

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PUTRESCINA POR
CROMATOGRÁFIA EM PAPEL DE FILTRO¹

Otto J. Crocomo²
Celso Rossi²

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método de determinação quantitativa da amina putrescina por cromatografia em papel de filtro seguida de espectrofotometria. 80-85% de putrescina adicionada a extratos de plantas pode ser recuperada.

O espectro de absorção do produto de reação entre putrescina e ninhidrina tem um pico máximo a 575 m μ .

O desenvolvimento da cor do produto de reação atinge um máximo em 20 minutos, a 65°C e se mantém estável durante os 10 minutos seguintes. O produto colorido eluído do cromatograma é estável durante 3 horas.

INTRODUÇÃO

Os métodos de determinação cromatográfica quantitativa de compostos químicos que dão reação positiva com tricetohidrendo hidratado (ninhidrina), como os aminoácidos, amidas e aminas, baseiam-se seja: a) na medida da área da mancha sobre o papel de filtro; b) "eluído" a área ocupada pelo composto no papel, localizada por fluorescência ao U.V. ou por cromatograma paralelo; c) revelando o cromatograma, cortando as manchas obtidas; eluído e determinando a intensidade da cor eluída; d) medindo por densitometria a intensidade da cor da mancha sobre o papel (NAFTALIN, 1948; BULL, HAHN e BAPTIST, 1949; ROCKLAND,

¹Trabalho realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo. Recebido para publicação em 11/9/67.

²Cadeira de Química Biológica (ESALQ).

BLATT e DUNN, 1951; BLOCK, GOLLS e SHARP, 1957; ARZOLLA, 1966). Esses métodos que utilizam ninhidrina são preferidos aos que empregam o 2,4-dinitrofluorobenzeno (2,4 DFB), uma vez que o trabalho com este último consome muito tempo (KAY, HARRIS e ENTENMAN, 1956) e são indicados somente para certos casos, como por exemplo quando se tem uma mistura de um número limitado de aminoácidos (LEVY, 1954; ISHERWOOD, 1954). Para o caso de aminas um método espectrofotométrico foi desenvolvido tendo o 2,4 DFB como reagente (DUBIN, 1960).

No presente trabalho uma técnica é descrita para se determinar a amina putrescina quantitativamente por cromatografia em papel de filtro, seguida de espectrofotometria. Uma vez localizada a mancha sobre o papel, com ninhidrina, a mesma é cortada, eluída e a densidade ótica lida. Essa operação é grandemente facilitada pelo alto valor Rf dessa amina no solvente utilizado, fazendo com que o método possa ser empregado em extratos de plantas desde que os mesmos sejam previamente clarificados em resina trocadora de iônios, como de fato vem sendo feito por nós.

MATERIAL E MÉTODOS

De uma solução estoque (solução A) de putrescina (cloridrato, Nutritional Biochemical Co., USA) 0,2 M em etanol 80% preparou-se a solução de trabalho, diluindo-se 0,1 ml da mesma a 100 ml com etanol 80% (solução B: 0,5 ml = 16 gramas).

Aliquotas da solução B foram passadas por uma coluna de resina trocadora de iônios (Dowex 50 X-8, H⁺, 200-400 mesh) preparada de acordo com PAISTED, 1958, tendo 5 cm de altura e colocada em coluna de vidro de 1 x 30 cm. Putrescina foi eluída com solução saturada de carbonato de amônio, este eluente sendo retirado por evaporação, sob pressão reduzida e baixa temperatura, em Evaporador Rinco (Rinco Instruments Co., Inc., Ill., USA). A amina foi retomada em volume mínimo de H₂SO₄ 0,05 N e cromatografada em papel Whatman nº 1, em butanol normal: metil etil cetona: amônia aquosa (p.e. = 0,88): água desmineralizada (5:3:1:1 v/v) (SMITH e RICHARDS, 1962). O processo cromatográfico foi repetido 3 vezes, durante 4 horas cada uma. O revelador usado foi uma solução de ninhidrina 1% em presença de 0,1% de 8-hidroxiquinoleína, em etanol absoluto.

