

Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

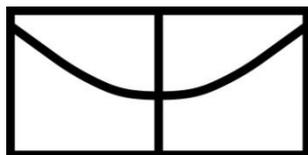
**Determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo  
por espectrofluorimetria e calibração de segunda ordem**

Gabriela Gennari de Souza

**Orientador**

Prof. Dr. Jez William Batista Braga

**Brasília, dezembro de 2013**



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo  
por espectrofluorimetria e calibração de segunda ordem**

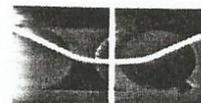
Gabriela Gennari de Souza

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de Brasília  
como parte dos requisitos exigidos para  
obtenção do Título de Mestre em  
Química Analítica.*

### **Orientador**

Prof. Dr. Jez William Batista Braga

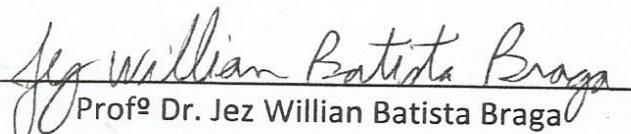
**Brasília, dezembro de 2013**



Universidade de Brasília – Instituto de Química

## COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Gabriela Gennari de Souza**, matrícula nº **11/0164971**, intitulada “**Determinação de Amilorida e Triantereno em Plasma Sanguíneo por Espectrofluorimetria e Calibração de Segunda Ordem**”, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 19 de dezembro de 2013.

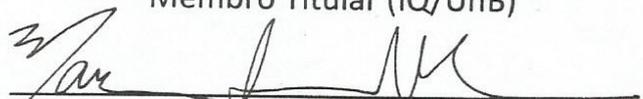
  
Prof<sup>o</sup> Dr. Jez Willian Batista Braga

Presidente de Banca (IQ/UnB)



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cristi Basile Dias

Membro Titular (IQ/UnB)



Prof<sup>o</sup> Dr. Maurício Homem de Mello

Membro Titular (Farmácia/UnB)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria Regina Bellotto

Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 19 de dezembro de 2013.

## Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais José Agmar e Helenita, que tanto se dedicaram a minha educação e a minha formação e fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Obrigada por todo amor, carinho, companherismo, dedicação e paciência.*

## Agradecimentos

- À minha família, aos meus pais José Agmar e Helenita por sempre acreditarem em mim, me incentivando a me superar sempre. Aos meus irmãos Bela, Dani e Rafa e aos meus cunhados Bota, Fabi e Vera pelo apoio, incentivo e amizade. Às minhas sobrinhas Anninha, Carol e Juju, que mesmo tão pequenininhas me ensinam que o amor é infinito. À Big, por todas as viagens e cultura adquirida. À vovó Helenita que mesmo não estando mais com a gente, se faz presente. Obrigada pelo amor, carinho, paciência e dedicação.
- Ao Douglas, por ser mais que um namorado, ser meu melhor amigo, o melhor companheiro e estar presente em todos os momentos, me apoiando, dando força, coragem e colo.
- À Joycinha, Nancy, Doda, Eve e John John por toda amizade e carinho.
- À Rosy, não só pela amizade e companheirismo, mas também pelos vários meses dedicados a esse projeto, incluindo desde as idas ao Comitê de Ética aos longos dias de bancada.
- Ao professor orientador Dr. Jez Willian Batista Braga pela oportunidade de desenvolver esse projeto e mais ainda, por toda a orientação e atenção dada.
- Aos amigos do grupo AQQUA, Ana Paula, Arthur, Carla, Daniel, Everaldo, Janaina, João, Joyce, Lorena, Lilian, Maria Cecília, Marina, Nancy, Natasha, Normara, Rafael Feitosa, Raphael Seit, Rosylane, Tatiane e Vitor Hugo, por fazerem do laboratório um lugar tão harmonioso e agradável de se trabalhar. Obrigada por todas as contribuições, conversas e companheirismo.

- Aos professores do grupo AQQUA, Dra. Ana Cristi Basile Dias, Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida, Dra. Valéria Regina Bellotto, Dr. Alexandre Fonseca, Dr. Fernando Fabríz Sodré e Dr. Jez Willian Batista Braga, por todo o aprendizado compartilhado e por formarem um grupo de pesquisa tão unido.
- Aos membros da banca, professores Dra. Ana Cristi Basile Dias, Dra. Valéria Regina Bellotto e Dr. Maurício Homem de Mello, pela avaliação e apreciação deste trabalho.
- Aos professores e funcionários do Instituto de Química da UnB que participaram da minha formação acadêmica.
- Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (INCTBio), à Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação (DPP) da Universidade de Brasília, pelo financiamento do projeto.
- À CAPES, pela concessão de bolsa de auxílio;
- À Fundação Hemocentro de Brasília, por aceitar participar desse projeto, fornecendo as amostras de plasma sanguíneo necessárias para sua realização;
- E a Deus, por sempre colocar pessoas tão maravilhosas em minha vida.

## Resumo

Souza, G. G. **Determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo por espectrofluorimetria e calibração de segunda ordem.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

A calibração de segunda ordem é aplicada a dados trilineares, que possuem três dimensões. Os dados espectrofluorimétricos possuem essa característica e têm sido analisados por modelos de segunda ordem, como UPLS e PARAFAC, por exemplo. O uso de ferramentas quimiométricas associadas a técnicas mais simples vem sendo uma alternativa perante técnicas mais sofisticadas e matrizes complexas, quando geralmente usa-se cromatografia. O uso de espectrofluorimetria na determinação de fármacos que apresentam fluorescência natural, como o triantereno e a amilorida, parece simples à primeira vista, mas torna-se complicado em fluídos biológicos, pois esses também possuem fluorescência natural. O uso de quimiometria possibilita essa determinação sem exaustivas etapas de extração ou pré-concentração do analito. A importância de se determinar fármacos diuréticos em amostras biológicas abrangem análises de doping, estudos clínicos e farmacocinéticos. Os analitos de interesse apresentam baixa faixa terapêutica, e por esse motivo geralmente são determinados por métodos cromatográficos. O presente estudo propõe uma precipitação das proteínas plasmáticas com acetonitrila, o que reduz significativamente a intensidade de fluorescência do plasma sanguíneo, mas não a elimina. Por esse motivo, a regressão univariada não é capaz de estimar bons resultados. O método da adição de padrão é usada a fim de diminuir o efeito de matriz, mas não é suficiente para estimar bons resultados na regressão univariada. Visando determinar amilorida e triantereno em plasma sanguíneo por espectrofluorimetria, dois modelos de segunda ordem são otimizados, o PARAFAC e o UPLS, sendo obtidas boas estimativas com a calibração de segunda ordem.

Palavras-chaves: Amilorida, Triantereno, Fluorescência Molecular, PARAFAC, UPLS.

## Abstract

Souza, G. G. **Determination of amiloride and triamterene in blood plasma by spectrofluorimetry and second order calibration.** Dissertation (MSc in Chemistry) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

The second order calibration is applied to trilinear data, which have three dimensions. The spectrofluorimetric data have this characteristic and has been analyzed by second order models as UPLS and PARAFAC, for example. The use of chemometrics tools associated with simplest techniques is an alternative before more sophisticated techniques and complex matrices, when chromatography is usually used. The use of spectrofluorimetry for the determination of drugs that fluoresce naturally, as triamterene and amiloride, seems simple at first glance, but becomes complicated in biological fluids, as these also have natural fluorescence. The use of chemometrics enables this determination without exhaustive extraction steps or preconcentration of the analyte. The importance of determining diuretic drugs in biological samples include doping analyzes, clinical and pharmacokinetic studies. The analytes of interest have low therapeutic range, and for that reason are usually determined by chromatographic methods. This study proposes a plasma protein precipitation with acetonitrile, which significantly reduces the fluorescence intensity of blood plasma, but does not eliminate it. For this reason, univariate regression is not able to estimate good results. The standard addition method is used to reduce the matrix effect, but it isn't sufficient to estimate good results in univariate regression. To determine amiloride and triamterene in blood plasma by spectrofluorimetry, two second order models are optimized, PARAFAC and UPLS, being obtained good estimates with second-order calibration.

Keywords: Amiloride, Triamterene, Molecular Fluorescence, PARAFAC, UPLS.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1	Determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo .....	3
2.2	Espectroscopia de fluorescência molecular .....	7
2.2.1	Teoria da fluorescência molecular .....	8
2.2.2	Variáveis que afetam a fluorescência .....	9
2.3	Métodos univariado e multivariados .....	11
2.3.1	Regressão univariada e adição de padrão .....	13
2.3.2	Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) .....	16
2.3.3	Quadrados Mínimos Parciais Desdobrados (UPLS) .....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1	Reagentes, padrões e amostras .....	21
3.1.1	Reagentes e soluções padrão .....	21
3.1.2	Amostras de plasma sanguíneo.....	21
3.2	Instrumentação.....	22
3.3	Procedimento experimental .....	23
3.3.1	Limpeza das vidrarias.....	23
3.3.2	Preparo das soluções padrão e das amostras fortificadas.....	24
3.3.2.1	Planejamento para uso das amostras de plasma.....	25
3.3.3	Procedimento de <i>clean-up</i> .....	27
3.3.4	Adição de padrão .....	28
3.4	Tratamento dos resíduos .....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1	Etapa de <i>clean-up</i> .....	32
4.2	Adição de padrão.....	33
4.3	Triantereno.....	34

4.3.1	Determinação por regressão univariada .....	35
4.3.2	Determinação através do modelo PARAFAC .....	39
4.3.3	Determinação por regressão empregando UPLS .....	44
<b>4.4</b>	<b>Amilorida.....</b>	<b>49</b>
4.4.1	Determinação por regressão univariada .....	50
4.4.2	Determinação através do modelo PARAFAC .....	54
4.4.3	Determinação por regressão empregando UPLS .....	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>
	<b>Anexo A – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB. ....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ALS</b>	Quadrados Mínimos Alternantes ( <i>Alternating Least Square</i> ).
<b>AML</b>	Amilorida.
<b>BLLS</b>	Quadrados Mínimos Bilineares ( <i>Bilinear Least Squares</i> ).
<b>CEP-FS</b>	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB.
<b>CGSH-MS</b>	Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde.
<b>DAD</b>	Detecção pro Arranjo de Diodos ( <i>Diode Array Detection</i> ).
<b>DTLD</b>	Decomposição Trilinear Direta ( <i>Direct Trilinear Decomposition</i> ).
<b>EEF</b>	Excitação e Emissão de Fluorescência ( <i>Excitation Emission Fluorescence</i> ).
<b>FHB</b>	Fundação Hemocentro de Brasília.
<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo ( <i>Flow Injection Analysis</i> ).
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa ( <i>Gas Chromatography</i> ).
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ).
<b>IOC</b>	Comitê Olímpico Internacional ( <i>International Olympic Committe</i> ).
<b>LC</b>	Cromatografia Líquida ( <i>Liquid Chromatography</i> ).
<b>LD</b>	Limite de detecção.
<b>LQ</b>	Limite de quantificação.
<b>MCR</b>	Resolução de Curvas Multivariadas ( <i>Multivariate Curve Resolution</i> ).
<b>MMA</b>	Artes Marciais Mistas ( <i>Mixed Martial Arts</i> ).

<b>MS</b>	Espectrometria de Massas ( <i>Mass Spectrometry</i> ).
<b>NIR</b>	Infravermelho Próximo ( <i>Near-Infrared</i> ).
<b>PARAFAC</b>	Análises de Fatores Paralelos ( <i>Parallel Factor Analysis</i> ).
<b>PCR</b>	Regressão por Componentes Principais ( <i>Principal Componentes Regression</i> ).
<b>PLS</b>	Quadrados Mínimos Parciais ( <i>Partial Least Squares</i> ).
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação.
<b>RBL</b>	Bilinearização Residual ( <i>Residual Bilinearization</i> ).
<b>RESQUI-UnB</b>	Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Perigosos da Universidade de Brasília.
<b>RLM</b>	Regressão Linear Múltipla ( <i>Multiple Linear Regression</i> ).
<b>SIA</b>	Análise por Injeção Sequencial ( <i>Sequential Injection Analysis</i> ).
<b>SVD</b>	Decomposição em Valores Singulares ( <i>Singular Value Decomposition</i> ).
<b>TRI</b>	Triantereno.
<b>UPLS</b>	Quadrados Mínimos Parciais Desdobrados ( <i>Unfolded Partial Least Squares</i> ).
<b>UV</b>	Ultravioleta.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Perfil das amostras de plasma sanguíneo utilizadas na pesquisa.	<b>22</b>
<b>Tabela 3.2:</b> Concentração dos padrões de AML usados para cada nível de concentração das amostras fortificadas. ....	<b>24</b>
<b>Tabela 3.3:</b> Concentração dos padrões de TRI usados para cada nível de concentração das amostras fortificadas. ....	<b>25</b>
<b>Tabela 3.4:</b> Planejamento do uso das amostras para cada nível de concentração dos analitos e respectivo número de replicatas. ....	<b>26</b>
<b>Tabela 3.5:</b> Descrição dos volumes, concentrações adicionadas e finais de amilorida para o desenvolvimento do método de adição de padrão. ....	<b>29</b>
<b>Tabela 3.6:</b> Descrição dos volumes, concentrações adicionadas e finais de triantereno para o desenvolvimento do método de adição de padrão. ....	<b>29</b>
<b>Tabela 4.1:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo univariado e recuperação média para cada nível de concentração. ....	<b>39</b>
<b>Tabela 4.2:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo PARAFAC e recuperação média para cada nível de concentração. ....	<b>44</b>
<b>Tabela 4.3:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão médios, e coeficiente de determinação de calibração e validação estimados pelo modelo UPLS e recuperação média para cada nível de concentração. ...	<b>48</b>

<b>Tabela 4.4:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão e coeficiente de determinação médios estimados pelos modelos Univariado, PARAFAC e UPLS para o triantereno. ....	<b>49</b>
<b>Tabela 4.5:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo univariado e recuperação média para cada nível de concentração. ....	<b>53</b>
<b>Tabela 4.6:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo PARAFAC e recuperação média para cada nível de concentração. ....	<b>57</b>
<b>Tabela 4.7:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão médios, e coeficiente de determinação de calibração e validação estimados pelo modelo UPLS masculino, e recuperação média para cada nível de concentração. ....	<b>62</b>
<b>Tabela 4.8:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão médios, e coeficiente de determinação de calibração e validação estimados pelo modelo UPLS feminino, e recuperação média para cada nível de concentração. ....	<b>63</b>
<b>Tabela 4.9:</b> Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelos modelos Univariado, PARAFAC e UPLS masculino para a amilorida. ....	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Estrutura química da amilorida.....	<b>4</b>
<b>Figura 2.2:</b> Concentração média de amilorida no plasma em função do tempo decorrido após a administração de uma dose de 10 mg de amilorida. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão (n=8), (adaptado da referência 12).....	<b>5</b>
<b>Figura 2.3:</b> Estrutura química do triantereno. ....	<b>6</b>
<b>Figura 2.4:</b> Concentração média de triantereno em plasma sanguíneo em função do tempo decorrido após administração de uma única dose de 50 mg de triantereno do medicamento em teste e do medicamento referência. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão (n=14), (adaptado da referência 20). ....	<b>7</b>
<b>Figura 2.5:</b> Diagrama de <i>Jablonski</i> (adaptado da referência 27).....	<b>9</b>
<b>Figura 2.6:</b> Efeito da rigidez molecular sobre o rendimento quântico ( $\Phi$ ). <sup>26</sup> ....	<b>10</b>
<b>Figura 2.7:</b> Representação esquemática dos três tipos de dados apresentados. (a) dado de ordem zero – representado por um escalar, (b) dado de primeira ordem – representado por um vetor, (c) dado de segunda ordem – representado por uma matriz. ....	<b>13</b>
<b>Figura 2.8:</b> Gráfico de uma adição de padrão para o caso especial em que o volume final é variável.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.9:</b> Representação da decomposição do cubo <b>X</b> de amostras em F tríades de vetores pesos realizada pelo modelo PARAFAC. ....	<b>16</b>

<b>Figura 2.10:</b> Representação do rearranjo do cubo de dados para análise por UPLS. Um cubo $X(I,J,K)$ é colocado na forma de uma matriz $X(I,JK)$ pela vetorização da matriz de cada uma das amostras $I$ , (adaptado da referência 29).....	<b>19</b>
<b>Figura 3.1:</b> Espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. Fotografia de arquivo da autora. ....	<b>23</b>
<b>Figura 3.2:</b> Amostra de plasma sanguíneo fortificada, sem acetonitrila (A), com acetonitrila antes da centrifugação (B), com acetonitrila depois da centrifugação (C). Fotografias de arquivo da autora.....	<b>27</b>
<b>Figura 3.3:</b> Etapas do procedimento de <i>clean-up</i> . Transferência do plasma fortificado para tubo de centrifuga (A), adição de acetonitrila ao tubo (B), agitação (C), centrifugação (D), retirada da solução incolor obtida (E). Fotografias de arquivo da autora.....	<b>28</b>
<b>Figura 3.4:</b> (A) Procedimento para retirada de plasma sanguíneo da bolsa. (B) Coletor para material perfurocortante Descarpack. Fotografias de arquivo da autora. ....	<b>30</b>
<b>Figura 3.5:</b> Resumo dos procedimentos experimentais.....	<b>31</b>
<b>Figura 4.1:</b> Intensidade de fluorescência de uma amostra de plasma sanguíneo, sem a adição dos fármacos, antes (A e B) e depois (C e D) da etapa de <i>clean-up</i> .....	<b>32</b>
<b>Figura 4.2:</b> Calibração externa de TRI em duas matrizes, solução água/acetonitrila (1:9) (◆) e plasma sanguíneo (■). ....	<b>33</b>
<b>Figura 4.3:</b> Calibração externa de AML em duas matrizes, solução água/acetonitrila (1:9) (◆) e plasma sanguíneo (■). ....	<b>34</b>

<b>Figura 4.4:</b> Espectro de fluorescência (A) e superfície de resposta (B) de um padrão de triantereno 8,5 µg/L.....	<b>35</b>
<b>Figura 4.5:</b> Espectro de fluorescência (A) e superfície de resposta (B) de uma amostra de plasma não fortificada. ....	<b>36</b>
<b>Figura 4.6:</b> Espectros de fluorescência, amostra de plasma não fortificada (A), amostra de plasma fortificada, 9,0 µg/L de triantereno (B).....	<b>37</b>
<b>Figura 4.7:</b> Curva de adição de padrão para uma amostra com 9,0 µg/L de TRI. Onde $V_x$ representa o volume inicial da amostra, $V_s$ o volume de cada adição de padrão, $R$ as intensidades de fluorescência corrigidas e $N$ o número de adições de padrão. ....	<b>38</b>
<b>Figura 4.8:</b> Representação da organização tridimensional dos dados para a amostra de plasma com 9,0 µg/L de triantereno. ....	<b>40</b>
<b>Figura 4.9:</b> Pesos PARAFAC em função da concentração de TRI adicionada (A), espectros de fluorescência deconvoluídos, excitação (B) e emissão (C), obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC para uma matriz de amostra (perfis verde e azul) e para solução padrão (perfil vermelho). ....	<b>42</b>
<b>Figura 4.10:</b> Curva de adição de padrão para uma amostra com 9,0 µg/L de TRI. Onde $V_x$ representa o volume inicial da amostra, $V_s$ o volume de cada adição de padrão, $R$ os pesos do modelo PARAFAC e $N$ o número de adições de padrão. ....	<b>43</b>
<b>Figura 4.11:</b> Gráfico de calibração mista, usando 2 cubos femininos e 2 cubos masculino (branco e nível máximo de concentração – amostra fortificada com 9,0 µg/L de triantereno). ....	<b>45</b>
<b>Figura 4.12:</b> Resíduos de decomposição para o modelo UPLS com 3 variáveis latentes e calibração mista. Onde as amostras de calibração estão representadas pelas bolas em rosa (○), as amostras de validação pelos	

asteriscos em azul (\*) e o valor crítico estimado pelo ruído instrumental pela linha tracejada em vermelho (---). ..... 46

**Figura 4.13:** Concentração de referência versus concentração estimada pelo modelo UPLS a partir da calibração mista. .... 47

**Figura 4.14:** Espectro de fluorescência (A) e superfície de resposta (B) de um padrão de amilorida 15 µg/L..... 50

**Figura 4.15:** Espectros de fluorescência, amostra de plasma não fortificada (A), amostra de plasma fortificada, 15,0 µg/L de amilorida (B). ..... 51

**Figura 4.16:** Curva de adição de padrão para uma amostra com 15,0 µg/L de AML. Onde  $V_x$  representa o volume inicial da amostra,  $V_s$  o volume de cada adição de padrão,  $R$  as intensidades de fluorescência corrigidas e  $N$  o número de adições de padrão. .... 52

**Figura 4.17:** Pesos PARAFAC em função da concentração de AML adicionada (A), espectros de fluorescência deconvoluídos, excitação (B) e emissão (C), obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC para uma matriz de amostra (perfis verde e azul) e para uma matriz de padrão (perfil vermelho). ..... 55

**Figura 4.18:** Curva de adição de padrão para uma amostra com 15,0 µg/L de AML. Onde  $V_x$  representa o volume inicial da amostra,  $V_s$  o volume de cada adição de padrão,  $R$  os pesos do modelo PARAFAC e  $N$  o número de adições de padrão. .... 56

**Figura 4.19:** Gráfico de calibração mista, usando 2 cubos femininos e 2 cubos masculino (branco e nível máximo de concentração – amostra fortificada com 15,0 µg/L de amilorida), 3 variáveis latentes e sem centrar os dados na média. .... 58

**Figura 4.20:** Resíduos de decomposição para o modelo UPLS masculino com 3 variáveis latentes. Onde as amostras de calibração estão representadas

pelas bolas em rosa (○), as amostras de validação pelos asteriscos em azul (✖) e o valor crítico estimado pelo ruído instrumental pela linha tracejada em vermelho (---)..... 59

**Figura 4.21:** Resíduos de decomposição para o modelo UPLS feminino com 3 variáveis latentes. Onde as amostras de calibração estão representadas pelas bolas em rosa (○), as amostras de validação pelos asteriscos em azul (✖) e o valor crítico estimado pelo ruído instrumental pela linha tracejada em vermelho (---). ..... 60

**Figura 4.22:** Concentração de referência versus concentração estimada pelo modelo UPLS masculino. .... 60

**Figura 4.23:** Concentração de referência versus concentração estimada pelo modelo UPLS feminino. .... 61

## **1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

Amilorida e triantereno são fármacos diuréticos utilizados no tratamento de diversas doenças como diabetes insipidus, insuficiência cardíaca congestiva, glaucoma e hipertensão.<sup>1</sup> Por propiciar a perda de líquido do organismo, são também utilizados, de forma indevida, em esportes que classificam os atletas em categorias de peso e por atletas que desejam mascarar a presença de substâncias proibidas na urina.<sup>2,3,4,5</sup>

A determinação desses fármacos em fluidos biológicos se faz necessária em análises clínicas, estudos farmacocinéticos, que visam avaliar a quantidade de fármaco no organismo após alguns períodos de tempo da ingestão, e em controle de doping.

