

## DETERMINAÇÃO DE GOSSIPOL PLASMÁTICO EM CAPRINOS, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

Márcia Aparecida Andreazzi \*

Mauro Alvarez \*\*

Gentil Vanini de Moraes \*\*\*

Geraldo Tadeu dos Santos \*\*\*

Francisco de Assis Fonseca de Macedo \*\*\*

ANDREAZZI, M. A.; ALVAREZ, M.; MORAES, G. V.; SANTOS, G. T.; MACEDO, F. A. F. Determinação de gossipol plasmático em caprinos, utilizando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 2(3): 225-229, 1998.

**RESUMO:** O gossipol é um pigmento polifenólico presente na planta do algodão, encontrado em maiores concentrações principalmente no caroço. Este pigmento é considerado tóxico, pois afeta vários processos metabólicos em animais monogástricos, porém em ruminantes seus efeitos e, principalmente, sua absorção são muito questionados. Dez caprinos machos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: o testemunha e o teste. Neste último grupo, os animais receberam ração contendo 30% de caroço de algodão (média de 13,45 mg de gossipol livre/ Kg PV /dia); a duração do experimento foi 18 meses. O sangue destes animais foi coletado no início, meio e fim do experimento e com o plasma obtido realizou-se a análise da concentração de gossipol livre através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). De acordo com os resultados obtidos, observou-se que nenhuma das amostras dos animais testados apresentou picos de gossipol, o que nos permite concluir que talvez o gossipol não tenha sido absorvido ou a quantidade absorvida tenha sido muito pequena.

**PALAVRAS-CHAVE:** caprinos; caroço de algodão; cromatografia; gossipol; plasma.

### PLASMA GOSSIPOL DETERMINATION IN CAPRINE, USING HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

ANDREAZZI, M. A.; ALVAREZ, M.; MORAES, G. V.; SANTOS, G. T.; MACEDO, F. A. F. Plasma gossipol determination in caprine, using high-pressure liquid chromatography (HPLC). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 2(3): 225-229, 1998.

**ABSTRACT:** Gossipol is a polyphenolic pigment from the cotton plant, and is found in greater concentrations mainly on the seed. This pigment is considered toxic, for it affects several metabolic processes in monogastric animals, yet in ruminants its effects and, above all, its absorption, are questioned. Ten male caprines were randomly divided in two groups, control and experiment. On the latter, animals received chow containing 30% of cotton seed (mean of 13.45 mg of free gossipol/kg PV/day); experiment duration was of 18 months. Blood samples were collected at the beginning, middle and end of this period and with the plasma the analysis of free gossipol concentration was carried out through high-pressure liquid chromatography (HPLC). According to the results obtained, it was observed that none of the samples of the experimental animals showed peaks of gossipol, allowing us to conclude that perhaps gossipol was not absorbed or that the amount that absorbed was too small.

**KEY WORDS:** caprine; chromatography; cotton seed; gossipol; plasma.

\* Zootecnista. Professora do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Unipar.

\*\* Docente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

\*\*\* Docente do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Endereço para correspondência: Márcia Aparecida Andreazzi. Av. Cerro Azul, 1499, apto. 503-A. Maringá – PR. 87000-000

### Introdução

O gossipol é um pigmento polifenólico amarelo, natural, presente na planta do algodão do gênero *Gossypium*. Está contido, exclusivamente, dentro de pequenas glândulas de pigmento que são encontradas, principalmente, na semente e na raiz, e em menor quantidade, nos caules e folhas.

De acordo com DANKE *et al.* (1965), a concentração de gossipol na planta pode variar de 0% (*G. hirsutum*) a 9% (*G. klotzschianum*), sendo que, VINNE (1992), relatou que os teores de gossipol na semente de algodão, durante os últimos treze anos, reportados pela National Cottonseed Products Association (NPCA) é de 0,89%, e que quase todo o gossipol se encontra no miolo da semente, na forma de gossipol livre (GL), havendo apenas uma pequena quantidade no tegumento.