As regiões das manchas coloridas foram retiradas do cromatograma, cortadas em pequenos pedaços que foram colocados em tubo de ensaio ao qual se adicionou 5 ml de etanol 50% em tampão de fosfato 0,025 M, pH 7,0 (POTTER, MARGOLIS e SHARP, 1957). Após o tempo de eluição estabelecido nos ensaios a serem descri-

tos, e durante o qual o tubo permaneceu em repouso, no escuro, com agitações casuais, leu-se a densidade ótica no espectrofotômetro Zeiss PQ II.

O espectro de absorção e retas padrão foram feitos com alíquotas da solução B de putrescina, seguindo-se processo descrito no texto.

RESULTADOS

Espectro de absorção e estabilidade da cor

Para a determinação do pico máximo de absorção e da estabilidade da cor, fêz-se reagir 2,5 ml da solução B de putrescina com 1,5 ml da solução de ninhidrina +8-hidroxiquinoleína, em tubo de ensaio fechado com "parafilme", em banho-maria a 65°C, durante 30 minutos. Findo esse tempo o tubo de reação foi mantido ao abrigo da luz e as leituras das densidades óticas, em vários comprimentos de onda, foram feitas 1, 1,30, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 15 horas após o tubo ter sido retirado do banho. Uma prova em branco (solução de ninhidrina) foi feita simultaneamente.

O Gráfico 1 mostra o espectro de absorção do composto colorido formado entre putrescina e ninhidrina; os dados com os quais a curva foi construída foram obtidos após 3 horas de reação. Como se pode notar obteve-se dois picos máximos: a 400 m μ e 575 m μ . O máximo secundário, a 575 m μ , foi o escolhido para as determinações quantitativas da amina porque nesse comprimento de onda a correção da prova em branco é pequena. Se o máximo primário, a 400 m μ fosse usado, qualquer erro na prova em branco, por pequeno que fosse, iria obliterar uma pequena absorção correspondente ao composto.

Na Tabela 1 estão os dados obtidos com o ensaio realizado para a determinação do lapso de tempo dentro do qual a densidade ótica pode ser lida. Nota-se que a cor se mantém estável por um período de 6 horas.

Efeito do período de aquecimento sobre o desenvolvimento da cor

60 microlitros da solução B de putrescina foram aplicados em 12 tiras de papel de filtro Whatman nº 1, e a cromatografia monodimensional ascendente foi desenvolvida durante 4 horas, 3 vezes consecutivas. Após pulverização com o revelador ninhidrina, as tiras foram colocadas na estufa, à temperatura de