A maioria dos métodos descritos na literatura para a determinação de triantereno e amilorida que apresentam sensibilidade suficiente para determinar esses analitos em baixas concentrações utilizam técnicas de cromatografia aliadas a preparo de amostra moroso, trabalhoso ou que envolva diversas etapas, o que pode aumentar os erros e a incerteza das determinações. Além disso, a maioria dos trabalhos aborda a determinação desses analitos em urina humana ou plasma sanguíneo animal, sendo poucos os trabalhos que envolvem a determinação desses fármacos em plasma sanguíneo humano.

Uma alternativa financeiramente mais viável às técnicas de separação é a utilização de espectrofluorímetros. Como os dois analitos de interesse apresentam fluorescência natural, a determinação pode ser realizada de forma direta, sem a necessidade de pré-tratamentos de amostra, como por exemplo, a derivatização.

O grande problema da determinação de um analito por fluorescência em amostras biológicas como urina e plasma, é que essas matrizes também apresentam espectros de fluorescência, que podem se sobrepor ao espectro do analito. Além disso, é comum a observação de efeito de matriz. Dessa forma, esses fatores podem inviabilizar a determinação direta desses fármacos em plasma.

A quimiometria tem sido uma alternativa cada vez mais empregada para resolver esse tipo de problema. Além de ajudar na determinação de um analito

quando existe sobreposição do sinal do analito com interferentes, a sua utilização pode dispensar os preparos de amostras mais descritos na literatura, a extração e a pré-concentração do analito.

A calibração de segunda ordem é uma ferramenta quimiométrica muito empregada em dados espectrais de fluorescência molecular em função da trilinearidade desses dados. Esse tipo de calibração apresenta a chamada “vantagem de segunda ordem” (capacidade do modelo em determinar a espécie de interesse na presença de interferentes, mesmo que esses não estejam incluídos no conjunto de amostras de calibração) característica bastante interessante para determinações em fluidos biológicos, onde a variação da matriz é considerável de indivíduo para indivíduo.

Tendo em vista a importância da determinação dos analitos amilorida e triantereno em seres humanos e a ausência de estudos que verifiquem a possibilidade da determinação desses fármacos diretamente por espectrofluorimetria empregando calibração de segunda ordem, a presente dissertação de mestrado tem como objetivo geral determinar amilorida e triantereno, em baixas concentrações, em plasma sanguíneo humano por espectrofluorimetria e calibração de segunda ordem, possuindo ainda os seguintes objetivos específicos:

- i. Otimizar os parâmetros experimentais para determinação de amilorida e triantereno, separadamente, em amostras de plasma sanguíneo.
- ii. Otimizar as condições e quantificar os analitos de interesse empregando os modelos univariado e multivariados propostos.
- iii. Determinar amilorida em amostras de plasma sanguíneo fortificadas com concentrações próximas às concentrações reais desse fármaco no organismo.
- iv. Determinar triantereno em amostras de plasma sanguíneo fortificadas com concentrações próximas às concentrações reais desse fármaco no organismo.
- v. Comparar os resultados obtidos com os modelos de regressão e procedimentos realizados e sugerir um procedimento confiável para a determinação dos fármacos em plasma.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

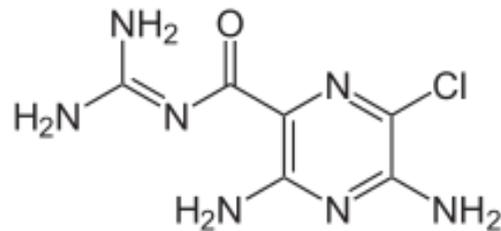
Diuréticos são fármacos que atuam no organismo, principalmente nos rins, provocando um aumento da produção e do fluxo de urina por interferirem na reabsorção de sódio e outros íons a partir do lúmen e dos néfrons. Esse aumento faz com que a excreção de eletrólitos (em particular sódio e cloro) e água se eleve. Amilorida (AML) e triantereno (TRI) são dois fármacos diuréticos classificados como poupadores de potássio.<sup>1</sup>

Tal propriedade farmacológica dos diuréticos faz com que esses fármacos sejam amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças, tais como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes insipidus, glaucoma e outras.<sup>1</sup> São também utilizados - de forma indevida - em esportes que classificam os atletas por categorias de peso<sup>2,3,4,5</sup> como judô, caratê, boxe, jiu-jitsu e artes marciais mistas (*Mixed Martial Arts*, MMA), quando esses desejam diminuir seu peso corporal. Não há razões médicas que justifiquem o uso de diuréticos para a perda rápida de peso em esportes, entretanto, esse tipo de abuso pode causar grandes riscos à saúde e efeitos secundários indesejáveis.<sup>5</sup> Outro uso indevido dos diuréticos está relacionado ao doping, esportistas que fazem uso de substâncias proibidas ingerem esse tipo de fármaco para aumentar a produção de urina e conseqüentemente diminuir as concentrações de substâncias proibidas nas excreções, reduzindo a possibilidade de serem detectadas.<sup>2,3,4,5</sup> Por essas razões, os diuréticos foram banidos dos esportes pela Comissão Médica do Comitê Olímpico Internacional (*International Olympic Committee*, IOC), uma comissão criada em 1967 para lidar com o crescente problema de doping nas competições esportivas e que visa proteger a saúde dos atletas.<sup>6</sup>

### **2.1 Determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo**

A amilorida (N-amidino-3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamida), representada na Figura 2.1, atua no organismo interferindo no processo de trocas catiônicas no túbulo distal,<sup>1</sup> inibindo a reabsorção de sódio e a excreção

de potássio.<sup>1,7</sup> É utilizada no tratamento de diversas doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e no tratamento da hipocalemia (quando a concentração de potássio no sangue está baixa devido a sua elevada excreção, que pode ocorrer tanto pela via renal, como pela via gastrointestinal).<sup>8</sup>



**Figura 2.1:** Estrutura química da amilorida.

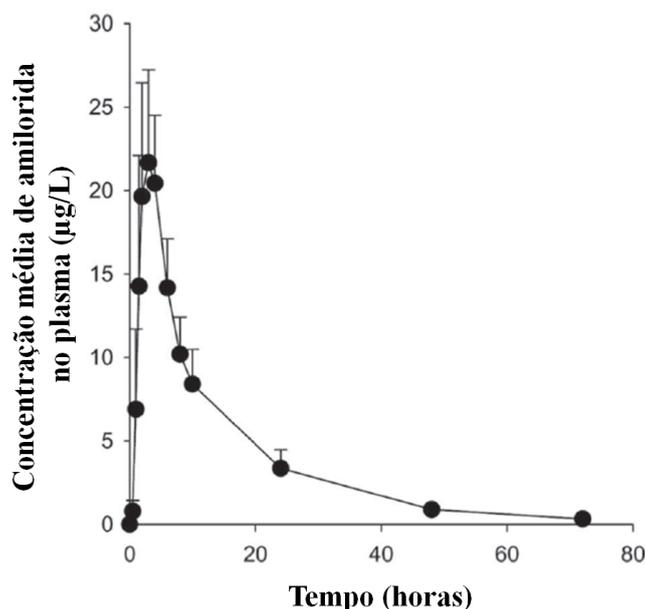
Embora a amilorida seja utilizada clinicamente desde 1965,<sup>9</sup> o primeiro método suficientemente sensível para estudar sua farmacocinética<sup>1</sup> foi publicado somente oito anos depois, em 1973.<sup>10</sup> A farmacocinética desse fármaco é pouco documentada devido à falta de métodos analíticos sensíveis e específicos para a sua determinação em fluidos biológicos.<sup>11,12</sup> A literatura reporta alguns estudos de farmacocinética que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) devido sua sensibilidade.<sup>12</sup> Segundo a literatura, a concentração máxima de amilorida no sangue é atingida 4 horas após sua administração oral, a taxa de absorção varia de 90 % a 95 % da dose ingerida e sua meia vida no organismo está entre 10 e 14 horas; sua margem terapêutica<sup>11</sup> é baixa, variando entre 0,5 e 25 µg/L,<sup>11,12</sup> e a dose diária de amilorida varia entre 5 e 10 mg.<sup>1</sup>

Myung e colaboradores<sup>12</sup> desenvolveram um método para determinação de amilorida e estudo de sua farmacocinética utilizando HPLC acoplado a detector ultravioleta (UV). A Figura 2.2 apresenta um gráfico da concentração de amilorida em plasma humano em função do tempo decorrido após a

<sup>1</sup> A farmacocinética estuda a atividade do fármaco no interior do organismo a partir dos parâmetros de velocidade de absorção, distribuição e eliminação da droga e de seus metabólitos. Os conhecimentos de farmacocinética ajudam a adequar posologia, via de administração e intervalo entre cada dose, visando melhorar o resultado terapêutico e, ao mesmo tempo, reduzir a probabilidade de desenvolver efeitos tóxicos potenciais. ([http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo3/farmacocinetica.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/farmacocinetica.htm), acessado em outubro de 2013).

<sup>11</sup> Intervalo (ou faixa) entre a dose eficaz mínima e a dose máxima permitida. Corresponde a uma faixa plasmática aceitável na qual os resultados terapêuticos são positivos.

ingestão de uma dose de 10 mg de AML, onde pode-se constatar o intervalo restrito/estrito de concentração em que a AML ocorre no plasma.



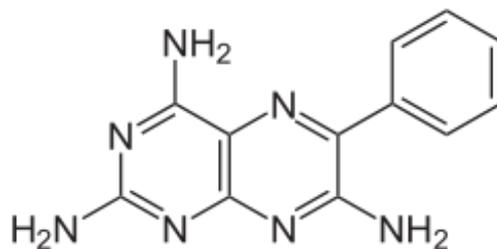
**Figura 2.2:** Concentração média de amilorida no plasma em função do tempo decorrido após a administração de uma dose de 10 mg de amilorida. Os resultados apresentam a média + desvio padrão (n=8), (adaptado da referência 12).

Alguns estudos sobre a determinação de amilorida em plasma sanguíneo humano têm sido publicados. Devido à sua concentração no sangue ser muito baixa a maioria utiliza técnicas cromatográficas de análise, como HPLC. Entre esses estudos, observa-se a utilização de diferentes detectores, como espectrofotométricos por ultravioleta<sup>7,13</sup> e sem arranjo de diodos,<sup>12</sup> espectrofluorimétricos,<sup>10,11,14</sup> e a espectrometria de massas (*Mass Spectrometer/Mass Spectrometer*, MS/MS) com ionização por eletrospray.<sup>15,16</sup> Entre outros métodos de análise que não utilizam cromatografia pode-se ressaltar a voltametria com eletrodo de mercúrio,<sup>2</sup> determinação espectrofluorimétrica em fluxo,<sup>8</sup> empregando voltametria de pulso diferencial<sup>17</sup> e eletroforese capilar.<sup>18</sup>

Segundo a farmacopeia brasileira<sup>19</sup> o método indicado para determinação quantitativa de comprimidos de amilorida em associação com hidroclorotiazida utiliza HPLC com detector UV em 286 nm.

Assim como a amilorida, o triantereno (2,4,6-triamino-6-fenilpteridina), representado na Figura 2.3, também é um diurético poupador de potássio e

atua no organismo da mesma forma. É utilizado no tratamento de hipertensão e edemas, e por evitar a excreção de potássio, o uso de triantereno sem acompanhamento médico adequado pode causar hipercalemia<sup>1</sup> (excesso de potássio no sangue).



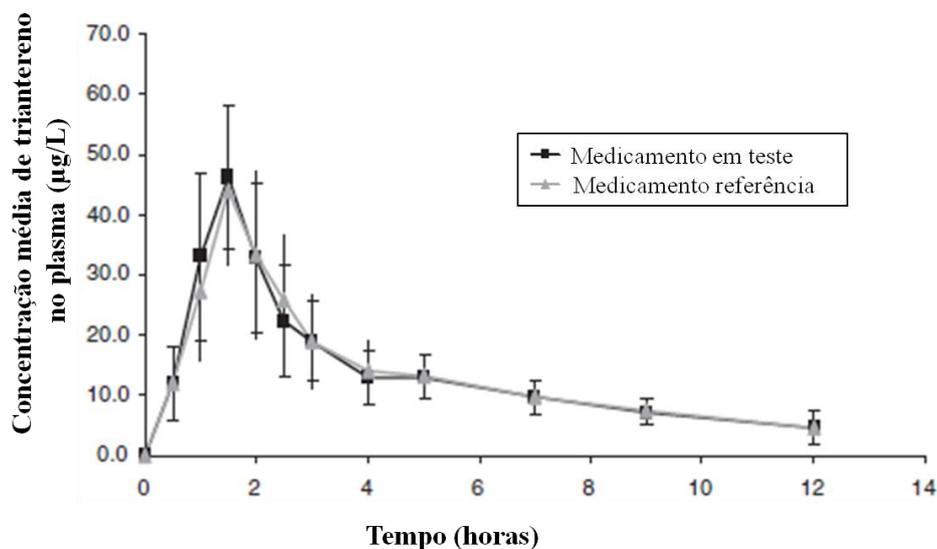
**Figura 2.3:** Estrutura química do triantereno.

O triantereno é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal,<sup>20</sup> alguns autores sugerem que sua absorção seja de aproximadamente 50 % e que o efeito diurético ocorra em 30 minutos, sendo que sua concentração máxima no sangue é atingida 6 horas após sua administração oral, que costuma ser de 100 mg/dia podendo ser menor com o passar do tratamento.<sup>1</sup> Outros autores sugerem que a absorção varie de 30 % a 70 %, atingindo sua concentração máxima no sangue entre 2 e 4 horas com meia vida no sangue variando entre 1,5 e 2 horas.<sup>20</sup>

Hamidi e colaboradores<sup>20</sup> apresentaram um estudo sobre a determinação de triantereno em amostras de plasma, com o objetivo de avaliar a bioequivalência<sup>III</sup> de um medicamento genérico de triantereno em associação com hidroclorotiazida, o método proposto utiliza HPLC em fase reversa e detecção UV. A Figura 2.4 apresenta um gráfico da concentração média de triantereno no plasma em função do tempo decorrido após a administração de uma dose de 50 mg de TRI, para o medicamento em teste e para o medicamento referência.

<sup>III</sup> “Consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio (s) ativo (s), e que tenham comparável biodisponibilidade<sup>a</sup>, quando estudados sob um mesmo desenho experimental”, definição dada pela Lei nº 9.787 de 1999.

<sup>a</sup> “Indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina”, definição dada pela Lei nº 9.787 de 1999.



**Figura 2.4:** Concentração média de triantereno em plasma sanguíneo em função do tempo decorrido após administração de uma única dose de 50 mg de triantereno do medicamento em teste e do medicamento referência. Os resultados apresentam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=14$ ), (adaptado da referência 20).

Na literatura química, bioquímica e farmacêutica pode-se encontrar diversos trabalhos sobre a determinação de triantereno, entretanto a maioria trata da determinação desse fármaco em medicamentos ou em amostras de urina. São poucas as publicações encontradas sobre a determinação de triantereno em plasma sanguíneo. Entre essas pode-se observar a utilização de diversas técnicas como espectroscopia UV,<sup>4</sup> HPLC com detector UV<sup>20</sup> e detector de fluorescência,<sup>21,22,23</sup> e determinação espectrofluorimétrica em fluxo.<sup>24,25</sup> A farmacopeia brasileira<sup>19</sup> não estabelece nenhum método referência para determinação de triantereno.

## 2.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A fluorescência é um processo fotoluminescente no qual as moléculas absorvem energia na forma de radiação eletromagnética, ao relaxarem para o estado fundamental elas liberam o excesso de energia absorvido na forma de fótons.<sup>26</sup>

Entre as principais vantagens da fluorescência molecular estão a sua sensibilidade, que chega a ser até três ordens de magnitude maior que as

encontradas na espectroscopia de absorção, e sua ampla faixa linear de concentração, que também é significativamente maior que nos métodos de absorção. Mesmo com essas vantagens desejáveis em análises químicas e biológicas os métodos de fluorescência são menos empregados que os de absorção em razão do número limitado de sistemas fluorescentes. Além disso, a fluorescência está muito mais sujeita às condições experimentais que os métodos de absorção, por isso são frequentemente combinados com técnicas de separação, como eletroforese e cromatografia.<sup>27</sup>

### 2.2.1 Teoria da fluorescência molecular

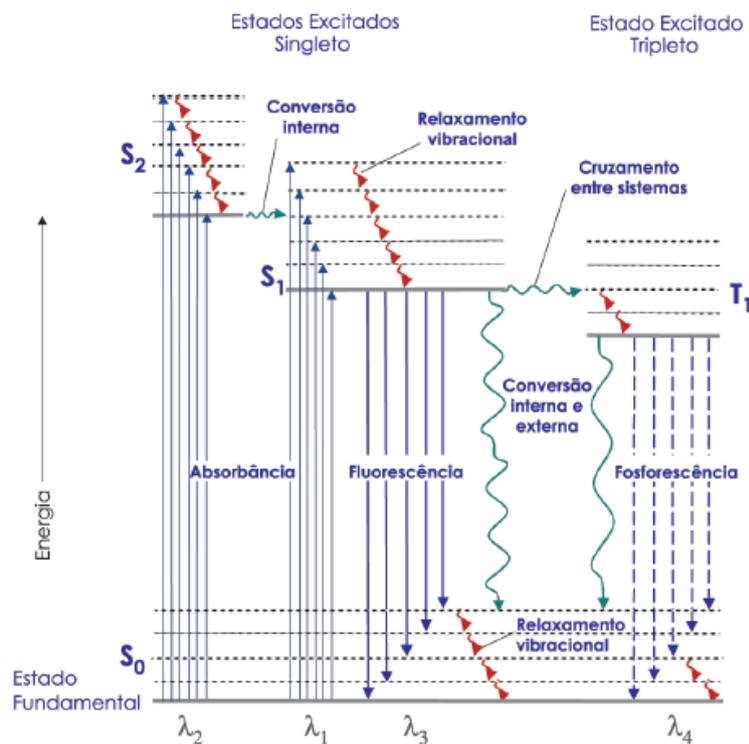
Para medir a fluorescência de uma amostra de interesse, esta é excitada em determinado comprimento de onda, chamado de comprimento de onda de excitação ou de absorção. A molécula fluorescente presente na amostra absorve a radiação, ficando em um estado excitado singlete (estado eletrônico de maior energia), e ao voltar para seu estado fundamental singlete emite radiação eletromagnética em um comprimento de onda mais alto, denominado comprimento de onda de emissão. O processo de emissão de curta duração é chamado de fluorescência, enquanto o de longa duração é chamado de fosforescência, sendo o segundo menos utilizado em análises químicas que o primeiro.<sup>26</sup>

A Figura 2.5 apresenta um diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente, chamado de *diagrama de Jablonski*. O diagrama mostra os processos físico-químicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia entre os comprimentos de onda do ultravioleta e visível.  $S_0$  é o estado eletrônico fundamental<sup>IV</sup>,  $S_1$ , e  $T_1$  são os estados excitados singlete<sup>V</sup> e tripleto<sup>VI</sup> de menor energia, respectivamente.  $S_2$  é um segundo estado excitado singlete. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas as transições não-radiativas (que não emitem radiação).<sup>27,28</sup>

<sup>IV</sup> Estado de menor energia, onde os spins eletrônicos estão emparelhados.