Além do gossipol, o algodão apresenta mais quinze pigmentos naturais, porém, somente o gossipol apresenta importância econômica. Isto porque, o caroço de algodão (CA) ou o seu farelo (FA), poderiam ser utilizados em grande escala na alimentação animal devido ao seu valor nutricional, em termos de proteína bruta, fibra bruta e energia (KUTCHES *et al.*, 1987). Porém, esta utilização se restringe devido a presença do gossipol, que é tóxico, interferindo em vários processos metabólicos nos animais, principalmente nos monogástricos (ABOU-DONIA *et al.*, 1970; BEAUDOIN, 1985; GU *et al.*, 1990).

Porém, há relatos de que os animais ruminantes, alimentados com CA ou FA, não sofrem esta ação tóxica, pois têm a capacidade de inativá-lo no rúmen, onde este formaria um complexo com as proteínas ali presentes, o que impediria sua absorção no intestino (RANDEL *et al.*, 1992). Por outro lado, LINDSEY *et al.* (1980) afirmaram que os ruminantes podem sofrer processo de intoxicação pelo gossipol. Deste modo, constatou-se vários trabalhos controversos quanto a absorção do gossipol pelos ruminantes (JONES & SMITH, 1977; ANDERSON *et al.*, 1982).

A maioria das pesquisas realizadas para elucidar este fato, observaram, além dos sinais clínicos de toxidez, os níveis de gossipol plasmático (LINDSEY *et al.*, 1980; HAWKINS *et al.*, 1985; JIMENEZ *et al.*, 1989), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), que é

recomendável pois fornece dados quali e quantitativos, além de ser de alta sensibilidade - 95% (ABOU-DONIA *et al.*, 1970; SATTAYASAI *et al.*, 1984; WU *et al.*, 1988).

O presente estudo foi realizado com a finalidade de verificar, em caprinos alimentados com ração contendo 30% de CA (13,45 mg GL/Kg PV), a presença de GL no plasma, através da técnica de HPLC.

### Material e Método

Este experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, com duração de 18 meses.

Foram utilizados 10 caprinos da raça Saanem, mestiços, machos, com idade média inicial de 4 meses e final de 20 meses, divididos em 2 grupos de 5 animais, o SCA= grupo que recebeu ração balanceada sem CA e CCA= grupo que recebeu ração balanceada com 30% de CA, na matéria natural. O CA utilizado foi analisado pelo Método Oficial da American Oil Chemists Society (AOCS, 1988), e continha 0,53% de GL, que de acordo com o manejo alimentar adotado, proporcionou, durante todo o período experimental, a ingestão de 13,45 mg de GL/Kg PV/dia, considerando-se a MS. As rações foram isoprotéicas, isoenergéticas e isominais, elaboradas de acordo com as exigências dos animais nas suas diferentes fases de crescimento.

As coletas de sangue foram realizadas no início, meio e fim do experimento e as amostras de plasma obtidas foram congeladas à -20°C. A análise do GL no plasma foi fundamentada em SATTAYASAI *et al.* (1984) utilizando-se HPLC. Para tal, utilizou-se um Cromatógrafo a Líquido de Alta Pressão (Modelo CG-480-C), um Detector de Absorbância em Ultra Violeta (IASCO - UV 970), uma Coluna C18 de fase reversa ( $\mu$  BONDAPAK C18) e um Sistema de Injeção U6K. A fase móvel foi obtida a partir de metanol + água destilada + ácido acético glacial (77:20:3). A velocidade de fluxo foi de 2 ml/minuto. O gossipol foi detectado e quantificado por Monitor UV, a 254 nm. Os picos foram determinados por um Integrador Processador (Modelo CG-200). A curva padrão foi obtida utilizando-se solução de gossipol ácido acético (95% de pureza), diluída em metanol nos níveis de 1, 2, 10, 20 e 50 ng de GL/ml.