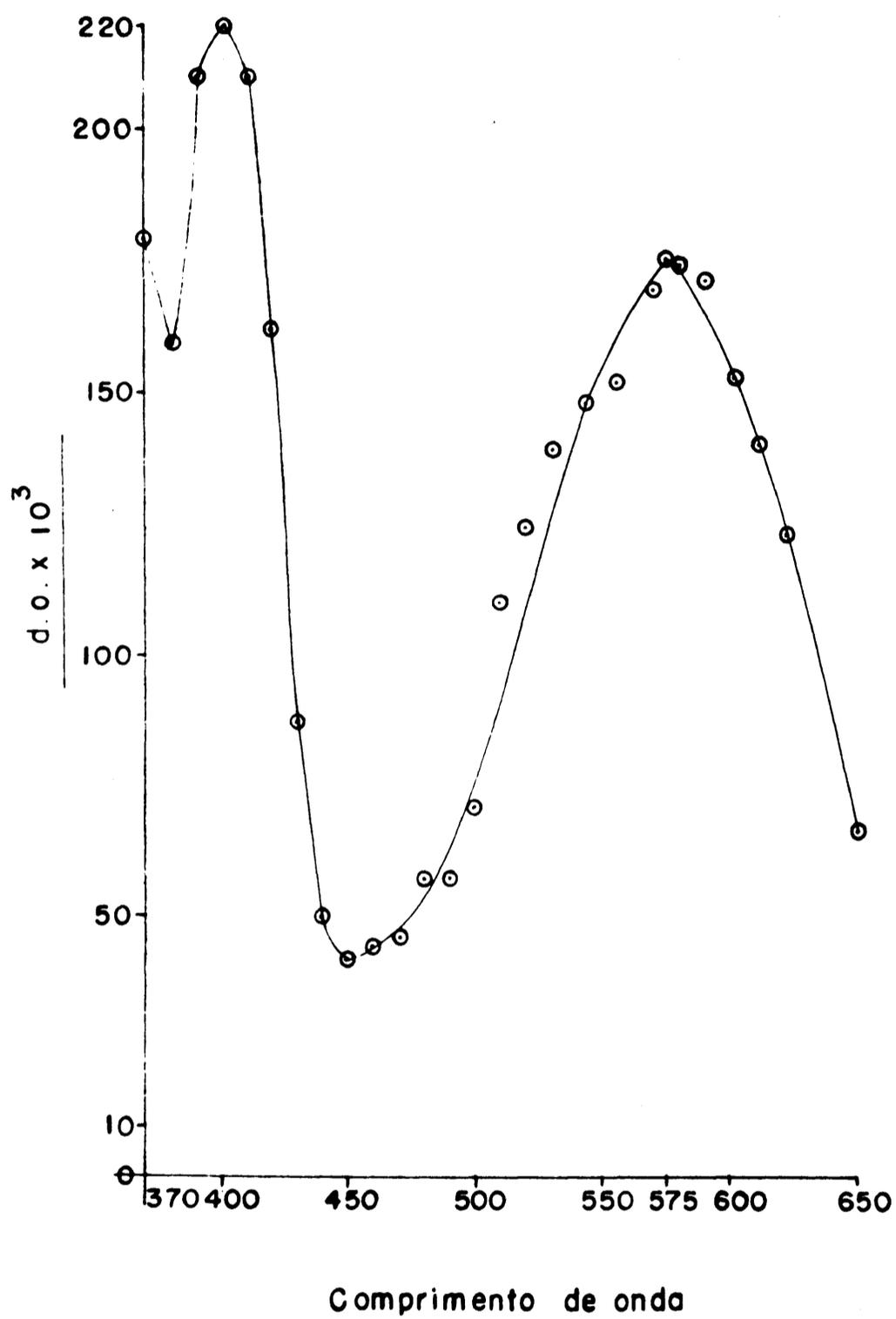


Gráfico 1 - Espectro de absorção do composto colorido formado na reação entre putrescina e ninhidrina. (Comprimento de onda em milimicras).

65°C. Duas tiras foram retiradas em cada um dos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. As regiões das manchas no papel foram cortadas e eluídas com etanol + tampão de fosfato, e as densidades óticas lidas após 3 horas, a 575 m μ . O desenvolvimento da cor atingiu um máximo em 20 minutos, a 65°C, e se manteve aproximadamente constante nos 10 minutos subsequentes (Gráfico 2).