<sup>V</sup> Estado eletrônico excitado onde não ocorre mudança na orientação do spin do elétron excitado.

<sup>VI</sup> Estado eletrônico excitado onde ocorre mudança na orientação do spin do elétron excitado.



**Figura 2.5:** Diagrama de *Jablonski* (adaptado da referência 27).

Como mostrado na Figura 2.5, a combinação de diversas etapas mecânicas pode levar uma molécula excitada de volta ao seu estado fundamental, a trajetória favorecida será a que a apresentar menor tempo de vida do estado excitado. Assim, a desativação por fluorescência só ocorrerá se tiver uma constante de velocidade mais favorável que a dos processos não-radiativos.

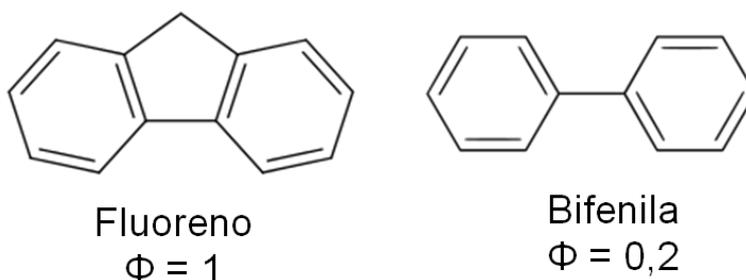
### 2.2.2 Variáveis que afetam a fluorescência

Todas as moléculas absorventes apresentam potencial para fluorescência,<sup>26</sup> desde que as etapas de relaxações não-radiativas sejam menos favorecidas em relação aos processos envolvendo fótons. Entretanto, para a maioria das moléculas a perda da energia absorvida é favorecida por processos não-radiativos. Como os estados excitados são susceptíveis a desativações, os métodos luminescentes quantitativos estão sujeitos a vários efeitos que afetam a fluorescência, como a estrutura da molécula, a rigidez estrutural, a temperatura, e o solvente, o efeito de supressão, entre outros.<sup>27</sup>

Compostos que contêm anéis aromáticos com transições de baixa energia apresentam emissão de fluorescência mais intensa. Compostos

contendo duplas ligações altamente conjugadas ou estruturas alifáticas e carbonilas alicíclicas também podem apresentar fluorescência, mas em menor número que em sistemas aromáticos.<sup>27</sup>

Moléculas mais rígidas apresentam maior fluorescência que moléculas com menor rigidez.<sup>26</sup> O aumento da rigidez diminui a velocidade das relaxações não-radiativas, de modo que as relaxações por emissão de fluorescência tenham tempo de ocorrer, já a falta de rigidez em uma molécula provavelmente aumenta a velocidade de conversão interna (relaxação não radiativa). Um exemplo clássico do efeito da rigidez estrutural na fluorescência de um composto é expresso pela diferença da eficiência quântica<sup>VII</sup> do fluoreno e da bifenila, representados na Figura 2.6.



**Figura 2.6:** Efeito da rigidez molecular sobre o rendimento quântico ( $\Phi$ ).<sup>26</sup>

Um aumento da temperatura aumenta a frequência de colisões em uma molécula e conseqüentemente eleva a probabilidade de desativação por conversão interna, o que diminui a eficiência quântica de fluorescência. Um decréscimo da viscosidade do solvente também aumenta a mobilidade das moléculas e por isso leva ao mesmo efeito.<sup>26</sup>

O termo supressão geralmente refere-se à energia não-radiativa transferida das espécies excitadas para outras moléculas. Para ocorrer o efeito de supressão o agente supressor deve estar em contato com a espécie excitada e em concentração suficientemente alta para que haja uma alta probabilidade de sua colisão com a espécie excitada durante o tempo de vida do estado excitado. A presença de oxigênio dissolvido geralmente reduz a intensidade de fluorescência de uma solução.<sup>27</sup>

<sup>VII</sup> A eficiência quântica é descrita pelo rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi$ ), que é a razão entre o número de moléculas que fluorescem e o número total de moléculas excitadas.

Diversos fármacos apresentam fluorescência natural, além disso, alguns também reagem quimicamente formando produtos fluorescentes. Por ser uma técnica sensível e adequada para determinações quantitativas, diversos trabalhos envolvendo a determinação de fármacos por fotoluminescência têm sido publicados. Sotomayor e colaboradores<sup>28</sup> apresentam uma revisão sobre trabalhos que envolvem a determinação de fármacos baseados em fenômenos fotoluminescentes e quimioluminescentes.

### 2.3 Métodos univariado e multivariados

Os dados obtidos em análises químicas geralmente são divididos em dados de ordem zero, primeira, segunda, terceira ordem ou ordem superior a três, sendo os dois últimos os menos encontrados na literatura.<sup>29</sup> A classificação dos dados depende da instrumentação analítica utilizada na sua obtenção, e a calibração depende do tipo de dado obtido ou utilizado. Dados univariados, ou de ordem zero, requerem calibração univariada; a calibração de primeira ordem é usada para dados de primeira ordem e assim por diante.

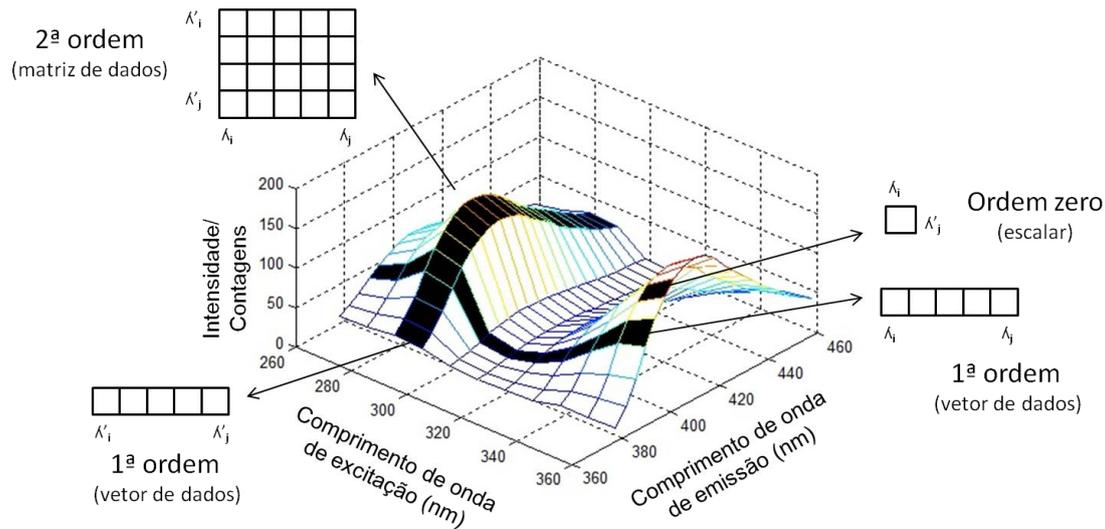
Os dados de ordem zero são aqueles em que a resposta, ou sinal analítico, é dado por apenas um número ou escalar. Como exemplo podemos citar os dados obtidos por medidas de pH, fotométricas, ponteciométricas e espectrométricas onde um único ponto é monitorado. Pela simplicidade, em relação as outras, a calibração univariada é a mais utilizada em análises de rotina, no entanto não é suficiente quando há interferentes capazes de impedir a determinação da propriedade de interesse.<sup>30</sup>

Os dados de primeira ordem são constituídos por um vetor, que considerando diversas amostras são organizados em uma matriz de dados, portanto, esses dados são ditos bilineares. Como exemplo, podemos citar dados espectrais de emissão/excitação obtidos por diversos equipamentos como espectrômetros UV-visível, infravermelho, infravermelho próximo (*Near-Infrared*, NIR) e emissão de fluorescência em espectrofluorímetros. Esses métodos possibilitam determinações mesmo na presença de interferentes, desde que esses estejam presentes também nas amostras de calibração. Entre os modelos de calibração multivariada utilizados para dados de primeira ordem têm-se a Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares*,

PLS), Regressão Linear Múltipla (*Multiple Linear Regression*, MLR) e a Regressão por Componentes Principais (*Principal Componentes Regression*, PCR).<sup>31</sup> Uma desvantagem da calibração de primeira ordem, em alguns casos, é a necessidade de um conjunto muito grande de amostras de calibração para o desenvolvimento do modelo.

Os dados de segunda ordem são constituídos por uma matriz, que são organizadas em um cubo de dados (no caso de duas ou mais matrizes arranjadas conjuntamente) e são chamados de dados trilineares. Podem ser gerados por diversas técnicas, como excitação e emissão de fluorescência molecular (*Excitation Emission Fluorescence*, EEF), análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA) e injeção sequencial (*Sequential Injection Analysis*, SIA) em sistemas onde a evolução da reação é acompanhada em diferentes comprimentos de onda e em estudos de cinética reacional. E várias técnicas cromatográficas como HPLC com detecção por arranjo de diodos (*Diode Array Detection*, DAD), DAD-MS, MS, cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC) com detector por espectrometria de massas.<sup>32</sup> Entre os algoritmos de calibração utilizados para dados de segunda ordem pode-se citar a Análises de Fatores Paralelos (*Parallel Factor Analysis*, PARAFAC), Quadrados Mínimos Bilineares (*Bilinear Least Squares*, BLLS) com Bilinearização Residual (*Residual Bilinearization*, RBL), Resolução de Curvas Multivariadas - Quadrados Mínimos Alternantes (*Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Square*, MCR-ALS), Quadrados Mínimos Parciais Desdobrados (*Unfolded Partial Least Squares*, UPLS) com RBL, entre outros.<sup>33</sup> Esses métodos apresentam duas grandes vantagens em relação aos anteriores, a chamada “vantagem de segunda ordem”, que é a capacidade do modelo em determinar a espécie de interesse na presença de interferentes, mesmo que esses não estejam incluídos no conjunto de amostras de calibração<sup>34</sup> e a necessidade de um número sensivelmente menor de amostras de calibração que os modelos de primeira ordem e aproximadamente igual ao número de amostras de calibração usada em modelos univariados.<sup>30</sup>

Para facilitar a compreensão, a Figura 2.7 mostra uma representação esquemática dos três tipos de dados abordados, a imagem se refere a um sistema que adquire espectros de emissão e excitação.



**Figura 2.7:** Representação esquemática dos três tipos de dados apresentados. (a) dado de ordem zero – representado por um escalar, (b) dado de primeira ordem – representado por um vetor, (c) dado de segunda ordem – representado por uma matriz.

Nos últimos anos as publicações que envolvem a utilização de calibração multivariada têm sido crescentes. Um dos fatores que possibilitou o crescente uso desse tipo de calibração foi a melhora das tecnologias, inclusive computacionais, possibilitando que os algoritmos sejam executados rapidamente em computadores pessoais. Sena e colaboradores<sup>29</sup> também chamaram a atenção para a colaboração de Bro na difusão dos métodos de segunda ordem; sua tese de doutorado<sup>35</sup> gerou diversos artigos científicos didáticos e claros quanto aos modelos e algoritmos utilizados, além disso, apresentou várias aplicações dos mesmos. Outra grande contribuição foi o fato do autor disponibilizar gratuitamente os algoritmos utilizados na forma de pacotes (*toolboxes*)<sup>36</sup> elaborados em ambiente Matlab® (*Mathworks*).

Diversas aplicações desses modelos nas áreas farmacêuticas e biomédicas podem ser encontradas na literatura, sendo que um bom panorama dessas aplicações pode ser percebido no trabalho de revisão de Escandar e colaboradores.<sup>31</sup>

### 2.3.1 Regressão univariada e adição de padrão

A calibração univariada é usada para dados de ordem zero, esse tipo de calibração é usado em análises onde se dispõe de um sinal seletivo, em que o

sinal instrumental refere-se exclusivamente ao analito de interesse. Geralmente etapas prévias de extração ou pré-concentração do analito são requeridas para eliminar possíveis interferentes. O caso mais comum de calibração univariada pode ser descrito pela Equação (1), onde há uma relação linear entre o nível de analito ( $x_i$ ) e o sinal instrumental ( $y_i$ );  $b$  representa o intersepto (valor de  $y_i$  quando  $x_i$  for zero),  $m$  a inclinação da reta e,  $e_i$  o erro associado a regressão.<sup>26,37</sup>

$$y_i = m \cdot x_i + b + e_i \quad (1)$$

A adição de padrão é uma estratégia utilizada para análises complexas, nas quais os efeitos de matriz são significativos. Efeitos de matriz ocorrem quando algum componente presente na amostra afeta o sinal do analito de interesse.

O método da adição de padrão requer duas condições para o sucesso da calibração:<sup>38</sup>

- Que a resposta instrumental responda linearmente ao aumento da concentração;
- Que a resposta instrumental seja zero quando a concentração do analito for igual a zero.

A forma mais simples de adição de padrão é através da fortificação da amostra, onde alíquotas do padrão, em concentrações crescentes, são adicionadas a alíquotas da amostra, as medidas instrumentais são realizadas na amostra original e nas amostras fortificadas.<sup>27</sup> A partir dos dados obtidos é traçado um gráfico da concentração de padrão adicionado em função do sinal instrumental, considera-se que a amostra original tenha concentração de analito adicionada igual a zero. Para quantificação do analito na amostra original, a reta obtida é extrapolada até tocar o eixo x (quando y é igual a zero), o que matematicamente significa igualar y a zero na equação da reta obtida e calcular o valor de x.

Na maioria das versões do método de adição de padrão, a matriz da amostra permanece praticamente inalterada<sup>27</sup>. Bader<sup>39</sup> descreveu nove casos diferentes para aplicação da adição de padrão. Aqui será destacado o cálculo para concentração inicial da amostra no caso em que a adição de padrão é

realizada em volume final variável; o que é especialmente usado quando se tem um volume pequeno de amostra. Segundo o autor, a resposta instrumental analítica ( $R_n$ ) é dada pela Equação (2), onde  $V_x$  é o volume inicial da amostra,  $V_s$  o volume de cada adição de padrão,  $N$  o número de adições de padrão,  $k$  uma constante de proporcionalidade,  $C_x$  a concentração inicial da amostra e  $C_s$  a concentração da solução padrão.

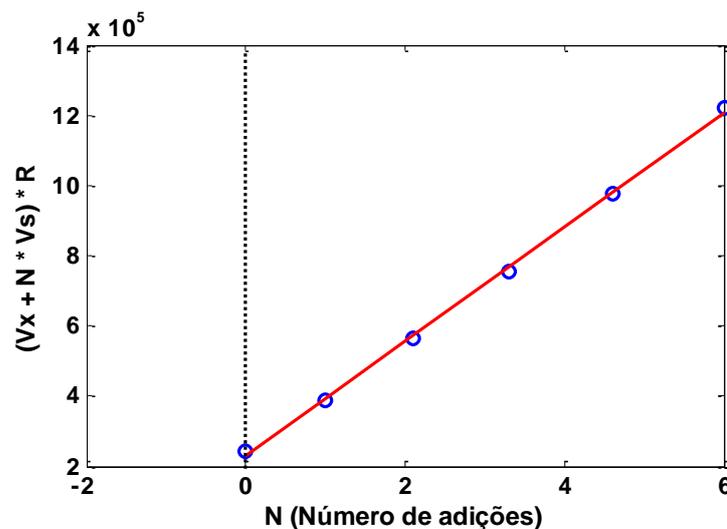
$$R_n = k \left[ \frac{V_x C_x}{V_x + N V_s} + \frac{N V_s C_s}{V_x + N V_s} \right] \quad (2)$$

ou,

$$(V_x + N V_s) R_n = k V_x C_x + N k V_s C_s \quad (3)$$

Plotando um gráfico de  $(V_x + N V_s) R_n$  em função de  $N$ , como o representado na Figura 2.8, é obtida uma reta com coeficiente linear  $\alpha = k V_x C_x$  e coeficiente angular  $\beta = k V_s C_s$ . Reescrevendo  $k$  em função de  $\beta$  ( $k = \beta / (V_s C_s)$ ) e substituído  $k$  em  $\alpha$  ( $\alpha = k V_x C_x$ ), temos a Equação 4, a partir da qual é possível calcular a concentração inicial do analito na amostra.

$$C_x = \frac{\alpha V_s C_s}{\beta V_x} \quad (4)$$



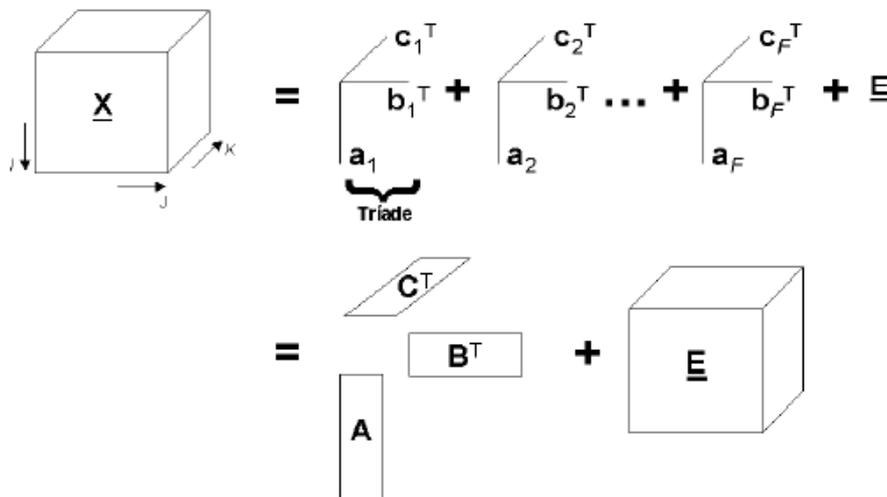
**Figura 2.8:** Gráfico de uma adição de padrão para o caso especial em que o volume final é variável.

### 2.3.2 Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC)

Como já abordado, os modelos utilizados para dados de segunda ordem devem ser organizados em forma de um cubo de dimensão (I, J, K) ou uma matriz, onde I é o número de amostras, J o número de variáveis da primeira e K o número de variáveis da segunda dimensão.

O modelo PARAFAC realiza a decomposição do cubo  $\underline{X}$  (I, J, K)<sup>viii</sup> em três matrizes de pesos, são elas  $\mathbf{A}$  (I, F),  $\mathbf{B}$  (J, F) e  $\mathbf{C}$  (K, F), onde as matrizes de pesos  $\mathbf{A}$ ,  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$  são os perfis de cada componente em cada dimensão e F é o número de componentes, ou fatores, do modelo.<sup>30</sup> Essa decomposição pode ser matematicamente representada pela Equação (5) e esquematicamente pela Figura 2.9.<sup>29</sup>

$$X_{I,J,K} = \sum_{i=1}^F A_{I,F} B_{J,F} C_{K,F} + e_{I,J,K} \quad (5)$$



**Figura 2.9:** Representação da decomposição do cubo  $\underline{X}$  de amostras em F triádes de vetores pesos realizada pelo modelo PARAFAC.

Para dados de fluorescência, na Equação (5), podemos dizer que  $X_{I,J,K}$  representa a intensidade de fluorescência medida para a i-ésima amostra nos

<sup>viii</sup> De acordo com a simbologia utilizada em álgebra linear, letras maiúsculas em negrito e sublinhadas representam cubos de dados, letras maiúsculas em negrito representam matrizes, letras minúsculas em negrito representam vetores e por fim, letras minúsculas ou maiúsculas normais representam escalares.

comprimentos de onda de excitação (J) e de emissão (K),  $A_{I,F}$  é a intensidade relativa do f-ésimo fluoróforo no comprimento de onda de excitação (J),  $C_{K,F}$  é o coeficiente de emissão relativa do f-ésimo fluoróforo no comprimento de onda de emissão (K), e  $e_{I,J,K}$  representa os resíduos.<sup>38</sup>

O modelo PARAFAC é definido por propriedades específicas (especificações do modelo), como a base estrutural dos dados, o número de fatores (ou componentes), o algoritmo de inicialização do modelo e as restrições impostas, a forma como os perfis de cada espécie são identificados e o modelo de regressão construído para quantificar o analito de interesse.

A base estrutural dos dados requer que os mesmos sejam trilineares. Satisfeita essa condição o PARAFAC apresenta uma propriedade de grande importância – denominada, em inglês, por *uniquess* – o que garante ao PARAFAC uma solução única, em outras palavras, podemos dizer que o modelo estimado não poderá sofrer rotações sem perdas de ajuste.<sup>29,40</sup> Na análise de dados espectrofluorimétricos é importante que a resposta espectral dos espalhamentos Rayleigh e Raman não estejam presentes no conjunto de dados a ser analisado, porque esses espalhamentos não são trilineares.