### Resultados e Discussão

De acordo com a curva padrão, os picos de gossipol foram obtidos no intervalo de tempo de 4 minutos e 58 segundos a 4 minutos e 7 segundos (4'58" - 4'7") (Figura 1). Comparando os resultados obtidos à curva padrão, observou-se que nenhuma das amostras testadas apresentou picos consideráveis neste intervalo de tempo, o que demonstra a inexistência ou mínima quantidade (<0,1 ng/ml) de gossipol nas amostras testadas (Figuras 2, 3 e 4).

Resultados semelhantes foram encontrados por JIMENEZ *et al.* (1989) quando trabalharam com lotes de touros que receberam 6 e 30 mg de Gossipol Total (GT/kg PV/dia), por 60 e 42 dias, respectivamente e, analisaram o gossipol no plasma através de HPLC.

Porém, LINDSEY *et al.* (1980) reportaram que em vacas que receberam 6,6 ou 42,7 mg GL/Kg/PV/dia, durante 3 semanas, foram detectados 1,5 e 2,0 µg GL/ml de plasma, respectivamente, permanecendo estáveis durante todo o período experimental. Resultados similares foram citados por HAWKINS *et al.* (1985), que também trabalharam com vacas que receberam ração contendo 18,5% de CA durante 10 meses e encontraram 1,21 mg GL/ml de plasma.

### Conclusão

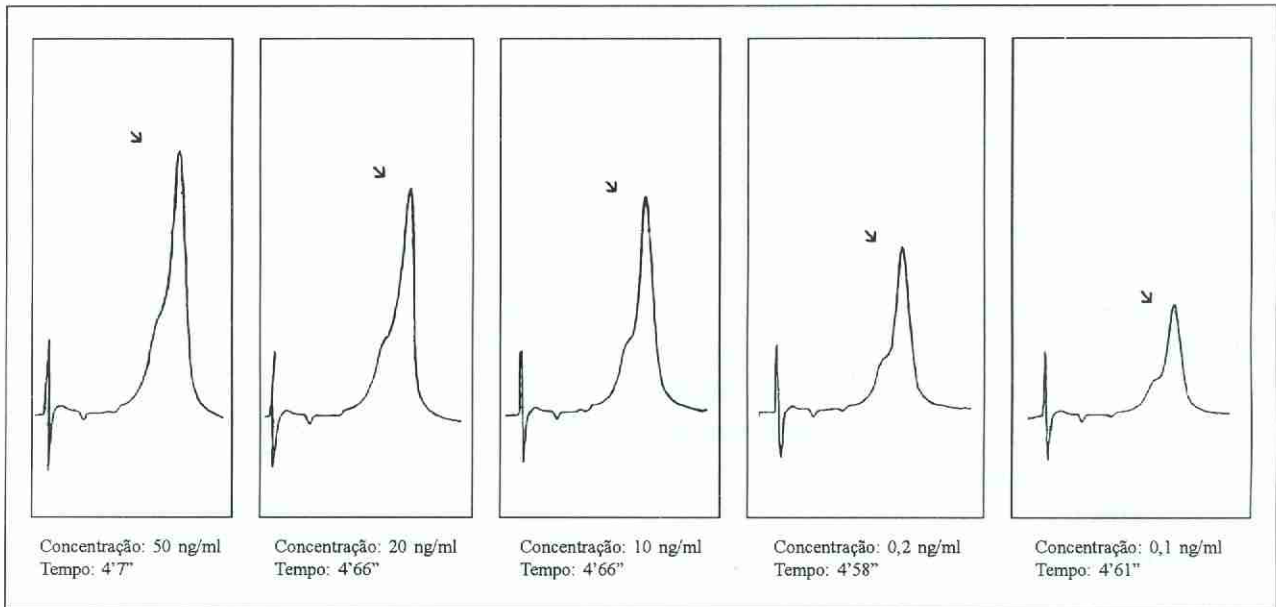
De acordo com as condições deste estudo, não foi detectado traços de GL nas amostras de plasma testadas, o que permite concluir que o gossipol não tenha sido absorvido pelos animais ou que a quantidade absorvida tenha sido muito pequena.

