N.J. Metabolism of 3-methylthiopropionate in rat-liver homogenates. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.254, n.18, p.8885-8890, 1979.
- STIPANUK, M.H. Metabolism of sulfur-containing amino acid. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.6, p.179-209, 1986.
- STOCCHI, V., PICCOLI, G., MAGNANI, M., PALMA, F., BIAGIARELLI, B., CUCCHIARINI, L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of dimethylaminobenzene sulphonyl-and dimethylaminobenzeno thiohydantoin-amino acid derivatives for amino acid analysis and microsequencing studies at the picomole level. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.178, p.107-117, 1989.
- SUAREZ, F., FURNE, J., SPRINGFIELD, J., LEVITT, M. Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon. **Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v.37, p.G727-G733, 1998.
- SUNDARAM, S.G., MILNER, J.A. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1315, n.1, p.15-20, 1996.

- SZACHOWICZ-PETELSKA, B., FIGASZEWSKI, Z., LEWANDOWSKI, W. Mechanism of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.222, p.169-182, 2001.
- SZASZ, G. Gamma-glutamyltranspeptidase. In: BERGMAYER, H.U., GAWEHN, K., eds. **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Academic Press ou Verlag Chemie, 1974, p.715-719.
- TAKADA, N., YANO, Y., WANIBUCHI, H., OTANI, S., FUKUSHIMA, S. S-methylcysteine and cysteine are inhibitors of induction of glutathione S-transferase placental form-positive foci during initiation and promotion phases of rat hepatocarcinogenesis. **Jpn. J. Cancer Res.**, Tokyo, v.88, n.5, p.435-442, 1997.
- TARGEMAN, A., MEUWESE-ARENDS, M.T., VAN TOGEREN, J.H.M. A new method for the release of volatile sulfur compounds from human serum: its determination by tenax trapping and gas chromatography and its application in liver diseases. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.106, p.175-182, 1985.
- TATE, S.S., MEISTER, A. Interaction de γ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.249, n.23, p.7593-7602, 1974.
- TEERLINK, T., VANLEEUEWEN, P.A.M., HOUDIJK, A. Plasma amino-acids determined by liquid-chromatography within 17 minutes. **Clin. Chem.**, Washington, v.40, n.2, p.245-249, 1994.
- TOBOREK, M., HENNIG, B. Dietary methionine imbalance, endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. **Nutr. Res.**, Copenhagen, v.16, n.7, p.1251-1266, 1996.
- TOENNIES, G., KOLB, J.J. Techniques and reagents for paper chromatography. **Anal. Chem.**, Columbus, v.23, p.823-826, 1951.
- TURNELL, D.C., COOPER, J.D.H. Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. **Clin. Chem.**, Washington, v.28, p.527-531, 1982.
- VARANDA, L.M., MIRANDA, T.M. Solid phase synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. **J. Pept. Res.**, Copenhagen, v.50, p.102-108, 1997.
- VINCENZINI, M.T., FAVILLI, F., IANTOMASI, T. Glutathione-mediated transport across intestinal brush-border membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.942, n.1, p.107-114, 1988.

- VINCENZINI, M.T., FAVILLI, F., IANTOMASI, T. Intestinal uptake and transmembrane transport systems of intact GSH; characteristics and possible biological role. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1113, p.13-23, 1992.
- VINCENZINI, M.T., IANTOMASI, T., FAVILLI, F. Glutathione transport across intestinal brush-border membranes effects of ions, pH $\Delta\psi$, and inhibitors. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.987, p.29-37, 1989.
- WALTER E., KISSEL T., AMIDON G.L. The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.20, n.1, p.33-58, 1996.
- WAYFORTH, H.B. **Experimental and surgical technique in the rat**. London: Academic Press, 1980, p.95-101.
- WEISIGER, R.A., PINKUS, L.M., JAKOBY, W.B. Thiol S-metiltransferase: sugested role in detoxification of intestinal hydrogen sulfide. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.29, p.2885-2887, 1980.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva: WHO, 1999. v.1.
- WILSON, T.H., WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **J. Physiol.**, Cambridge, v.123, p.116-125, 1954.
- ZACHARIUS, R.M. Composition and the nitrogenous components of the bush bean seed (*Phaseolus vulgaris*) including isolation or δ -acetylornithine. **Phytochemistry**, Oxford, v.9, p.2047-2051, 1970.
- ZDUNCZYK, Z., FREINAGEL, S., AMAROWICZ, R., JUSKIEWICZ, J. Effect of faba bean tannins on nutrient absorption in the small intestine of rat. **Acta Aliment.**, Budapest, v.25, n.1, p.37-46, 1996.
- ZIEVE, F.J., ZIEVE, L., DOIZAKI, W.M., GILSDORF, R.B. Synergism between mercaptans and ammonia or fatty acids in the production of coma: a possible role for mercaptans in the pathogenesis of hepatic coma. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.83, p.16-28, 1974.