Não há uma forma absoluta para escolher o número de fatores a ser usado no modelo, essa escolha pode ser feita a partir do conhecimento do número de espécies presentes na amostra, baseada na variância explicada pelo modelo, por método de validação cruzada ou pelo parâmetro de Consistência Trilinear (*Core Consistency Diagnostic*, CORCONDIA).<sup>30,40</sup> Valor de CORCONDIA superior a 90 % indica boa estimativa do modelo PARAFAC, em torno de 50 % indica deficiência de trilinearidade e valores próximo de zero ou negativos indicam inconsistência trilinear. O parâmetro CORCONDIA indica sobre-ajuste, mas não sub-ajuste, um modelo PARAFAC estimado com menos números de componentes que o real terá CORCONDIA próximo de 100 %, por isso um modelo PARAFAC é construído com um número crescente de componentes, sendo este parâmetro determinado em cada modelo, quando o valor de CORCONDIA cai de próximo a 100 % (para F componentes) para próximo a 50 % (quando se tem F + 1 componentes), escolhe-se o número de componentes como igual a F.<sup>29,30</sup>

O algoritmo de otimização mais usado para resolução do PARAFAC é o dos Quadrados Mínimos Alternantes (*Alternating Least Square, ALS*), o qual a partir de uma estimativa inicial dos perfis de duas dimensões estima-se o perfil da terceira dimensão. A partir desse novo perfil estimado o algoritmo segue iterativamente até atingir um critério de convergência definido, que pode ser um número determinado de iterações ou até que a falta de ajuste entre duas iterações consecutivas atinja um mínimo estabelecido (normalmente valores em torno de  $10^{-6}$ ). Para facilitar a compreensão do algoritmo podemos descrever os seguintes passos:<sup>29,40</sup>

- (1) Decida o número de fatores,  $F$ ;
- (2) Inicie  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$ ;
- (3) Estime  $\mathbf{A}$  por um ajuste de mínimos quadrados a partir de  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$ .
- (4) Estime  $\mathbf{B}$  de maneira análoga;
- (5) Estime  $\mathbf{C}$  de maneira análoga;
- (6) Retorne ao passo (2) até que a convergência do modelo.

A estimativa inicial necessária para o ALS, estimativas de  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$ , podem ser obtidas usando-se valores aleatórios, estimativas obtidas a partir de uma decomposição de dados conhecidos ou a partir de dois métodos descritos na literatura, a Decomposição em Valores Singulares (*Singular Value Decomposition, SVD*) e a Decomposição Trilinear Direta (*Direct Trilinear Decomposition, DTLD*).<sup>30</sup>

Algumas restrições podem ser impostas para melhorar as soluções do algoritmo ALS. As restrições mais comuns são ortogonalidade; a unimodalidade, o que requer perfis com apenas um máximo; e a não-negatividade, que não permite que os perfis obtidos assumam valores negativos. Essa última restrição é especialmente usada na resolução de dados espectrais, visto que espectros negativos não possuem significado físico. É importante ressaltar que modelos com restrições apresentam falta de ajuste ligeiramente superior em relação a modelos sem restrições, mas a mesma é compensada pela obtenção de modelos mais realistas e mais fáceis de interpretar.<sup>29,30,40</sup>

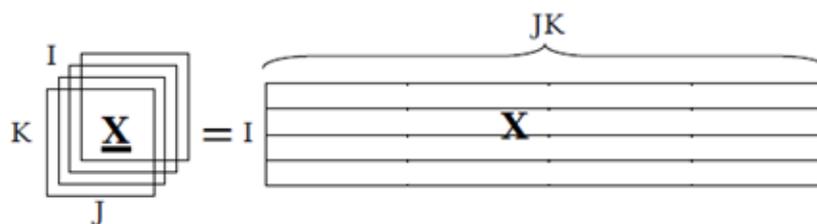
Após a obtenção de  $\mathbf{A}$ ,  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$ , o perfil do componente de interesse pode ser identificado a partir da comparação dos perfis obtidos com espectros

conhecidos obtidos em padrões ou relatados na literatura. Caso essa identificação não seja possível, uma estratégia a ser usada é plotar os pesos da coluna **A** em função de concentrações conhecidas e crescentes da espécie de interesse, o gráfico do componente que representa a espécie de interesse deverá apresentar o perfil crescente das concentrações.<sup>30</sup>

Para a utilização do PARAFAC as amostras de concentrações conhecidas (conjunto de calibração) e desconhecidas, presentes ou não no conjunto de calibração, são decompostas simultaneamente. Os pesos obtidos para a espécie de interesse são então plotados em função de concentrações conhecidas do conjunto de calibração através de uma regressão linear, a partir da qual é possível determinar a concentração da espécie de interesse na amostra.<sup>29</sup>

### 2.3.3 Quadrados Mínimos Parciais Desdobrados (UPLS)

O modelo de Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) é o modelo de primeira ordem mais utilizado e descrito na literatura. A primeira tentativa de extensão desse modelo para utilização com dados de segunda ordem foi proposta em 1987 por Wold e colaboradores,<sup>41</sup> os autores propõem que as matrizes de dados sejam vetorizadas como mostrado na Figura 2.10, e o modelo PLS seja usado.



**Figura 2.10:** Representação do rearranjo do cubo de dados para análise por UPLS. Um cubo  $\underline{X}(I,J,K)$  é colocado na forma de uma matriz  $\underline{X}(I,JK)$  pela vetorização da matriz de cada uma das amostras  $I$ , (adaptado da referência 30).

A extensão proposta por Wold e colaboradores<sup>41</sup> apresentava uma desvantagem em relação aos outros modelos de segunda ordem, a extensão proposta não possuía a vantagem de segunda ordem, capacidade de modelar interferentes ausentes nas amostras de calibração. Em 1990 Öhman e

colaboradores<sup>42,43</sup> desenvolveram o processo de RBL e uma proposta de algoritmo para sua implementação no modelo UPLS, o que agregou ao modelo a vantagem de segunda ordem. Os trabalhos mais recentes empregam RBL no modelo UPLS, e é possível confirmar que a vantagem de segunda ordem foi agregada satisfatoriamente ao modelo.

O modelo de Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (*Unfolded Partial Least Square*, UPLS) consiste no modelo PLS aplicado a dados de segunda ordem, onde as matrizes de calibração  $I_c$  são vetorizadas dando origem a uma matriz  $\mathbf{X}(I,JK)$  e as concentrações de referência são dispostas em um vetor  $\mathbf{y}$ . Aplica-se a  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  uma decomposição por Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA), conforme especificado na Equação (6) e na Equação (7), respectivamente.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{i=1}^F \mathbf{t}_i \mathbf{p}_i^T + \mathbf{E} \quad (6)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{Tq}^T + \mathbf{f} = \sum_{i=1}^F \mathbf{T}_i \mathbf{q}_i^T + \mathbf{f} \quad (7)$$

onde as matrizes  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{f}$  contém a informação de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ , respectivamente, que não é explicada pelo modelo;  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores,  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{q}$  as matriz de pesos e  $F$  o número de variáveis latentes utilizados no modelo.

Uma vez construído o modelo, a estimativa da propriedade de interesse ( $\hat{y}$ ) em uma amostra desconhecida “i” é obtida pela multiplicação de uma matriz de dados instrumentais ( $\mathbf{x}_{un}$ ) por um vetor de regressão ( $\mathbf{b}_{UPLS}$ ) apropriado:

$$\hat{y}_{un} = \mathbf{t}_{un} \mathbf{q}^T = \mathbf{x}_{un} \mathbf{b}_{UPLS} = \mathbf{x}_{un} \mathbf{W} (\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{q}^T \quad (8)$$

onde  $\mathbf{W}$  é uma segunda matriz de pesos obtida durante o algoritmo PLS.<sup>30</sup>

Por ser um modelo amplamente difundido e utilizado na literatura, as especificidades do modelo PLS não serão abordadas aqui. Detalhes sobre o processo de RBL podem ser obtidos nos artigos de Öhman e colaboradores,<sup>42,43</sup> e Olivieri.<sup>44</sup>

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes, padrões e amostras**

##### **3.1.1 Reagentes e soluções padrão**

Os solventes utilizados para o preparo das soluções estoque e para a etapa de *clean-up* foram metanol e acetonitrila, respectivamente, ambos com grau de pureza HPLC e da fabricante Honeywell. Os padrões de cloridrato de amilorida (98% m/m) e triantereno (99% m/m) usados foram da fabricante Sigma-Aldrich.

As soluções padrão dos dois analitos foram preparadas em água ultrapura, obtidas a partir de purificador Milli-Q (Millipore), após sucessivas diluições das soluções estoque de AML (100 mg/L) e de TRI (100 mg/L) – que foram preparadas pela dissolução dos analitos em metanol, após permanecerem 15 minutos em banho ultrassônico para completa diluição. Todas as soluções foram estocadas em frascos âmbar, cobertos com papel alumínio, e mantidas a 4°C.

##### **3.1.2 Amostras de plasma sanguíneo**

As amostras de plasma sanguíneo foram fornecidas pela Fundação Hemocentro de Brasília (FHB-DF) após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (CEP-FS) - anexo A - e autorização da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde (CGSH-MS), solicitada pela FHB-DF.

A Tabela 3.1 apresenta o perfil dos doadores das amostras de plasma utilizadas. É importante ressaltar que todos os doadores eram saudáveis e que nenhum deles fazia uso de qualquer medicamento contendo amilorida ou triantereno.

As amostras de plasma foram retiradas do Hemocentro congeladas e assim mantidas no laboratório durante toda a pesquisa.

**Tabela 3.1:** Perfil das amostras de plasma sanguíneo utilizadas na pesquisa.

<b>Amostra</b>	<b>Tipo Sanguíneo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>
F01	O +	Feminino	32
F02	A +	Feminino	27
F03	O +	Feminino	36
F04	O -	Feminino	39
F05	A +	Feminino	29
F06	A +	Feminino	29
F07	A +	Feminino	25
F08	A +	Feminino	35
F09	A +	Feminino	27
F10	O +	Feminino	23
M04	B +	Masculino	35
M05	O +	Masculino	32
M06	O +	Masculino	38
M07	A -	Masculino	34
M08	A +	Masculino	38
M09	O +	Masculino	39
M10	O -	Masculino	26
M11	B +	Masculino	29
M12	A +	Masculino	31
M13	O +	Masculino	22
M14	A +	Masculino	27
<b>Média</b>			<b>(31,1 ± 5,3)</b>

### 3.2 Instrumentação

As análises foram realizadas em espectrofluorímetro Cary Eclipse, da marca Varian (Figura 3.1), equipado com acessório para leitura de amostras líquidas, sem uso de filtros, utilizando cubeta de quartzo de 3,5 mL e caminho óptico de 1,0 cm. Os dados foram adquiridos e exportados utilizando o programa Cary Eclipse Scan Application versão 1.1(132), onde os espectros foram monitorados entre os comprimentos de onda de 220 a 400 nm (com intervalos de 10 nm) e 340 a 520 nm (com intervalos de 2 nm), para excitação e emissão, respectivamente; as fendas de excitação e emissão foram ajustadas em 5 nm e a velocidade de varredura em 1200 nm/min. Os dados foram importados e analisados no programa MATLAB® versão 7.12 (R2011a). Os cálculos para o desenvolvimento dos modelos PARAFAC foram realizados

utilizando-se *N – way toolbox* versão 3.1 para MATLAB®.<sup>36</sup> Para o desenvolvimento dos modelos UPLS foram utilizados programas desenvolvidos em MATLAB® por Braga.<sup>30</sup>



**Figura 3.1:** Espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. Fotografia de arquivo da autora.

Banho de ultrassom da marca Unique, modelo 1400A, e centrífuga GEMMY, da série PLC (rotação máxima de 4000 rpm), foram utilizados na etapa de preparo das soluções estoque e no processo de *clean-up*, respectivamente.

Purificador de água Milli-Q (Millipore), e sistema purificador de água osmose reversa OS 10 LX da marca Gahaka, foram utilizados para purificar a água utilizada no preparo das soluções padrão e no procedimento de limpeza das vidrarias, respectivamente.

### 3.3 Procedimento experimental

#### 3.3.1 Limpeza das vidrarias

Visando garantir a qualidade analítica dos resultados obtidos e diminuir os possíveis erros causados por contaminações indesejadas, as vidrarias utilizadas foram lavadas, antes e após o uso, com água e sabão e enxaguadas com água purificada por, no mínimo, três vezes. As vidrarias não volumétricas, e resistentes à temperaturas mais elevadas, foram levadas ao forno mufla à

350 °C por 4 horas, as demais vidrarias, bem como os materiais plásticos, foram deixados de molho por 24 horas em solução de hipoclorito de sódio / água purificada 10% (v/v) e em seguida enxaguadas exaustivamente com água purificada.

### 3.3.2 Preparo das soluções padrão e das amostras fortificadas

As bolsas de plasma foram mantidas a 4 °C por 24 horas para descongelar. Após esse período, foram mantidas por alguns minutos sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente.

Após atingirem temperatura ambiente, volumes adequados dos padrões de AML e TRI, descritos na Tabela 3.2 e na Tabela 3.3, respectivamente, foram transferidos para balões volumétricos de 5,0 mL, completando-se o volume com plasma sanguíneo; logo que a alíquota necessária era retirada a bolsa voltava a ser congelada.

Soluções aquosas padrão de amilorida 0,25 mg/L e 2,5 mg/L, e de triantereno 0,5 mg/L e 2,5 mg/L - preparadas em água ultrapura após sucessivas diluições das soluções estoque de AML (100 mg/L) e TRI (100 mg/L) - foram usadas para fortificar as amostras de plasma nos distintos níveis de concentração, como mostrado na Tabela 3.2 e na Tabela 3.3.

**Tabela 3.2:** Concentração dos padrões de AML usados para cada nível de concentração das amostras fortificadas.

[AML] padrão	[AML] no plasma dopado (µg/L)
0,25 mg/L	25,00
2,50 mg/L	50,00
2,50 mg/L	75,00
2,50 mg/L	100,00
2,50 mg/L	125,00
2,50 mg/L	150,00

**Tabela 3.3:** Concentração dos padrões de TRI usados para cada nível de concentração das amostras fortificadas.

<b>[TRI] padrão</b>	<b>[TRI] no plasma dopado (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
0,50 mg/L	10,00
0,50 mg/L	30,00
2,50 mg/L	50,00
2,50 mg/L	70,00
2,50 mg/L	90,00

É importante ressaltar que tanto a fortificação das amostras quanto a determinação dos analitos foram feitas de forma independente; usaram-se diferentes alíquotas de cada amostra para realizar a fortificação com cada analito de interesse.

### 3.3.2.1 Planejamento para uso das amostras de plasma

O planejamento de qual bolsa seria utilizada para cada concentração de amilorida e triantereno seguiu um padrão inicialmente aleatório, apresentado na Tabela 3.4. Optou-se por coincidir que os brancos das amostras, concentração igual a 0,00  $\mu\text{g/L}$  para um analito, correspondessem às amostras que foram analisadas em replicatas no outro analito, afim de se ter um branco das bolsas de plasma usadas em replicatas.

**Tabela 3.4:** Planejamento do uso das amostras para cada nível de concentração dos analitos e respectivo número de replicatas.

<b>Amostra</b>	<b>[AML] (<math>\mu\text{g/L}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Nº de replicatas</b>	<b>[TRI] (<math>\mu\text{g/L}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Nº de replicatas</b>
F01	50	1	90	1
F02	0	1	30	3
F03	150	1	50	1
F04	100	3	10	3
F05	25	6	0	3
F06	125	3	0	1
F07	25	1	70	1
F08	75	1	90	1
F09	100	1	-- <sup>b</sup>	--
F10	0	1	70	3
M04	125	1	30	1
M05	50	1	70	1
M06	25	1	50	1
M07	50	3	0	1
M08	75	1	-- <sup>b</sup>	--
M09	100	1	10	1
M10	150	1	30	1
M11	125	1	10	1
M12	150	3	0	1
M13	0	3	50	6
M14	0	1	90	3

<sup>a</sup> Concentração do analito na amostra de plasma fortificada.

<sup>b</sup> Amostra de plasma não utilizada para esse analito.

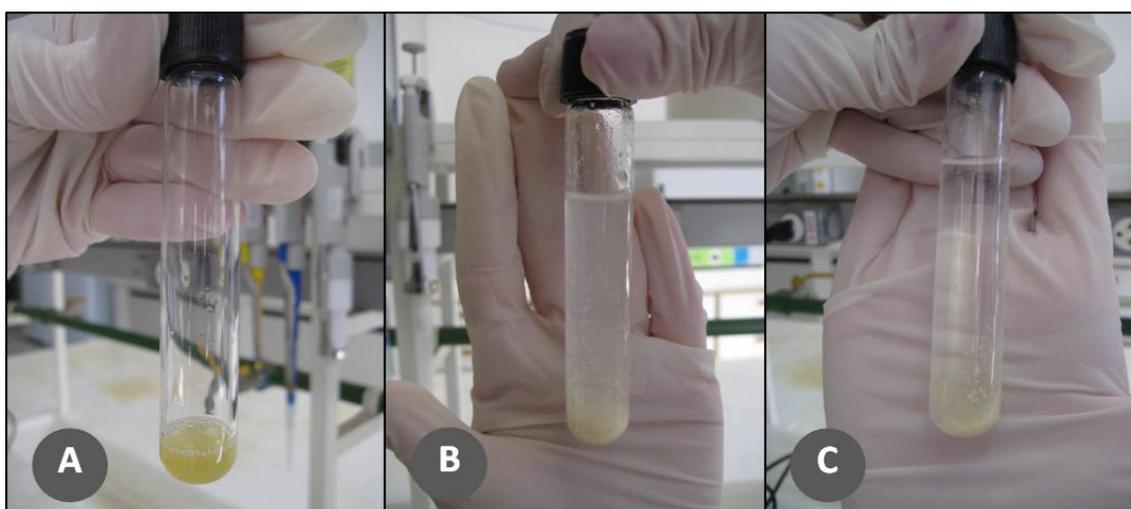
Como já apresentado anteriormente, os níveis de concentração para TRI variaram de 10 a 90  $\mu\text{g/L}$ , uma amostra em cada nível de concentração foi analisada em triplicata para cada analito, sendo que o nível de concentração intermediário (50  $\mu\text{g/L}$  para o TRI) foi analisado em sextuplicatas. Para a AML, cujos níveis variaram de 25 a 150  $\mu\text{g/L}$ , o planejamento inicial previa analisar concentrações de 5 a 100  $\mu\text{g/L}$ , o que faria do nível de concentração 25  $\mu\text{g/L}$  o nível intermediário - e por esse motivo ser analisado em sextuplicata. Contudo em função do limite de detecção do fármaco, foi necessário substituir os dois níveis de concentração mais baixos por dois níveis mais altos, de forma que para a amilorida o nível de 25  $\mu\text{g/L}$  foi analisado em sextuplicata.

### 3.3.3 Procedimento de *clean-up*

O plasma sanguíneo apresenta intensidade de fluorescência elevada na região espectral escolhida para a determinação dos analitos. Por esse motivo, foi empregada uma etapa de *clean-up*, que consistiu em uma precipitação de parte dos interferentes do plasma pela adição de acetonitrila, anteriormente as medidas espectrofluorimétricas e adições de padrão, visando diminuir a intensidade de fluorescência da matriz biológica.

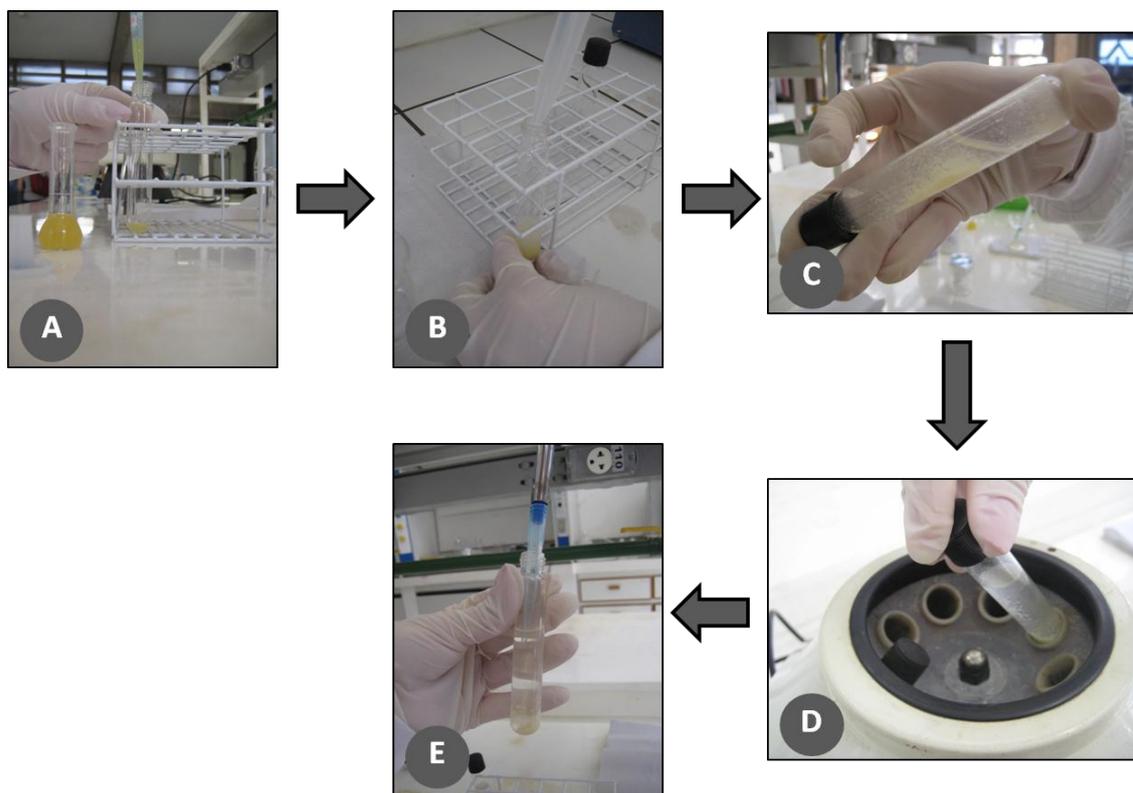
O procedimento empregado nessa etapa de *clean-up* foi definido a partir do teste de diversas condições experimentais, variando a quantidade de solvente orgânico em relação ao plasma. Segundo Nascimento<sup>45</sup> e colaboradores acetonitrila precipita proteínas plasmáticas. A condição experimental que apresentou melhor resultado foi a adição de 9,0 mL de acetonitrila a 1,0 mL de amostra de plasma, em um tubo de centrífuga; em seguida, o tubo era agitado por cerca de 10 segundos manualmente e levado à centrífuga por 5 minutos a uma rotação de 2400 rpm.