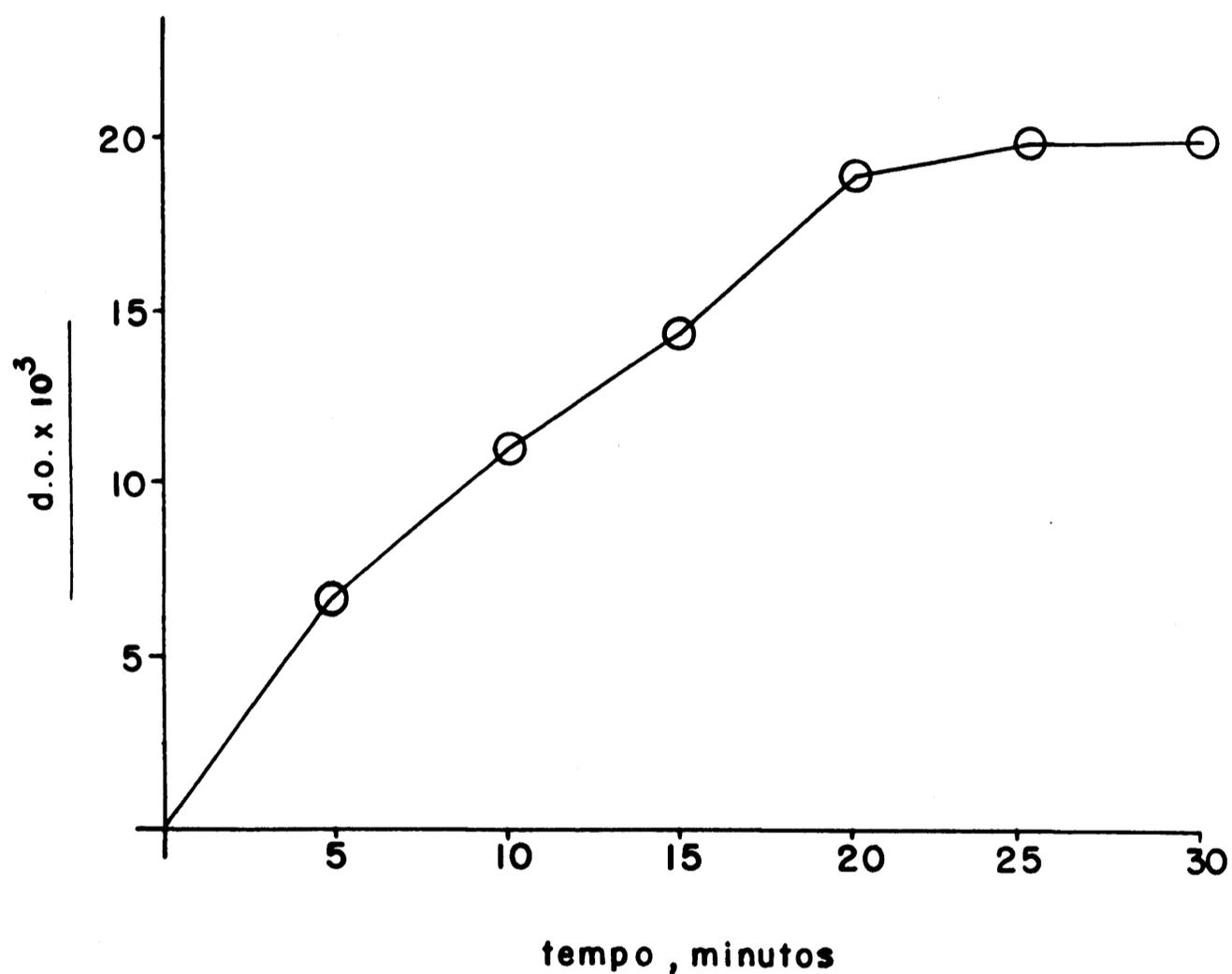


Gráfico 2 - Efeito do período de aquecimento sobre o desenvolvimento da cor.

Reta Padrãoa) Determinação espectrofotométrica

0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ml da solução B de putrescina foram tratados com 1,5 ml da solução de ninhidrina + 8-hidroxi-quinoleína, completando-se o volume a 4 ml com etanol absoluto quando necessário. As leituras das densidades óticas foram feitas 3 horas após os tubos serem retirados do banho-maria, a 65°C; esse período foi o escolhido por estar dentro do lapso de tempo de estabilidade da cor do composto formado por reação entre a amina e o reagente. 100% de transmissão foi acertada com a prova em branco. Os dados obtidos permitiram a construção de uma reta, conforme o indica o Gráfico 3a.

TABELA 1 - Estabilidade da cor do produto formado na determinação quantitativa de putrescina.

P e r í o d o (horas)	Putrescina	
	32 γ	64 γ
	D.O. x 10 ³	
1:00	78	172
1:30	82	177
2:00	83	179
3:00	98	191
4:00	97	193
5:00	97	191
6:00	98	192
7:00	111	203
10:00	120	210
15:00	150	225

b) Cromatografia seguida de espectrofotometria

20, 40, 60 e 80 microlitros da solução B de putrescina foram cromatografados como anteriormente, sendo as manchas, depois de reveladas, cortadas e eluídas. O tempo de eluição foi de 3 horas findo o qual as densidades óticas foram lidas no espectrofotômetro. 100% de transmissão foi acertado com a prova em