### Referência Bibliográfica

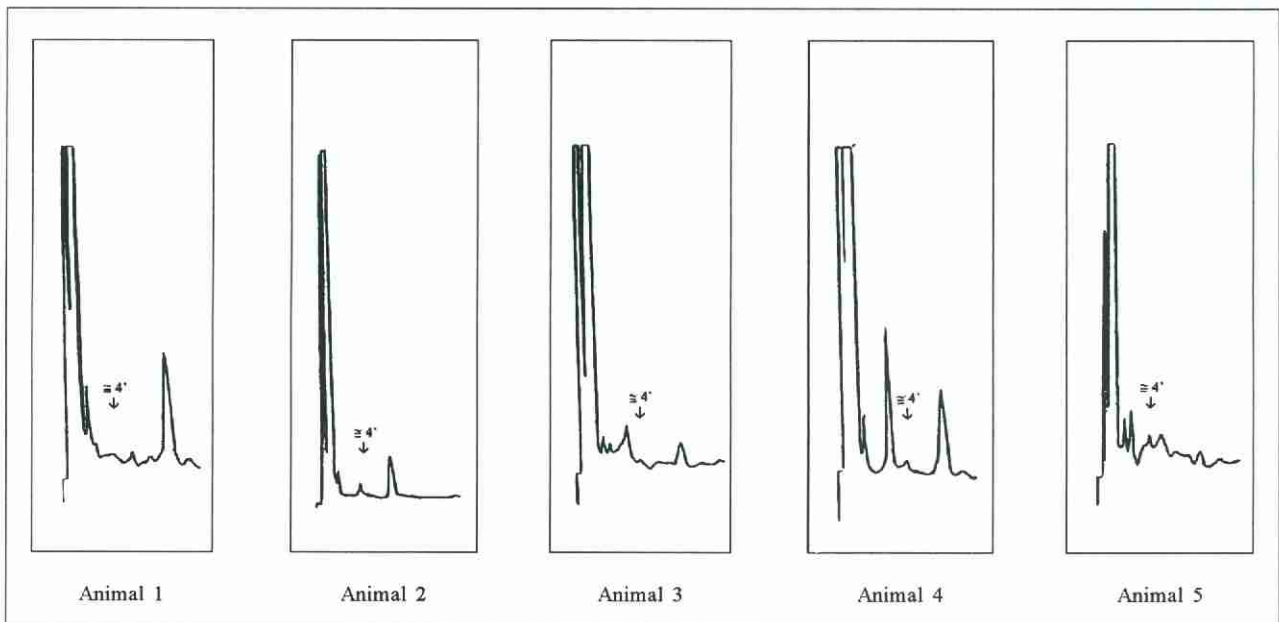
- ABOU-DONIA, M. B.; LYMAN, C. M.; DIECKERT, J. W. Metabolite fate of gossypol: The metabolism of <sup>14</sup>C-gossypol in rats. *Lipids*, 5: 939, 1970.
- AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. Determination of free gossypol. Official method Ba 7-58. In: *Official and Tentative Methods of Analysis*, 3.ed., 1988.
- ANDERSON, M. J.; KHOYLOO, M.; WALTERS, J. L. Effects of feeding whole cottonseed on intake, body weight, and reticulorumen development of young Holstein calves. *Journal Dairy Science*, 65: 764, 1982.
- BEAUDOIN, A. R. The embryotoxicity of gossypol. *Teratology*, 32: 251-257, 1985.
- DANKE, R. J.; PANCIERA, R. J.; TILIMAM, A. D. Gossypol toxicity studies with sheep. *Journal of Animal Science*, 24: 1199-1201, 1965.
- GU, Y.; LIN, Y. C.; RIKIHISA, Y. Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 169: 455-461, 1990.
- HAWKINS, G. E. *et al.* Physiological effects of whole cottonseed in the diet of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 68: 2608, 1985.
- JIMENEZ, D. A. *et al.* Effect of feeding gossypol in cottonseed meal on growth, semen quality and spermatogenesis of yearling Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 72: 1866-1875, 1989.
- JONES, L. A.; SMITH, F. H. Effect of gossypol on the removal of nitrogen and amino acids from feed in digestion by the rat. *Journal of Animal Science*, 44: 410-416, 1977.
- KUTCHES, A. J.; CHALUPA, W.; TREI, J. Delinted cottonseed improves lactational response. *Feedstuffs*, 59: 16-20, 1987.
- LINDSEY, T. O.; HAWKINS, G. E.; GUTHRIE, L. D. Physiological response of lactating cows to gossypol from cottonseed meal rations. *Journal of Dairy Science*, 63: 562-573, 1980.
- RANDEL, R. D.; CHASE-JR., C. C.; WYSE, S. J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. *Journal of Animal Science*, 70: 1628-1638, 1992.
- SATTAYASAI, N.; SATTAYASAI, J.; HAHNVAJANAWONG, V. High-performance liquid chromatographic determination of gossypol in plasma. *Journal of Chromatography*, 307: 235-39, 1984.
- VINNE, J. U. V. D. Alimentação de gado. Quanto de semente de algodão é muito? *Revista Batavo*. 9: 20, 1992.
- WU, D. F.; YU, Y. W.; ZHENG, D. K. Determination of (+) and (-) gossypol in human plasma using high performance liquid chromatography with pre-column chemical derivatization. *Yao Hsueh Hasueh Pao*, 23: 927-932, 1988.