Após esse procedimento parte dos interferentes do plasma sanguíneo foi precipitado, como pode ser observado na Figura 3.2. Em seguida, 2,8 mL da solução sobrenadante obtida, apresentada na Figura 3.2C, foi retirada do tubo com uma micropipeta e inserida na cubeta para análise no espectrofluorímetro.



**Figura 3.2:** Amostra de plasma sanguíneo fortificada, sem acetonitrila (A), com acetonitrila antes da centrifugação (B), com acetonitrila depois da centrifugação (C). Fotografias de arquivo da autora.

A Figura 3.3, apresenta as etapas do procedimento de *clean-up* descrito.



**Figura 3.3:** Etapas do procedimento de *clean-up*. Transferência do plasma fortificado para tubo de centrifuga (A), adição de acetonitrila ao tubo (B), agitação (C), centrifugação (D), retirada da solução incolor obtida (E). Fotografias de arquivo da autora.

É importante destacar que em função da diluição ocorrida nesta etapa, os resultados apresentados na seção 4 encontram-se em uma razão de diluição de 1:10.

### 3.3.4 Adição de padrão

Para desenvolvimento dos modelos univariado e PARAFAC foi necessário a utilização do método de adição de padrão, esse método é indicado quando há efeito de matriz significativo na amostra.

Testes realizados mostraram não haver erros significativos em se realizar as adições de padrão direto na cubeta usada para a análise. Sendo assim, a primeira adição foi feita aos 2,8 mL de sobrenadante que estavam na cubeta, após sua leitura no espectrofluorímetro, a segunda aos 2,9 mL (sobrenadante + 100  $\mu$ L de solução padrão adicionada na 1ª adição) e assim

por diante. A Tabela 3.5 e a Tabela 3.6 mostram as adições de padrão realizadas para as determinações de amilorida e triantereno, respectivamente. Para as adições de padrão utilizou-se soluções padrão de amilorida 290 µg/L e triantereno 145 µg/L, obtidas a partir de diluições de soluções padrão de maior concentração.

**Tabela 3.5:** Descrição dos volumes, concentrações adicionadas e finais de amilorida para o desenvolvimento do método de adição de padrão.

Adição	Volume adicionado (µL)	[AML] adicionada (µg/L)	[AML] final adicionada (µg/L)
1 <sup>a</sup>	100	10,00	10,00
2 <sup>a</sup>	110	10,60	20,60
3 <sup>a</sup>	120	11,12	31,72
4 <sup>a</sup>	130	11,56	43,28
5 <sup>a</sup>	140	11,94	55,22

**Tabela 3.6:** Descrição dos volumes, concentrações adicionadas e finais de triantereno para o desenvolvimento do método de adição de padrão.

Adição	Volume adicionado (µL)	[TRI] adicionada (µg/L)	[TRI] final adicionada (µg/L)
1 <sup>a</sup>	100	5,00	5,00
2 <sup>a</sup>	110	5,30	10,30
3 <sup>a</sup>	120	5,56	15,86
4 <sup>a</sup>	130	5,78	21,64
5 <sup>a</sup>	140	5,97	27,61

### 3.4 Tratamento dos resíduos

Os resíduos químicos (soluções aquosas e orgânicas) e biológicos (soluções contendo plasma sanguíneo em baixa concentração) gerados foram encaminhados à Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Perigosos da Universidade de Brasília (RESQUI - UnB) onde foram devidamente tratados. As seringas utilizadas para retirar alíquotas de plasma das bolsas, procedimento mostrado na Figura 3.4A, foram descartadas em

coletor para material perfurocortante Descarpack (Figura 3.4B), que também foi encaminhado à RESQUI – UnB.



**Figura 3.4:** (A) Procedimento para retirada de plasma sanguíneo da bolsa. (B) Coletor para material perfurocortante Descarpack. Fotografias de arquivo da autora.

As bolsas de plasma sanguíneo fornecidas pela FHB-DF continham volume muito maior que o necessário para o trabalho e deviam ser devolvidas para o Hemocentro ao final da pesquisa, por uma questão de controle e segurança. Todas as bolsas, inclusive as que não foram utilizadas, foram devolvidas para a Fundação Hemocentro; segundo informou a instituição, esse material será incinerado.

O procedimento experimental realizado para a determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo está resumido na Figura 3.5.

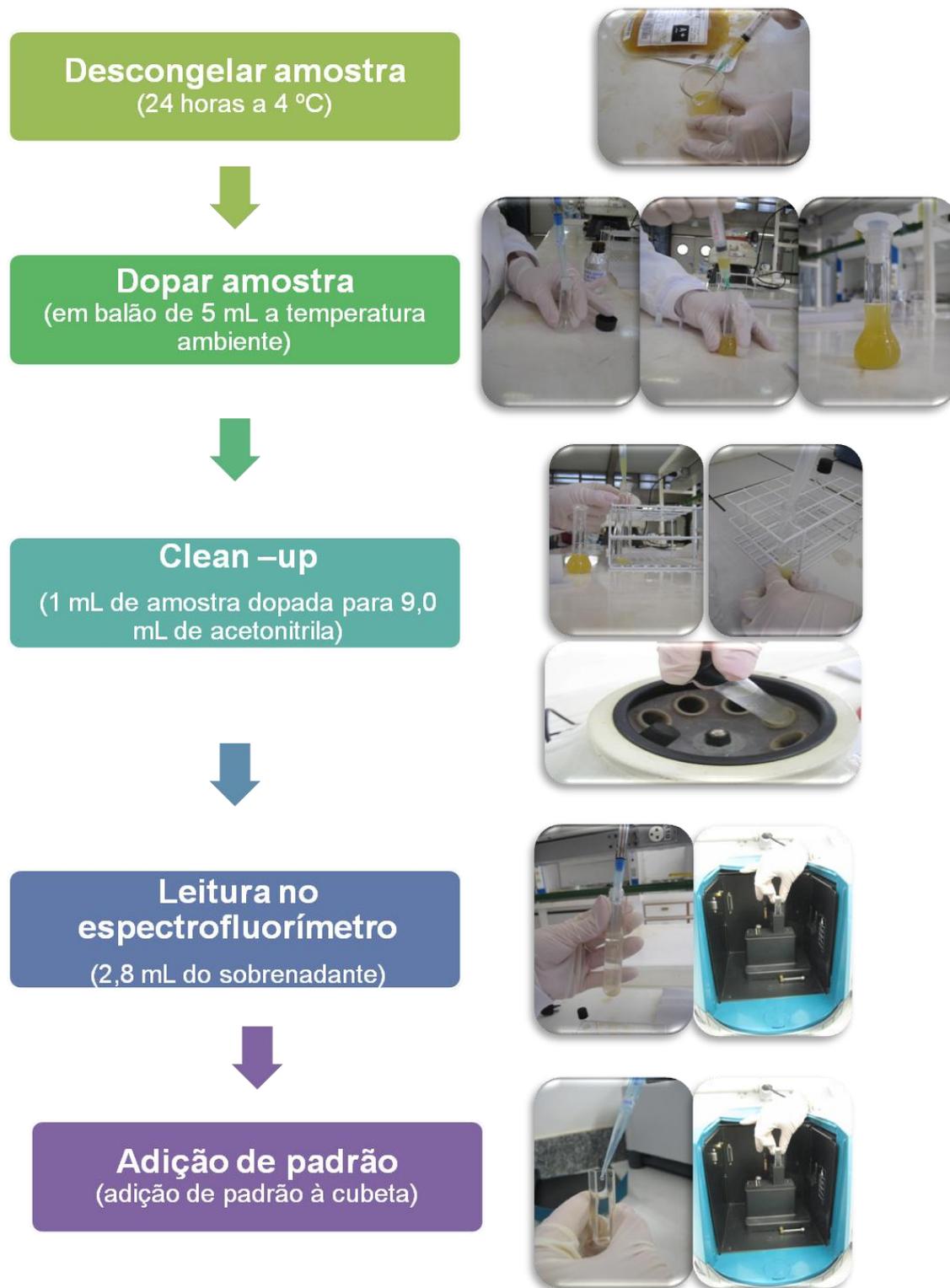
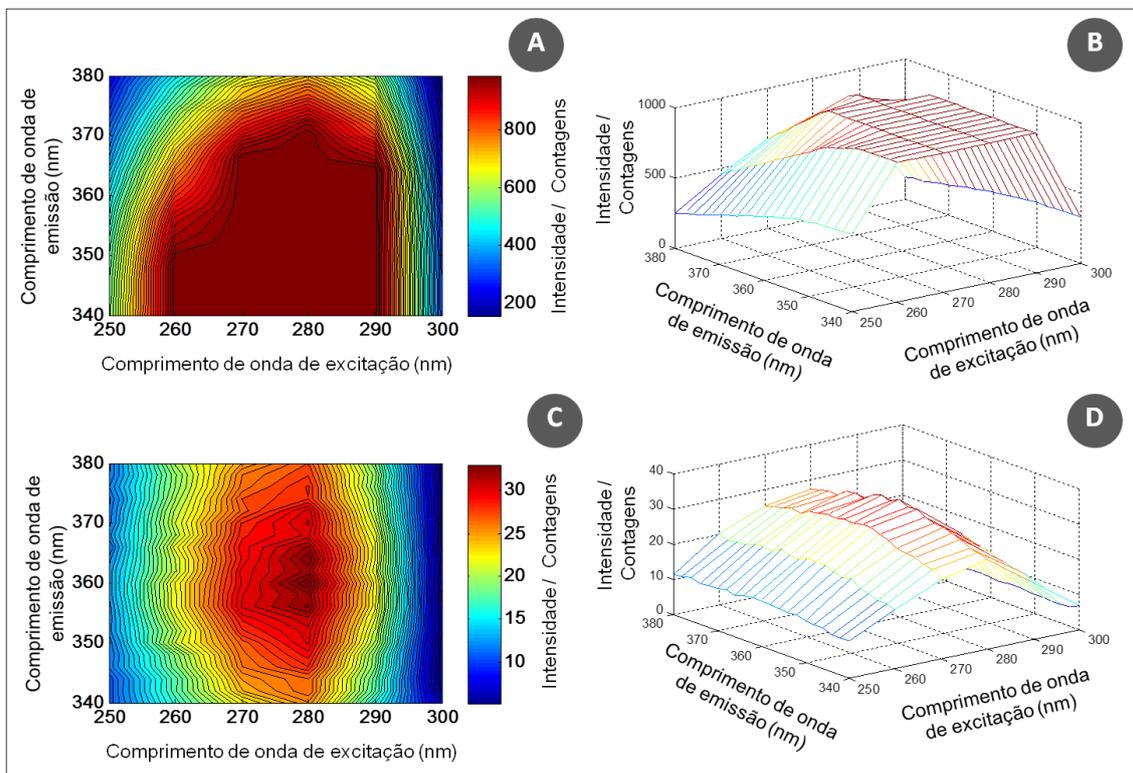


Figura 3.5: Resumo dos procedimentos experimentais.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Etapa de *clean-up*

O plasma sanguíneo apresenta elevada intensidade de fluorescência na região espectral escolhida para determinação dos analitos. Visando diminuir essa intensidade, uma etapa de *clean-up*, na qual proteínas do plasma foram precipitadas, foi realizada. Como pode ser observado na Figura 4.1, a intensidade de fluorescência da matriz biológica é reduzida significativamente após a etapa de *clean-up*, indicando que esse procedimento simples de extração é capaz de eliminar grande parte dos interferentes da matriz biológica.



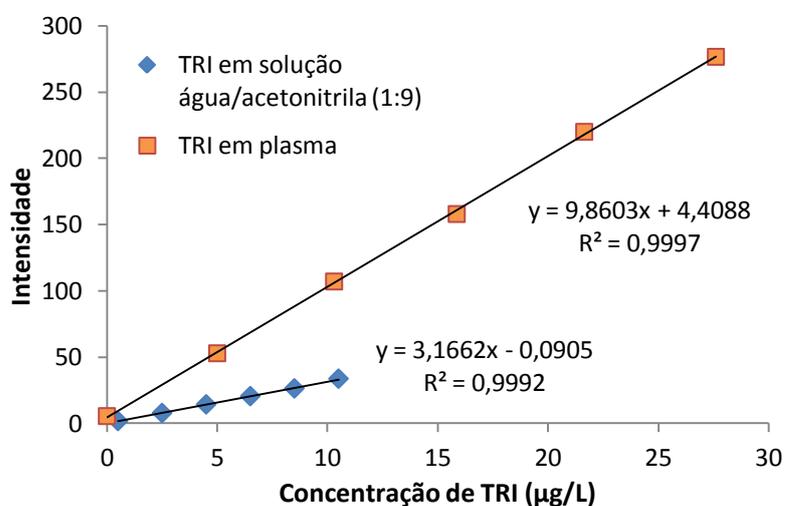
**Figura 4.1:** Intensidade de fluorescência de uma amostra de plasma sanguíneo, sem a adição dos fármacos, antes (A e B) e depois (C e D) da etapa de *clean-up*.

## 4.2 Adição de padrão

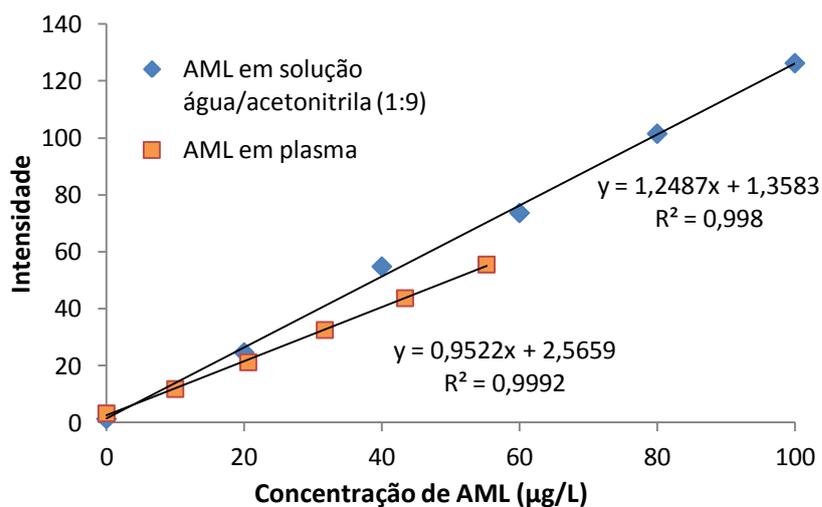
Segundo Holler e colaboradores<sup>27</sup> o método da adição de padrão é particularmente útil na análise de matrizes complexas nas quais os efeitos de matriz são significativos. Quando um componente presente na amostra interfere no sinal instrumental do analito de interesse, dizemos que há efeito de matriz.

O efeito de matriz tanto pode reduzir como aumentar o sinal do analito. Assim, uma forma de saber se está ocorrendo efeito de matriz na análise é plotar duas curvas de calibração externa, uma do analito no solvente e outra do analito na matriz. Se os dois gráficos tiverem a mesma inclinação, não há efeito de matriz na análise; mas se as inclinações forem diferentes, isso indica que há efeito de matriz.

A Figura 4.2 e a Figura 4.3 indicam que há efeito de matriz na determinação de triantereno e amilorida, respectivamente, o que justifica a utilização do método de adição de padrão.



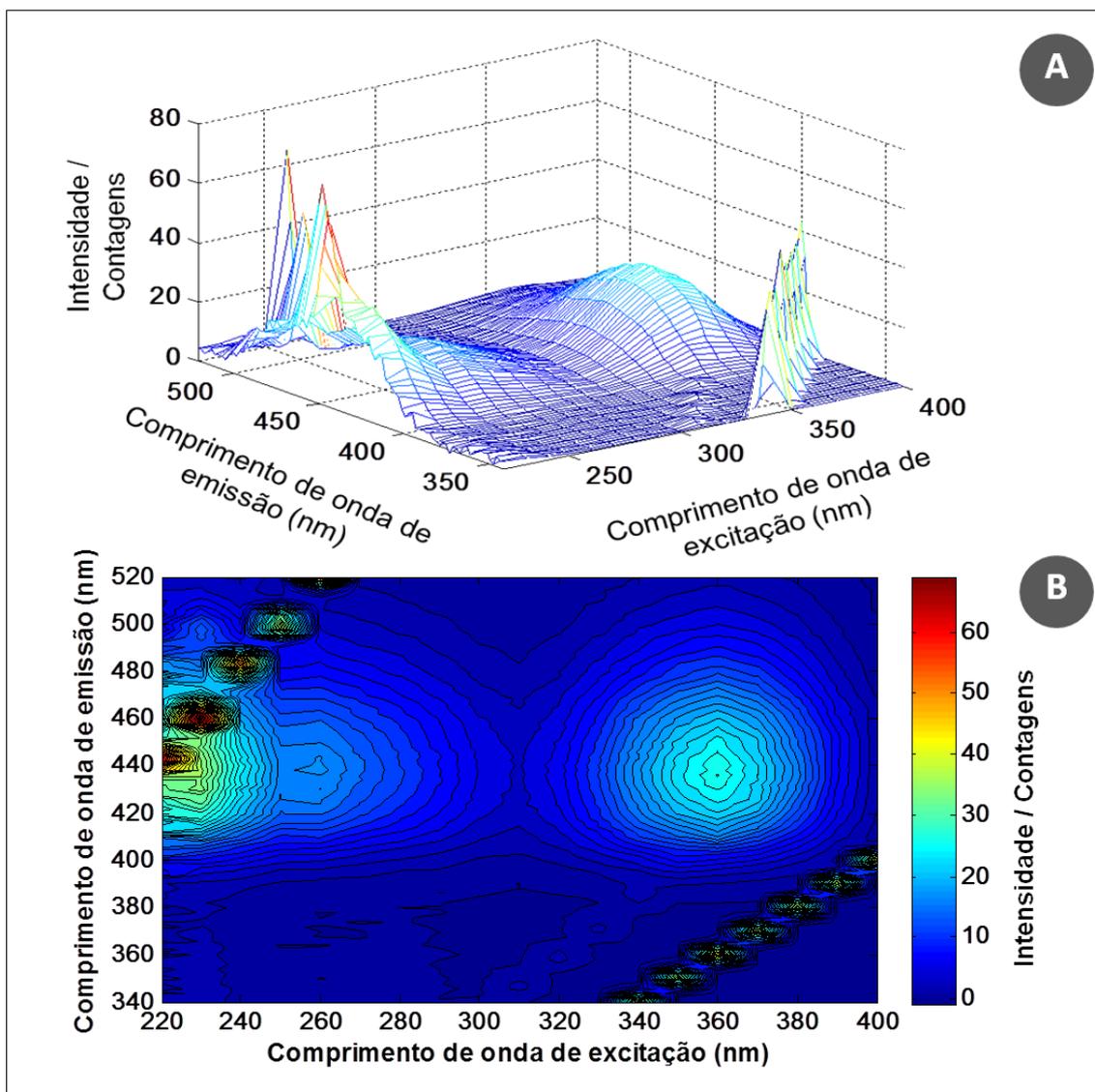
**Figura 4.2:** Calibração externa de TRI em duas matrizes, solução água/acetonitrila (1:9) (◆) e plasma sanguíneo (■).



**Figura 4.3:** Calibração externa de AML em duas matrizes, solução água/acetonitrila (1:9) (◆) e plasma sanguíneo (■).

### 4.3 Triantereno

O triantereno apresenta elevada fluorescência natural em duas regiões diferentes, como pode ser observado na Figura 4.4, por esse motivo sua determinação por espectrofluorimetria é possível sem a necessidade de etapas de derivatização.