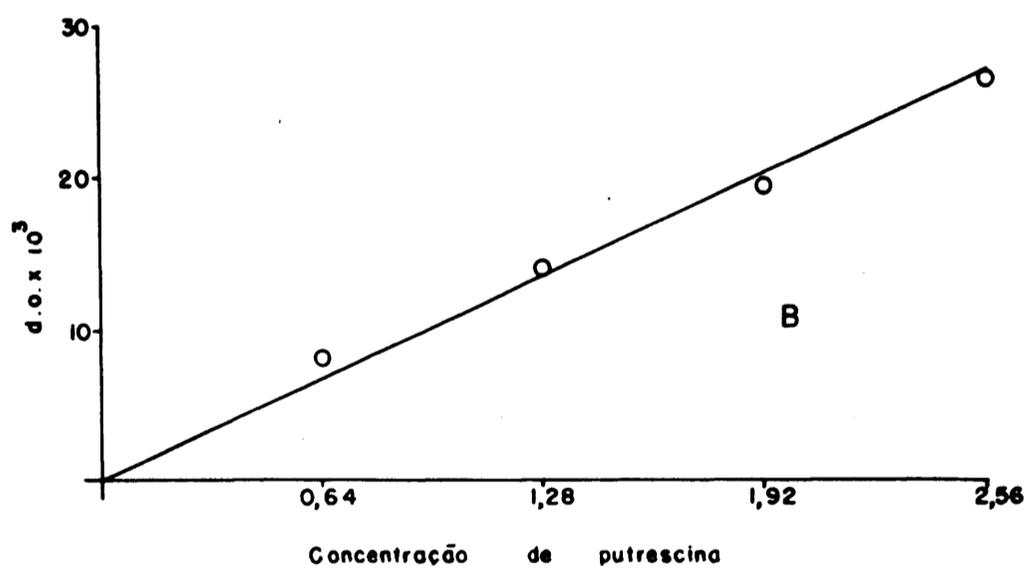
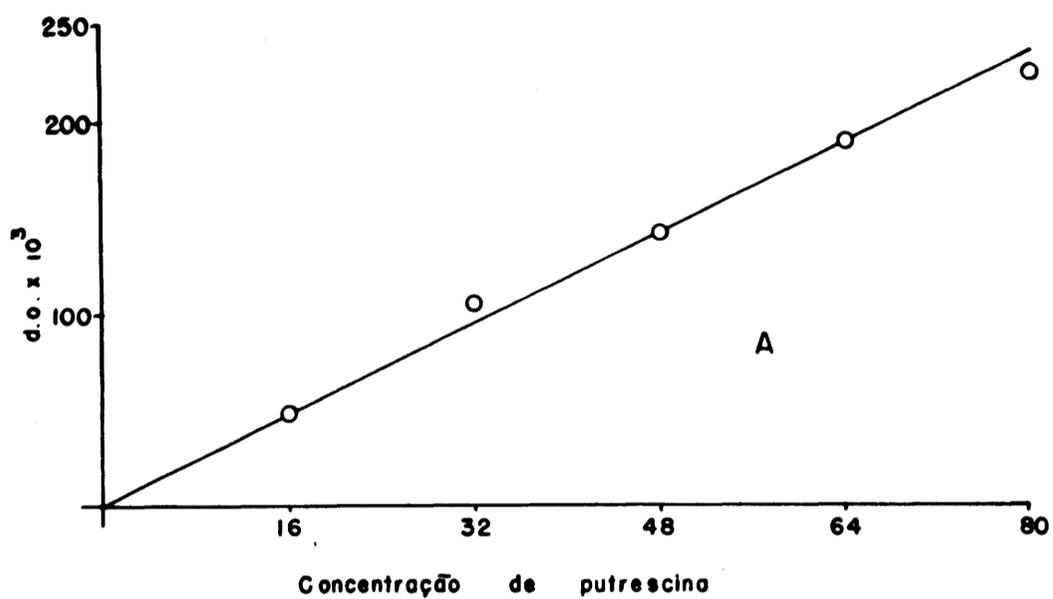


Gráfico 3 - Retas padrão

- a) por espectrofotometria
- b) cromatografia em papel de filtro seguida de espectrofotometria. (Concentração em putrescina em gamas).

branco (ninhidrina + 8-hidroxiquinoleína em etanol absoluto). Com os dados construiu-se a reta do Gráfico 3b.

Como se pode observar pelos Gráficos 3a e 3b há uma perfeita correlação linear entre as leituras das densidades óticas obtidas no espectrofotômetro e a concentração de putrescina na solução.

c) Viabilidade do método

Como todo método cromatográfico, o presente é bastante simples. Acresce ainda sua viabilidade e aplicação em extratos vegetais o fato de que, como ressaltamos na Introdução, putrescina apresenta um alto valor R_f no solvente empregado, o que facilita a sua imediata identificação e separação da mancha do cromatograma.