Recebido em: 01/07/1998

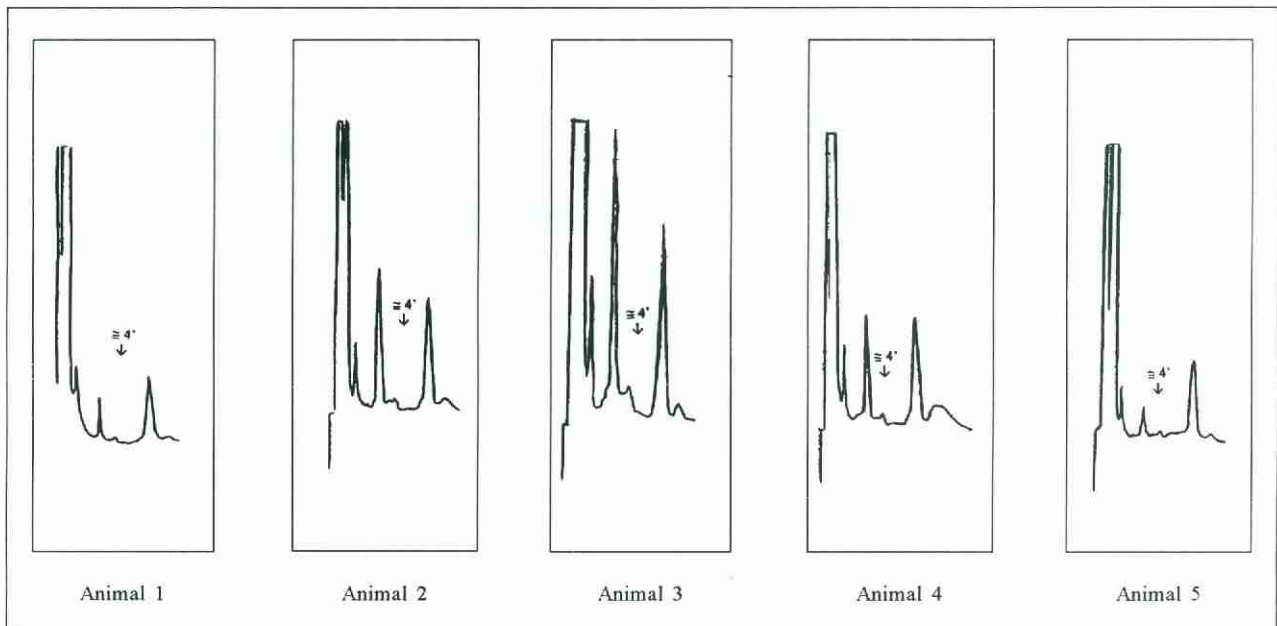
Aceito em: 19/09/1998



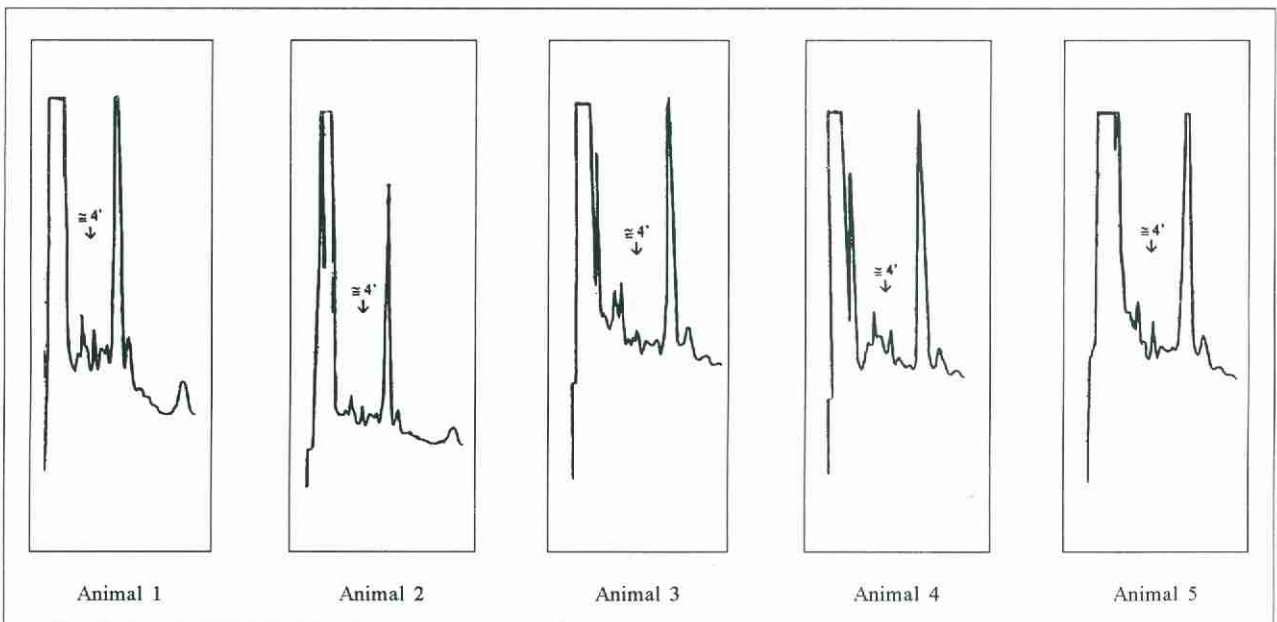
**FIGURA 1** - Picos obtidos da análise de gossipol ácido acético (95% de pureza) diluído em metanol, de acordo com a concentração e o tempo saída da amostra (curva padrão do gossipol HPLC)



**FIGURA 2** - Análise de GL, através de HPLC, no plasma de caprinos (início do experimento).



**FIGURA 3** - Análise, através de HPLC, de GL no plasma de caprinos alimentados durante 9 meses com ração contendo 30% CA.



**FIGURA 4** - Análise, através de HPLC, de GL no plasma de caprinos alimentados durante 18 meses com ração contendo 30% CA.