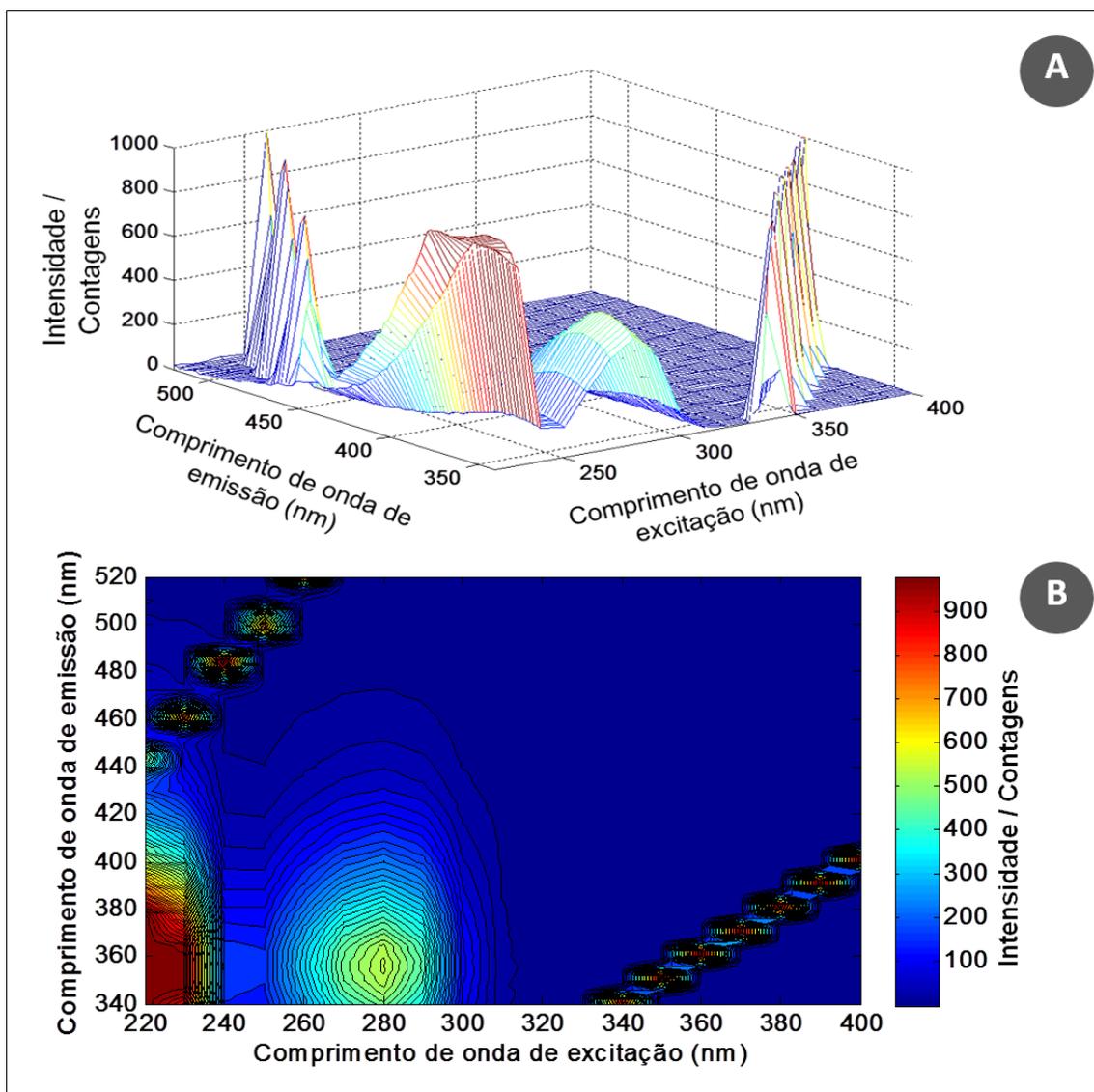
**Figura 4.4:** Espectro de fluorescência (A) e superfície de resposta (B) de um padrão de triantreno 8,5 µg/L.

Para determinação desse analito em plasma sanguíneo, três modelos de regressão diferentes foram utilizados a fim de se determinar o mais apropriado. A seguir os resultados obtidos por cada modelo são discutidos individualmente e apresentada uma comparação entre eles.

#### 4.3.1 Determinação por regressão univariada

Como discutido anteriormente, o plasma sanguíneo também apresenta intensidade de fluorescência na região espectral estudada. A Figura 4.5

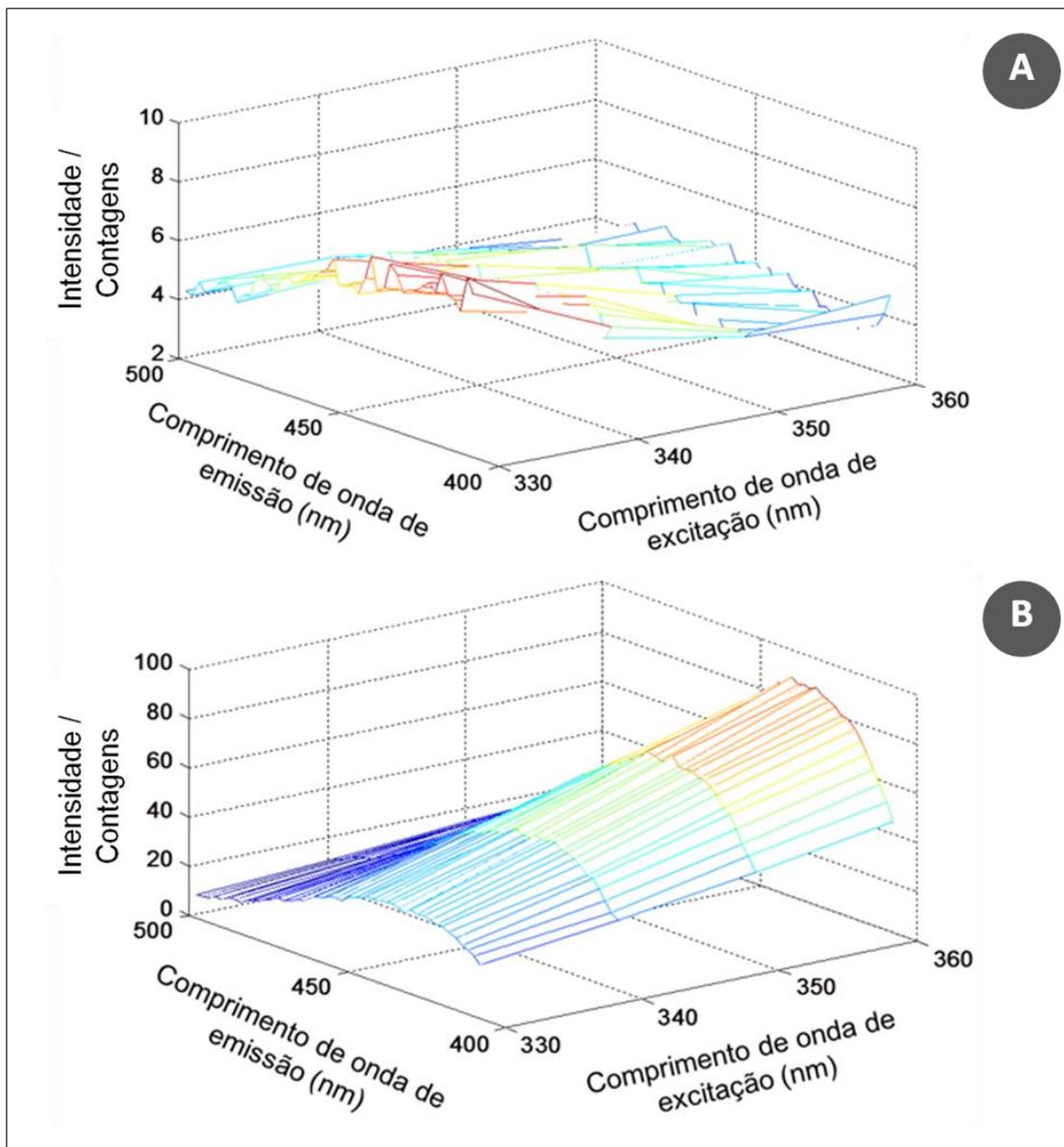
apresenta o gráfico de fluorescência medida para uma amostra de plasma não fortificada em superfície tridimensional e em curvas de nível.



**Figura 4.5:** Espectro de fluorescência (A) e superfície de resposta (B) de uma amostra de plasma não fortificada.

Comparando a Figura 4.5 com a Figura 4.4, percebe-se que a região espectral mais adequada para realização do modelo univariado é na segunda banda espectral do triantereno, aproximadamente entre 330 e 360 nm de excitação e 408 e 498 nm de emissão. A Figura 4.6 apresenta as superfícies de fluorescência de uma amostra de plasma não fortificada e de uma amostra contendo 9,0  $\mu\text{g/L}$  de TRI na referida região, onde pode-se observar que não há espalhamentos Rayleigh e Raman e que a intensidade de fluorescência do

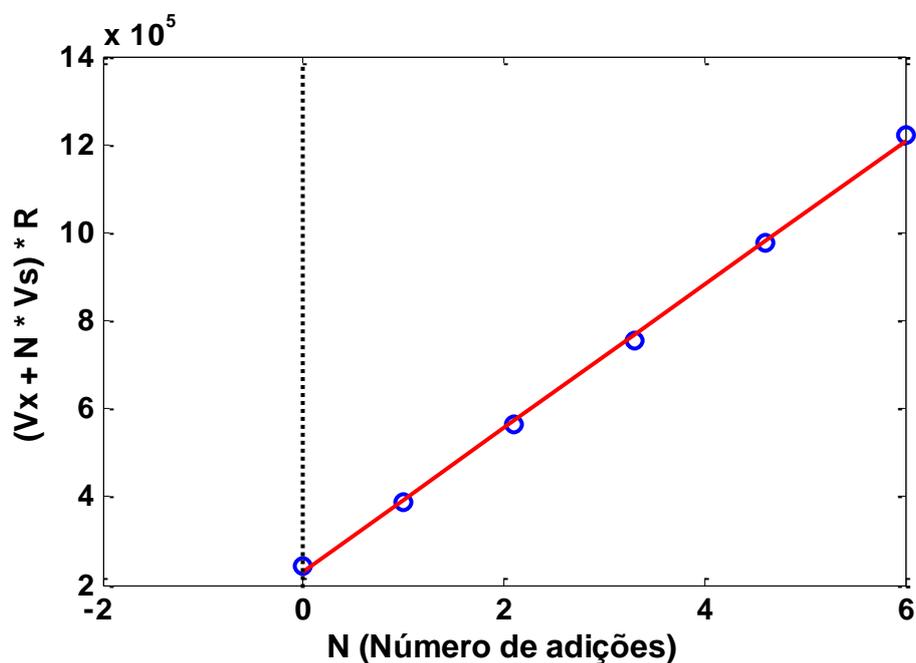
plasma é baixa, comparada com a do analito, mas não chega a poder ser considerada desprezível.



**Figura 4.6:** Espectros de fluorescência, amostra de plasma não fortificada (A), amostra de plasma fortificada, 9,0 µg/L de triantereno (B).

Para realização do modelo univariado utilizou-se os valores de intensidade de fluorescência corrigidos de cada amostra fortificada e das respectivas adições de padrão obtidos em 438 e 360 nm para emissão e excitação, respectivamente. A Figura 4.7 apresenta uma curva de adição de padrão obtida pelo modelo univariado para uma amostra com 9,0 µg/L de triantereno e suas respectivas adições de padrão. É importante destacar que para o ajuste dessa curva analítica utilizou-se a metodologia descrita por

Bader<sup>39</sup> (detalhada na seção 2.3.1), que se refere ao caso especial de adição de padrão em que o volume final é variável.



**Figura 4.7:** Curva de adição de padrão para uma amostra com 9,0  $\mu\text{g/L}$  de TRI. Onde  $Vx$  representa o volume inicial da amostra,  $Vs$  o volume de cada adição de padrão,  $R$  as intensidades de fluorescência corrigidas e  $N$  o número de adições de padrão.

A Tabela 4.1 apresenta as concentrações de TRI estimadas, limites de detecção (LD), quantificação (LQ), precisão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) médios estimados pelo modelo univariado, com os respectivos desvios padrão e a recuperação média para cada nível de concentração. Os limites de quantificação e determinação foram calculados a partir da norma ISO 11843-2.<sup>46</sup>

**Tabela 4.1:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo univariado e recuperação média para cada nível de concentração.

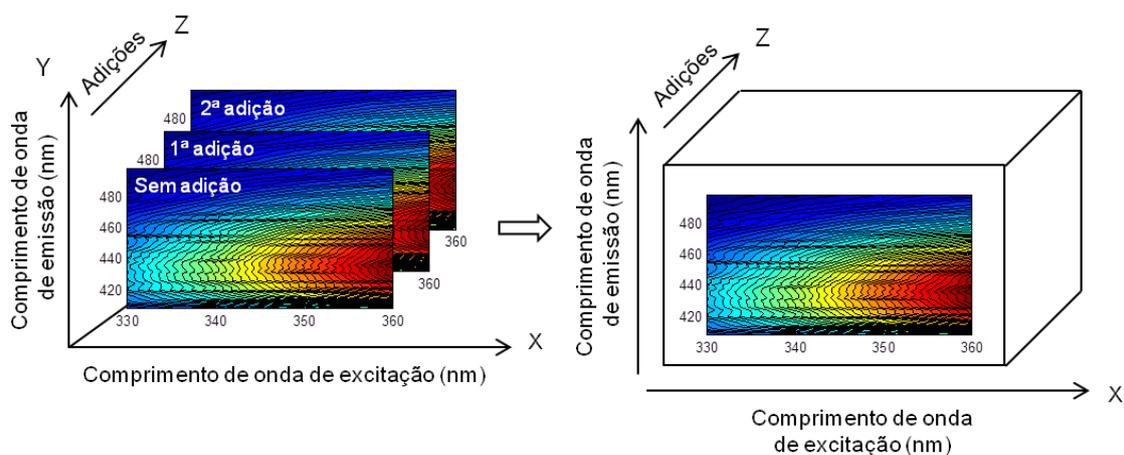
[TRI] esperada (µg/L)	[TRI] estimada pelo modelo univariado (µg/L)	Recuperação média (%)
0,00	0,12 (± 0,06)	--
1,00	0,93 (± 0,19)	93,3 (± 19,4)
3,00	2,52 (± 0,18)	84,0 (± 5,9)
5,00	4,07 (± 0,09)	81,4 (± 1,7)
7,00	5,54 (± 0,31)	79,1 (± 4,5)
9,00	7,59 (± 0,50)	84,3 (± 5,5)
	<b>LD médio</b>	0,46 (± 0,13) µg/L
	<b>LQ médio</b>	1,37 (± 0,38) µg/L
	<b>Precisão média</b>	0,17 µg/L
	<b>R<sup>2</sup> médio</b>	0,9993 (± 0,0003)

É possível perceber que as recuperações obtidas são relativamente altas, mas todas inferiores a 100 %, o que pode ter ocorrido devido a uma pequena perda de analito na etapa de *clean-up*, visto que o triantereno se liga as proteínas plasmáticas.<sup>47</sup> O limite de detecção foi de aproximadamente 0,46 µg/L, enquanto que o limite de quantificação foi de 1,37 µg/L, sendo este acima do nível mínimo de concentração estudado, o que é condizente com os maiores desvios obtidos no nível de concentração de 1,0 µg/L. O coeficiente de determinação mostra que o modelo apresentou um bom ajuste linear e boa precisão média. No entanto, apesar das figuras de mérito apresentadas indicarem boas estimativas para o modelo de regressão univariado, a matriz continua interferindo na determinação de TRI em plasma sanguíneo, mesmo após a etapa de *clean-up* e uso do método de adição de padrão, como pode ser observado pela variação não uniforme nas recuperações.

#### 4.3.2 Determinação através do modelo PARAFAC

Para realização do modelo PARAFAC os dados foram organizados em uma matriz tridimensional como a representada na Figura 4.8, em que os comprimentos de onda de excitação e emissão estão dispostos nos eixos x e y,

respectivamente, e os espectros de fluorescência das sucessivas adições de padrão estão dispostos no eixo z.



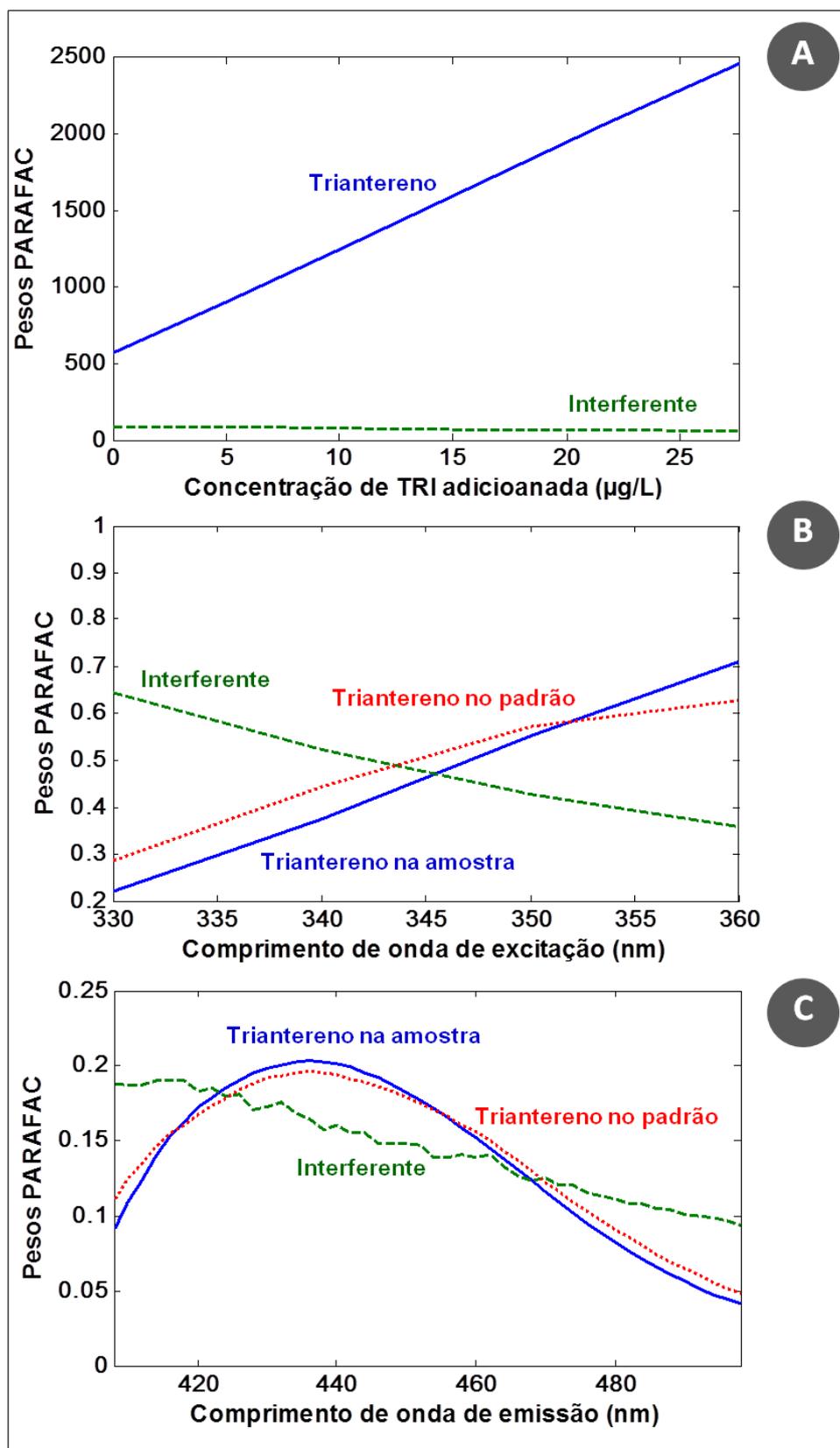
**Figura 4.8:** Representação da organização tridimensional dos dados para a amostra de plasma com 9,0 µg/L de triantereno.

Os cubos foram organizados com 6 amostras (amostra fortificada + 5 adições de padrão), 46 comprimentos de onda de emissão (408 a 498 nm) e 4 comprimentos de onda de excitação (330 a 360 nm); como já discutido no modelo univariado, nessa região espectral não há espalhamentos Rayleigh e Raman e a intensidade de fluorescência do plasma é baixa comparada à do analito.

Os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC foram todos obtidos a partir do uso de dois fatores, restrição de não-negatividade em todas as dimensões e inicialização com os pesos referentes ao espectro de excitação e emissão do PARAFAC obtidos a partir de uma amostra que não foi fortificada com o analito. Essa inicialização foi necessária para ajudar na deconvolução correta dos perfis espectrais do plasma sanguíneo e do TRI, e consistiu em decompor – com o modelo PARAFAC - um cubo de dados composto por duas matrizes diferentes, em que uma continha os dados de uma amostra de branco e as sucessivas adições de padrão e a outra continha os dados de uma amostra com 9,0 µg/L de TRI (nível máximo de concentração) e as sucessivas adições de padrão.