Nos testes de recuperação, extratos alcoólicos de plantas de cevada normais e deficientes em potássio, estas últimas apresentando um aumento no teor de putrescina (CROCOMO, 1966) foram concentrados e clarificados em presença ou não da amina (50 gramas), com resina Dowex. Os aminoácidos foram eluídos com amoníaco 0,4N em etanol 80% seguido de amoníaco 4N. Putrescina e uma outra amina, agmatina, foram eluídas com solução saturada de carbonato de amônio. O eluído correspondente às aminas foi evaporado e retomado em H_2SO_4 0,05N e a cromatografia quantitativa conduzida como anteriormente. Os dados obtidos indicaram uma recuperação ao redor de 80-85%.

RESUMO E CONCLUSÕES

O método aqui descrito diz respeito à determinação quantitativa da amina putrescina por cromatografia em papel de filtro seguida de eluição da mancha colorida e a leitura da sua densidade ótica espectrofotometricamente. Os dados obtidos permitem concluir que:

1. O composto colorido formado na reação entre putrescina e ninhidrina, em presença de 8-hidroxiquinoleína, se mantém estável por um período de 6 horas, e apresenta um pico máximo de absorção secundário a 575 $m\mu$.
2. O período de aquecimento do cromatograma, a 65°C, foi estabelecido como sendo de 30 minutos.
3. A determinação da reta padrão seja: a) a partir de soluções de putrescina não cromatografadas, ou b) com o eluído das manchas cromatográficas, demonstrou haver estreita correlação

entre as leituras das densidades óticas e a concentração de putrescina, nos padrões.

4. Teste de recuperação de putrescina adicionada a extratos de plantas de cevada e então clarificados com Dowex e cromatografados, mostraram haver uma recuperação da ordem de 80-85%.

SUMMARY

The method described herein involves the quantitative determination of the amine putrescine by paper chromatography followed by spectrophotometry of the eluted spot. From the data some conclusions can be drawn:

1. Satisfactory recovery of putrescine added to plant extracts can be achieved with that method (c.a. 80-85%);
2. The absorption spectra of the reaction products of putrescine and ninhydrin shows a maximum peak at 575 m μ ;
3. In the assay on the effect of the length of heating on the color yield of the reaction product it was observed that the color development reached a maximum within 20 minutes, at 65°C, and did not decline within the next 10 minutes;
4. It was found that the eluted ninhydrin color was stable for at least 3 hours following elution;
5. The absorbance at 575 m μ of the putrescine-ninhydrin reaction product as a function of the amount of putrescine in the reaction mixture as well as applied to the chromatograms yielded a straight line.

LITERATURA CITADA

- ARZOLLA, J.D.P., 1955/56. An. E.S.A. "Luiz de Queiroz" 12:179.
- ARZOLLA, J.D.P., 1966 5ª Exp. - Proteínas-Partes 1 e 2, in "Práticas de Bioquímica Animal": O.J. Crocomo e colaboradores, ESALQ, Piracicaba.
- BLOCK, R.G., 1952. Paper chromatography, A Laboratory Manual, Academic Press Inc., N.Y.
- BLOCK, R.G., E.L.DURRUM & G.ZWEIG, 1955. A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, Academic Press Inc., N.Y.

- BULL, H.B., J.W.HAHN & V.H.BAPTIST, 1949. J.Amer.Chem.Soc. 71: 550.
- CROCOMO, O.J., 1966. Em impressão.
- DUBIN, D.T., 1960. J.Biol. Chem. 235:783.
- ISHERWOOD, F.A., 1954. Nature (Londres) 174: 123.
- KAY, R.E., D.C.HARRIS e C.ENTENMAN, 1956. Arch.Biochem.Biophys. 63: 14.
- LEVY, A.L., 1954. Nature (Londres) 174: 126.
- NAFTALIN, L., 1948. Nature (Londres) 161: 763.
- PEREIRA, A. & J.A. SERRA, 1951. Science 113: 387
- POTTER, C.A., D.MARGOLIS e P.SHARP, 1957. Contr.Boyce Thompscon Inst. 18: 465
- ROCKLAND, L.B., J.L.BLATT & M.S.DUNN, 1951. Anal. Chem. 23:1142.
- SMITH, T.A. e F.J. RICHARDS, 1962. Biochem. Jr. 84: 292.