A Figura 4.9 apresenta os pesos obtidos pelo PARAFAC em função da concentração de TRI adicionada e os espectros de fluorescência estimados de uma amostra, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC, onde é

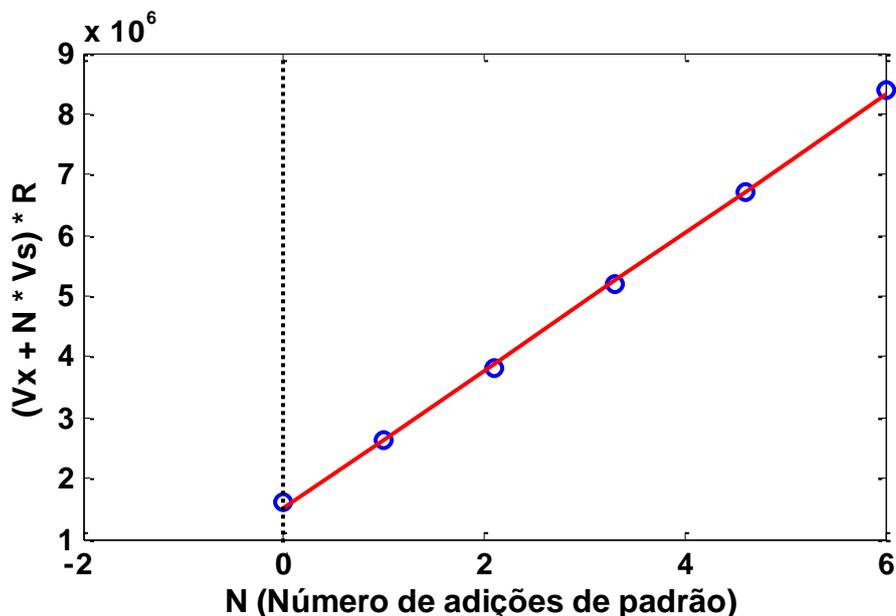
possível observar a “separação matemática” que o modelo faz dos espectros do analito e do interferente. Para identificar qual perfil espectral representa o TRI, comparou-se os espectros deconvoluídos pelo modelo e os espectros medidos em uma solução padrão. Comparando-se os espectros estimados e os medidos na solução padrão pode-se observar uma boa concordância, sendo as diferenças observadas provavelmente causadas pela influência da matriz ou por erros de deconvolução.



**Figura 4.9:** Pesos PARAFAC em função da concentração de TRI adicionada (A), espectros de fluorescência deconvoluídos, excitação (B) e emissão (C), obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC para uma matriz de amostra (perfis verde e azul) e para solução padrão (perfil vermelho).

Os pesos PARAFAC relativos à concentração de analito adicionada equivalem ao sinal instrumental isolado, livre dos sinais dos interferentes. A partir desses pesos é possível obter uma regressão análoga à obtida por regressão univariada, empregando o método das adições de padrão.

A Figura 4.10 mostra uma reta de adição de padrão realizada utilizando os pesos obtidos pelo PARAFAC, é válido lembrar que nessa regressão, assim como na univariada, as determinações foram feitas em um caso especial de adição de padrão, onde o volume final é variável (em função das adições terem sido feitas sucessivamente na cubeta). Observa-se um ótimo ajuste da regressão, sendo que foram obtidos resultados similares para todas as amostras analisadas.



**Figura 4.10:** Curva de adição de padrão para uma amostra com 9,0  $\mu\text{g/L}$  de TRI. Onde  $V_x$  representa o volume inicial da amostra,  $V_s$  o volume de cada adição de padrão,  $R$  os pesos do modelo PARAFAC e  $N$  o número de adições de padrão.

A Tabela 4.2 apresenta as concentrações de TRI estimadas, limites de detecção (LD), quantificação (LQ), precisão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) médios estimados pelo modelo PARAFAC, com os respectivos desvios padrão e a recuperação média para cada nível de concentração.

**Tabela 4.2:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo PARAFAC e recuperação média para cada nível de concentração.

[TRI] esperada ( $\mu\text{g/L}$ )	[TRI] estimada pelo modelo PARAFAC ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação média (%)
<b>0,00</b>	0,45 ( $\pm 0,08$ )	---
<b>1,00</b>	0,56 ( $\pm 0,13$ )	55,6 ( $\pm 13,3$ )
<b>3,00</b>	2,16 ( $\pm 0,15$ )	72,2 ( $\pm 5,0$ )
<b>5,00</b>	3,77 ( $\pm 0,15$ )	75,5 ( $\pm 3,0$ )
<b>7,00</b>	5,21 ( $\pm 0,32$ )	74,5 ( $\pm 4,6$ )
<b>9,00</b>	7,22 ( $\pm 0,50$ )	80,2 ( $\pm 5,6$ )
	<b>LD médio</b>	0,44 ( $\pm 0,09$ ) $\mu\text{g/L}$
	<b>LQ médio</b>	1,31 ( $\pm 0,27$ ) $\mu\text{g/L}$
	<b>Precisão média</b>	0,36 $\mu\text{g/L}$
	<b>R<sup>2</sup> médio</b>	0,9994 ( $\pm 0,0003$ )

Assim como na regressão univariada, é possível perceber que as recuperações obtidas são relativamente altas, mas todas ainda inferiores a 100 %, o que pode ter ocorrido devido a uma pequena perda de analito na etapa de *clean-up* ou ainda por erros de deconvolução do modelo. O limite de detecção também está abaixo de 0,50  $\mu\text{g/L}$ , mas o limite de quantificação, apesar de menor que o do modelo de regressão univariada, também ficou acima do nível mínimo de concentração estudado. O coeficiente de determinação mostra que o modelo apresentou um bom ajuste linear e precisão média um pouco acima da regressão univariada. No entanto, apesar de os espectros deconvoluídos mostrarem que a “separação matemática” realizada foi eficiente, foram obtidas recuperações relativamente baixas.

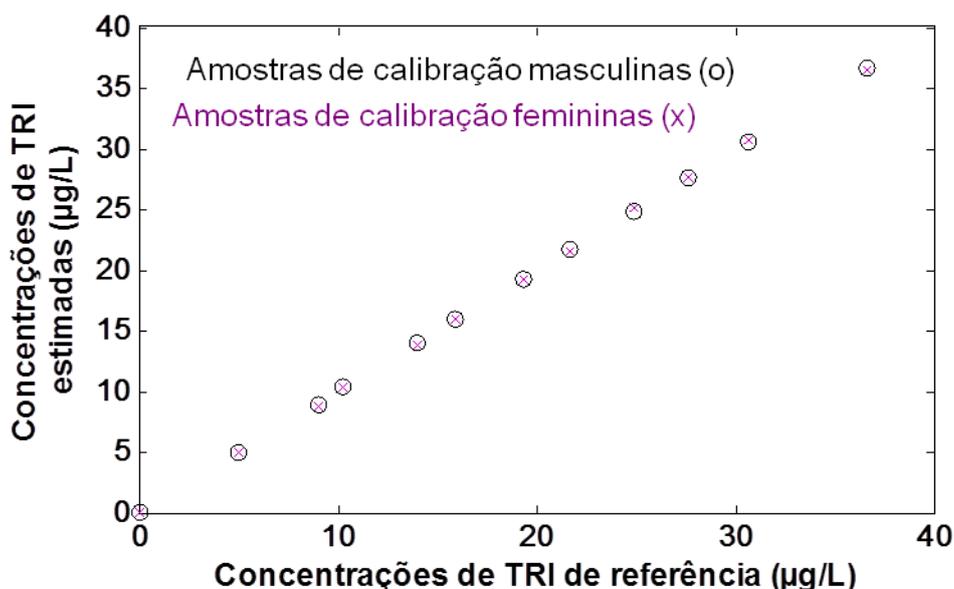
#### 4.3.3 Determinação por regressão empregando UPLS

O modelo UPLS, diferentemente dos modelos descritos anteriormente, não emprega o método da adição de padrão, sendo este baseado em calibração externa. Para o desenvolvimento da regressão por UPLS, quatro amostras, e as respectivas adições, foram usadas na calibração, e as demais 17 amostras usadas na validação. Neste caso o UPLS se distingue do

PARAFAC no sentido de não realizar uma deconvolução de sinais e sim realizar a modelagem dos sinais do analito e dos interferentes presentes.

O modelo UPLS para a determinação de TRI foi calibrado a partir de uma calibração mista, onde utilizou-se quatro amostras, todas com suas respectivas adições de padrão - duas amostras de branco, de gêneros diferentes e duas amostras com 9,0 µg/L de TRI (nível máximo de concentração), novamente de gêneros diferentes.

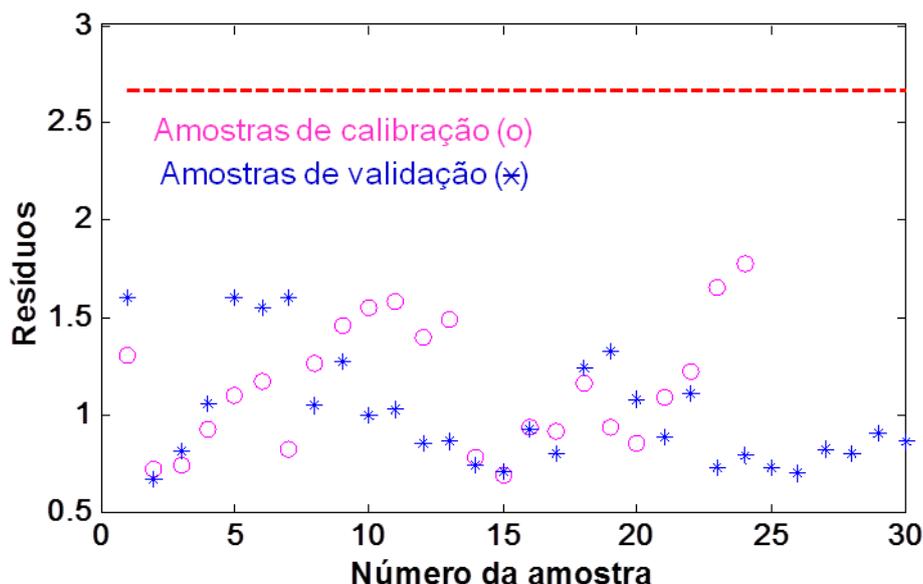
Como pode ser observado na Figura 4.11 as amostras femininas e masculinas podem ser calibradas e analisadas juntas, pelo mesmo modelo, uma vez que os resultados apresentados no gráfico dos valores de concentração estimados em relação aos de referência para as amostras femininas e masculinas não apresentam diferenças significativas.



**Figura 4.11:** Gráfico de calibração mista, usando 2 cubos femininos e 2 cubos masculino (branco e nível máximo de concentração – amostra fortificada com 9,0 µg/L de triantereno).

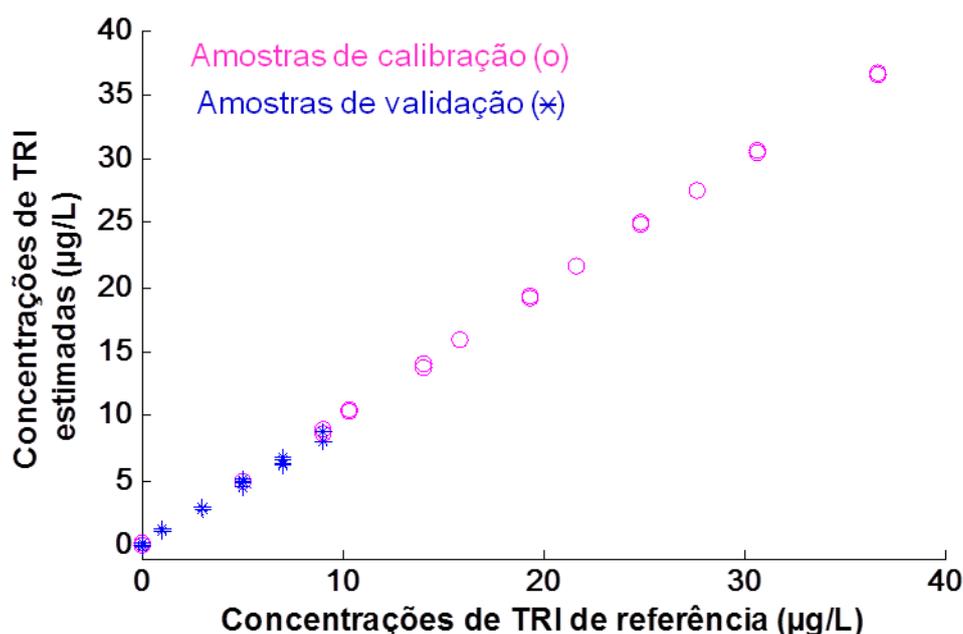
Os melhores resultados encontrados pelo modelo UPLS foram obtidos a partir do uso de três variáveis latentes, sem centrar os dados na média e considerando que todos os interferentes presentes nas amostras de calibração e validação são aproximadamente os mesmos. Sendo esses parâmetros otimizados com base nos erros obtidos para as estimativas de concentração para as amostras de calibração e nos resíduos de deconvolução do UPLS. A

Figura 4.12 apresenta o gráfico de resíduos de decomposição para as amostras de calibração e validação utilizando 3 variáveis latentes. Pode ser observado que os resíduos das amostras de calibração e validação estão dentro da mesma faixa de variação, o que indica que nas amostras de validação não são observados intereferentes diferentes das amostras de calibração.



**Figura 4.12:** Resíduos de decomposição para o modelo UPLS com 3 variáveis latentes e calibração mista. Onde as amostras de calibração estão representadas pelas bolinhas em rosa (o), as amostras de validação pelos asteriscos em azul (\*) e o valor crítico estimado pelo ruído instrumental pela linha tracejada em vermelho (---).

Observado a Figura 4.13, que mostra um gráfico das concentrações de referência versus as concentrações estimadas pelo modelo UPLS, observa-se que o modelo não apresenta erros sistemáticos na determinação de TRI.



**Figura 4.13:** Concentração de referência versus concentração estimada pelo modelo UPLS a partir da calibração mista.

A Tabela 4.3 apresenta as concentrações de TRI estimadas, limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e precisão médios, coeficientes de determinação de calibração e validação ( $R^2_{cal}$  e  $R^2_{val}$ , respectivamente) estimados pelo modelo UPLS, com os respectivos desvios padrão e a recuperação média para cada nível de concentração. As recuperações obtidas por esse modelo foram melhores que as obtidas no modelo univariado e por PARAFAC. Com exceção do primeiro nível de concentração (1,0 µg/L de TRI), todas estão acima de 90 % e abaixo de 100 %, é importante ressaltar que o nível de concentração que obteve recuperação acima de 100 % e maior desvio padrão está abaixo do limite de quantificação do método. O limite de detecção está pouco acima de 0,50 µg/L, e o limite de quantificação ficou pouco acima do obtido nos modelos de regressão univariada e PARAFAC. Os coeficientes de determinação de calibração e validação mostram que o modelo apresentou um bom ajuste linear e a precisão média indica que a dispersão entre os resultados foi muito baixa.

**Tabela 4.3:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão médios, e coeficiente de determinação de calibração e validação estimados pelo modelo UPLS e recuperação média para cada nível de concentração.

<b>[TRI] esperada (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>[TRI] estimada pelo modelo UPLS (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Recuperação média (%)</b>
<b>0,00</b>	0,06 ( $\pm 0,14$ )	---
<b>1,00</b>	1,18 ( $\pm 0,09$ )	117,6 ( $\pm 8,8$ )
<b>3,00</b>	2,91 ( $\pm 0,05$ )	97,1 ( $\pm 1,8$ )
<b>5,00</b>	4,87 ( $\pm 0,17$ )	97,5 ( $\pm 3,5$ )
<b>7,00</b>	6,53 ( $\pm 0,23$ )	93,3 ( $\pm 3,4$ )
<b>9,00</b>	8,57 ( $\pm 0,42$ )	95,3 ( $\pm 4,7$ )
	<b>LD médio</b>	0,52 $\mu\text{g/L}$
	<b>LQ médio</b>	1,57 $\mu\text{g/L}$
	<b>Precisão média</b>	0,07 $\mu\text{g/L}$
	<b><math>R^2_{\text{cal}}</math></b>	0,9999
	<b><math>R^2_{\text{val}}</math></b>	0,9823

Em resumo, pode-se apresentar a Tabela 4.4 onde os valores médios estimados para cada nível de concentração, obtidos a partir dos três modelos, são dispostos lado a lado para facilitar a comparação. A partir dessa tabela e do que já foi discutido anteriormente, é possível observar que a determinação de triantereno em plasma sanguíneo por espectrofluorimetria foi possível com o uso dos três modelos propostos em concentrações acima de 1,57  $\mu\text{g/L}$ , e que o modelo que apresentou os resultados mais próximos do esperado foi o modelo UPLS. Outra vantagem do modelo UPLS em relação aos outros é o fato dele utilizar calibração externa; como os dados obtidos para várias amostras podem ser analisadas juntos, a partir de um único conjunto de calibração, tanto o tempo gasto para análise de dados quanto o tempo de preparo das amostras são menores.

**Tabela 4.4:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão e coeficiente de determinação médios estimados pelos modelos Univariado, PARAFAC e UPLS para o triantereno.

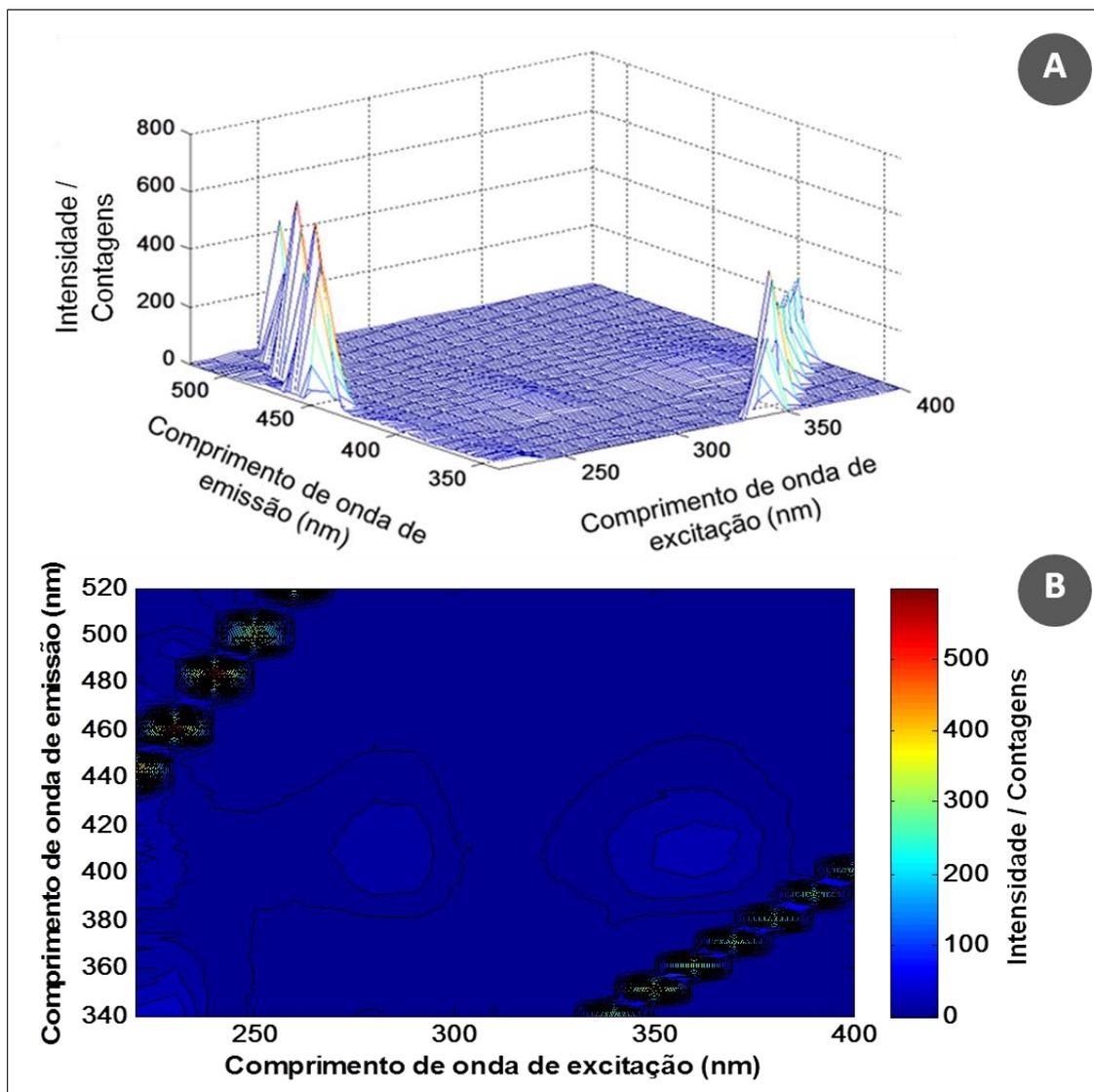
[TRI] esperada ( $\mu\text{g/L}$ )	[TRI] estimada pelos modelos ( $\mu\text{g/L}$ )		
	Univariado	PARAFAC	UPLS
<b>0,00</b>	0,12 ( $\pm 0,06$ )	0,45 ( $\pm 0,08$ )	0,06 ( $\pm 0,14$ )
<b>1,00</b>	0,93 ( $\pm 0,19$ )	0,56 ( $\pm 0,13$ )	1,18 ( $\pm 0,09$ )
<b>3,00</b>	2,52 ( $\pm 0,18$ )	2,16 ( $\pm 0,15$ )	2,91 ( $\pm 0,05$ )
<b>5,00</b>	4,07 ( $\pm 0,09$ )	3,77 ( $\pm 0,15$ )	4,87 ( $\pm 0,17$ )
<b>7,00</b>	5,54 ( $\pm 0,31$ )	5,21 ( $\pm 0,32$ )	6,53 ( $\pm 0,23$ )
<b>9,00</b>	7,59 ( $\pm 0,50$ )	7,22 ( $\pm 0,50$ )	8,57 ( $\pm 0,42$ )
<b>LD médio</b>	0,46 ( $\pm 0,13$ )	0,44 ( $\pm 0,09$ )	0,52
<b>LQ médio</b>	1,37 ( $\pm 0,38$ )	1,31 ( $\pm 0,27$ )	1,57
<b>Precisão média</b>	0,17	0,36	0,07
<b>R<sup>2</sup> médio</b>	0,9993 ( $\pm 0,0003$ )	0,9994 ( $\pm 0,0003$ )	0,9973 ( $\pm 0,0037$ ) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Média entre os coeficientes de determinação de calibração e validação.

#### 4.4 Amilorida

A amilorida também apresenta fluorescência natural em duas regiões diferentes, e assim como o triantereno, sua determinação por espectrofluorimetria também é possível sem a necessidade de etapas de derivatização. Porém como pode ser observado na Figura 4.14, a intensidade de fluorescência da amilorida é bem menor, comparada a do triantereno.

Assim como para o analito descrito anteriormente foi observado a presença de efeito de matriz significativo. Portanto para determinação de amilorida em plasma sanguíneo, três modelos de regressão diferentes foram utilizados a fim de se determinar o mais apropriado. A seguir os resultados obtidos por cada modelo são discutidos individualmente seguida de uma comparação entre eles.



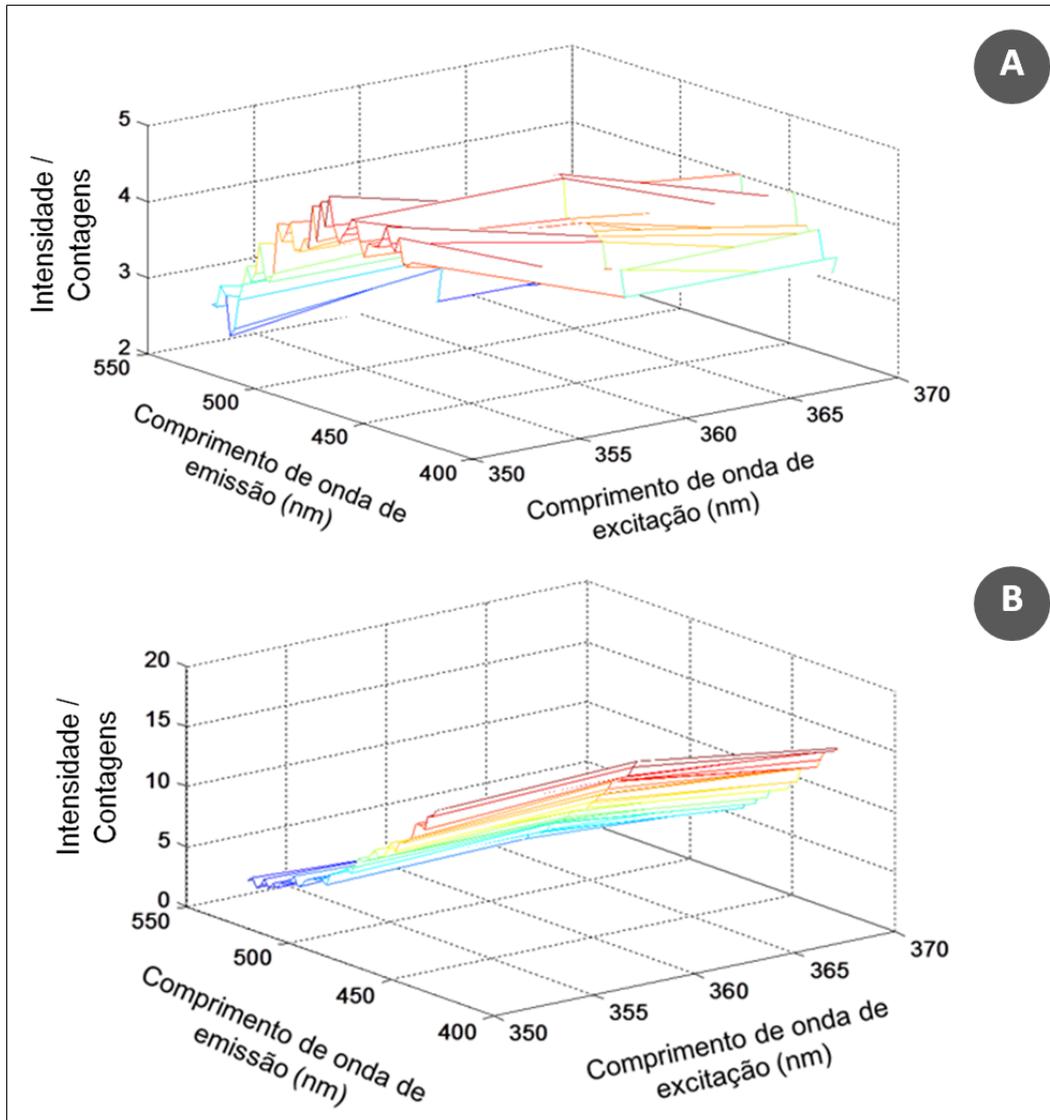
**Figura 4.14:** Espectro de fluorescência (A) e superfície de resposta (B) de um padrão de amilorida 15 µg/L.

#### 4.4.1 Determinação por regressão univariada

Como discutido nas seções anteriores, o plasma sanguíneo também apresenta intensidade de fluorescência na região espectral estudada.

Comparando a Figura 4.14 com a Figura 4.5, percebe-se que a região espectral mais adequada para o desenvolvimento do modelo univariado é próximo à segunda banda espectral da amilorida, aproximadamente entre 350 e 370 nm de excitação e 428 e 520 nm de emissão. A Figura 4.15 apresenta os espectros de fluorescência de uma amostra de plasma não fortificada e de uma amostra com 15,0 µg/L de AML na referida região, onde pode-se observar que

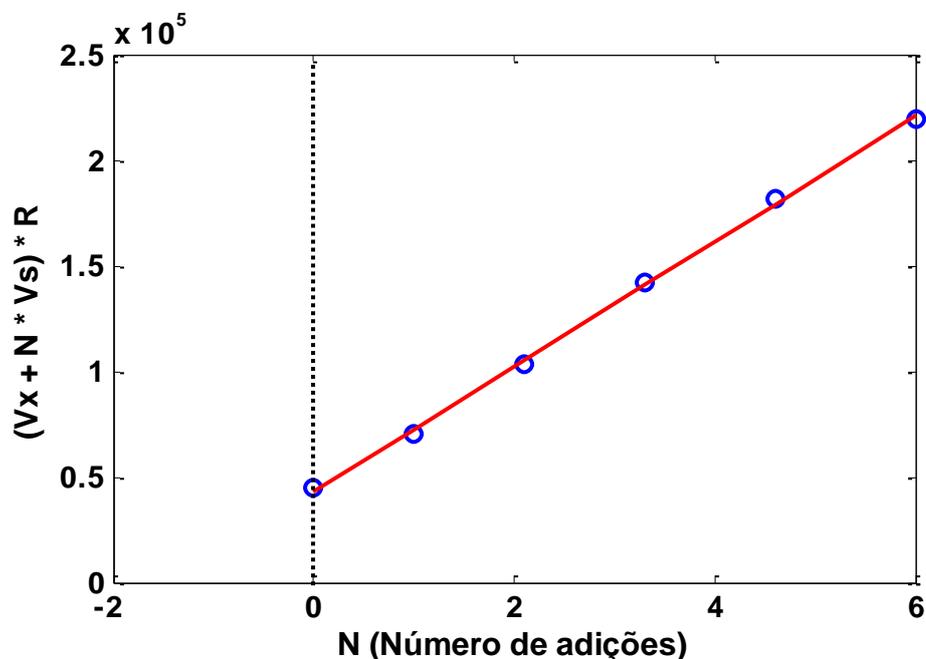
não há espalhamentos Rayleigh e Raman e a intensidade de fluorescência do plasma é aproximadamente um terço da intensidade de fluorescência da amostra fortificada. Cabe ressaltar que essa amostra corresponde ao nível alto de concentração estudado, de forma que uma elevada interferência é observada para AML.



**Figura 4.15:** Espectros de fluorescência, amostra de plasma não fortificada (A), amostra de plasma fortificada, 15,0 µg/L de amilorida (B).

Para realização do modelo univariado utilizou-se os valores de intensidade de fluorescência corrigidos de cada amostra fortificada e das respectivas adições de padrão obtidos em 428 e 360 nm para emissão e excitação, respectivamente. A Figura 4.16 apresenta uma curva de adição de padrão obtida pelo modelo univariado para uma amostra fortificada com 15,0

$\mu\text{g/L}$  de amilorida e suas respectivas adições de padrão. A correção mencionada refere-se à correção abordada nas seções anteriores para o caso especial de adição de padrão em que o volume final é variável.



**Figura 4.16:** Curva de adição de padrão para uma amostra com  $15,0 \mu\text{g/L}$  de AML. Onde  $Vx$  representa o volume inicial da amostra,  $Vs$  o volume de cada adição de padrão,  $R$  as intensidades de fluorescência corrigidas e  $N$  o número de adições de padrão.

A Tabela 4.5 apresenta as concentrações de AML, limites de detecção (LD), quantificação (LQ), precisão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) médios estimados pelo modelo univariado, com os respectivos desvios padrão e a recuperação média para cada nível de concentração. Os limites de quantificação e determinação foram calculados da mesma forma que nas seções anteriores.

**Tabela 4.5:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo univariado e recuperação média para cada nível de concentração.

[AML] esperado (µg/L)	[AML] estimada pelo modelo univariado (µg/L)	Recuperação média (%)
0,00	2,55 (± 1,63)	---
2,50	3,74 (± 0,49)	149,6 (± 19,7)
5,00	5,86 (± 1,81)	117,2 (± 36,3)
7,50	6,27 (± 1,32)	83,7 (± 17,6)
10,00	11,12 (± 2,92)	111,2 (± 29,2)
12,50	10,89 (± 0,80)	87,1 (± 6,4)
15,00	14,19 (± 1,47)	95,9 (± 7,3)
	<b>LD médio</b>	0,79 (± 0,22) µg/L
	<b>LQ médio</b>	2,38 (± 0,65) µg/L
	<b>Precisão média</b>	1,20 µg/L
	<b>R<sup>2</sup> médio</b>	0,9979 (± 0,0012)

É possível perceber que a metade das recuperações obtidas são acima de 100 % e que apresentam elevado desvio padrão, o que muito provavelmente pode ter ocorrido devido à presença de plasma sanguíneo nessa região, como evidenciado pela Figura 4.15. O limite de detecção está abaixo de 1,00 µg/L, entretanto o limite de quantificação ficou acima do nível mínimo de concentração estudado. O coeficiente de determinação mostra que o modelo apresentou um ajuste linear razoável e a precisão média indica que os resultados apresentam uma considerável dispersão entre si. O modelo de regressão univariado mostra que a interferência do plasma foi significativa, mesmo após a etapa de *clean-up* e uso do método de adição de padrão, como pode ser observado pela variação não uniforme nas recuperações e estimativas entre os valores esperados e estimados. Em função da baixa fluorescência do analito em relação à fluorescência do plasma sanguíneo e dos elevados valores de recuperação e respectivos desvios padrões, o modelo de regressão univariado não se mostrou apropriado para determinação de amilorida em plasma sanguíneo.

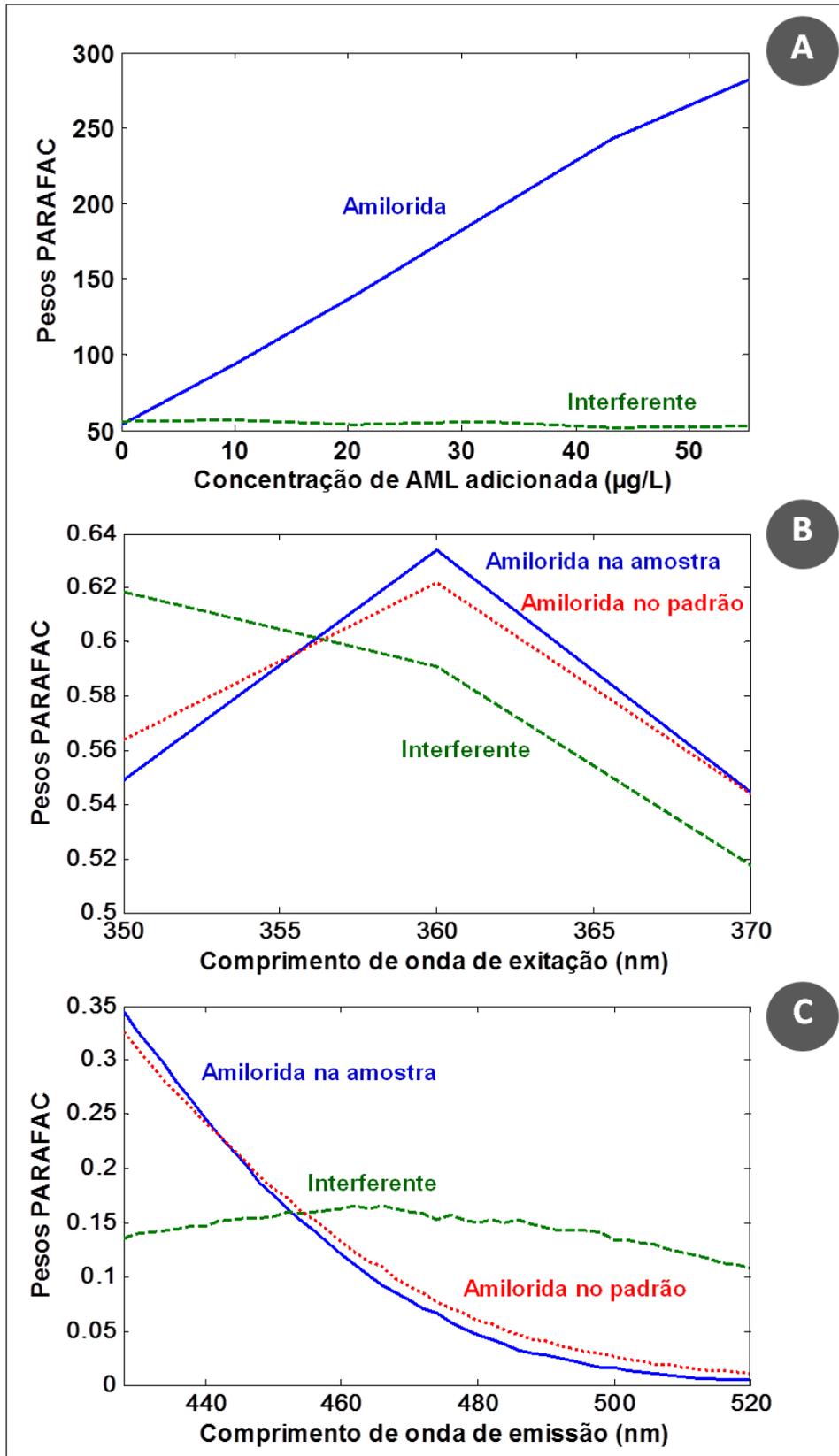
#### 4.4.2 Determinação a través do modelo PARAFAC

Para realização do modelo PARAFAC os dados foram organizados no mesmo arranjo cúbico que para o triantereno (ver Figura 4.8).

Os cubos foram organizadas com 6 amostras (amostra fortificada + 5 adições de padrão), 47 comprimentos de onda de emissão (428 a 520 nm) e 3 comprimentos de onda de excitação (350 a 370 nm); como já discutido no modelo univariado, nessa região espectral não há espalhamentos Rayleigh e Raman e a intensidade de fluorescência do plasma é comparável à do analito nos níveis de concentração abaixo de 10 µg/L.

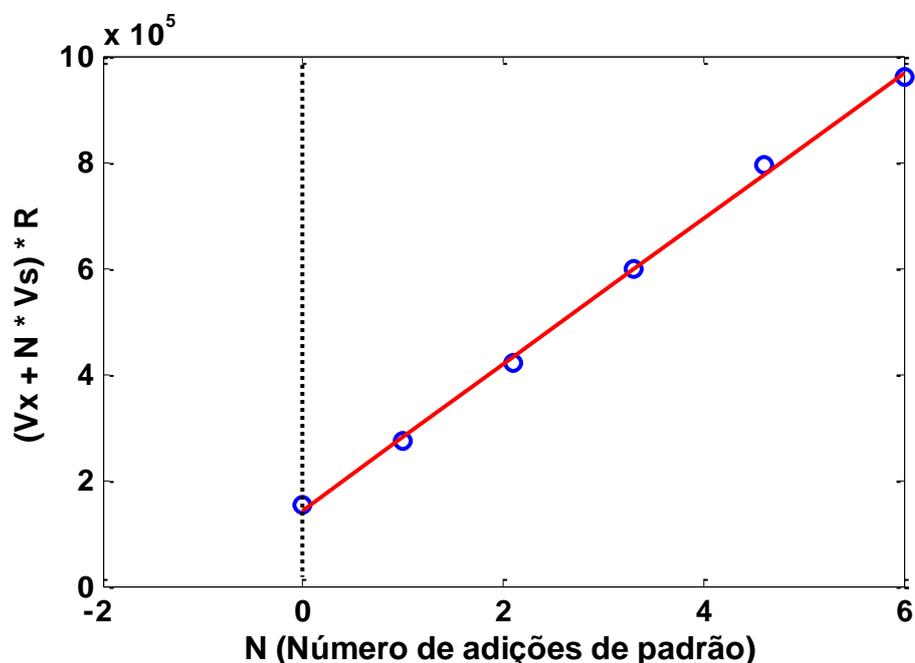
Os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC foram todos obtidos a partir do uso de dois fatores, restrição de não-negatividade em todas as dimensões, e inicialização com os pesos referentes aos espectros de excitação e emissão do PARAFAC obtidos a partir de uma amostra que não foi fortificada com o analito. Essa inicialização foi necessária para ajudar na deconvolução correta dos perfis espectrais do plasma sanguíneo e da amilorida, e consistiu em decompor – com o modelo PARAFAC – um cubo de dados composto por 2 matrizes diferentes, em que uma continha os dados de uma amostra de branco e as sucessivas adições de padrão e a outra continha os dados de uma amostra com 15,0 µg/L de AML (nível máximo de concentração) e as sucessivas adições de padrão.

A Figura 4.17 apresenta os pesos obtidos pelo PARAFAC em função da concentração de AML adicionada e os espectros de fluorescência estimados de uma amostra, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC, onde é possível observar a “separação matemática” que o modelo faz dos espectros do analito e do interferente. Para identificar qual perfil espectral representa a AML, comparou-se os espectros deconvoluídos pelo modelo e os espectros medidos em uma solução padrão. Comparando os espectros estimados e os medidos na solução padrão pode-se observar uma boa concordância, sendo as diferenças observadas provavelmente causadas pela influência da matriz ou por erros de deconvolução.



**Figura 4.17:** Pesos PARAFAC em função da concentração de AML adicionada (A), espectros de fluorescência deconvoluídos, excitação (B) e emissão (C), obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC para uma matriz de amostra (perfis verde e azul) e para uma matriz de padrão (perfil vermelho).

Os pesos PARAFAC relativos à concentração de analito adicionada equivalem ao sinal instrumental isolado, livre dos sinais dos interferentes. A partir desses pesos é possível obter uma regressão análoga à obtida por regressão univariada, empregando o método das adições de padrão. A Figura 4.18 mostra uma reta de adição de padrão, é válido lembrar que nessa regressão, assim como na univariada e nos modelos PARAFAC e univariado desenvolvidos para o TRI, as determinações foram feitas em um caso especial de adição de padrão, onde o volume final é variável. Pode-se observar um ótimo ajuste, com  $R^2=0,9987$ , sendo obtidos resultados similares para as demais amostras.



**Figura 4.18:** Curva de adição de padrão para uma amostra com 15,0  $\mu\text{g/L}$  de AML. Onde  $V_x$  representa o volume inicial da amostra,  $V_s$  o volume de cada adição de padrão,  $R$  os pesos do modelo PARAFAC e  $N$  o número de adições de padrão.

A Tabela 4.6 apresenta as concentrações de AML estimadas, limites de detecção (LD), quantificação (LQ), precisão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) médios estimados pelo modelo PARAFAC, com os respectivos desvios padrão e a recuperação média para cada nível de concentração. É possível perceber que as recuperações obtidas são baixas, todas inferiores a 75 %, o que pode ter ocorrido devido a uma pequena perda de analito na etapa de *clean-up* e/ou por erros de deconvolução do modelo. O limite de detecção também está

abaixo de 1,00 µg/L, e o limite de quantificação abaixo do nível mínimo de concentração estudado. O coeficiente de determinação mostra que o modelo apresentou um bom ajuste linear e a precisão média indica que a dispersão entre os resultados é baixa. No entanto, apesar de os espectros deconvoluídos mostrarem que a “separação matemática” realizada foi eficiente, as baixas recuperações evidenciam a dificuldade de determinar AML em plasma sanguíneo através do modelo PARAFAC, mesmo após a etapa de *clean-up*, uso do método de adição de padrão e da deconvolução realizada pelo modelo PARAFAC, o que pode ser evidenciado pela variação não uniforme dos valores de recuperação.

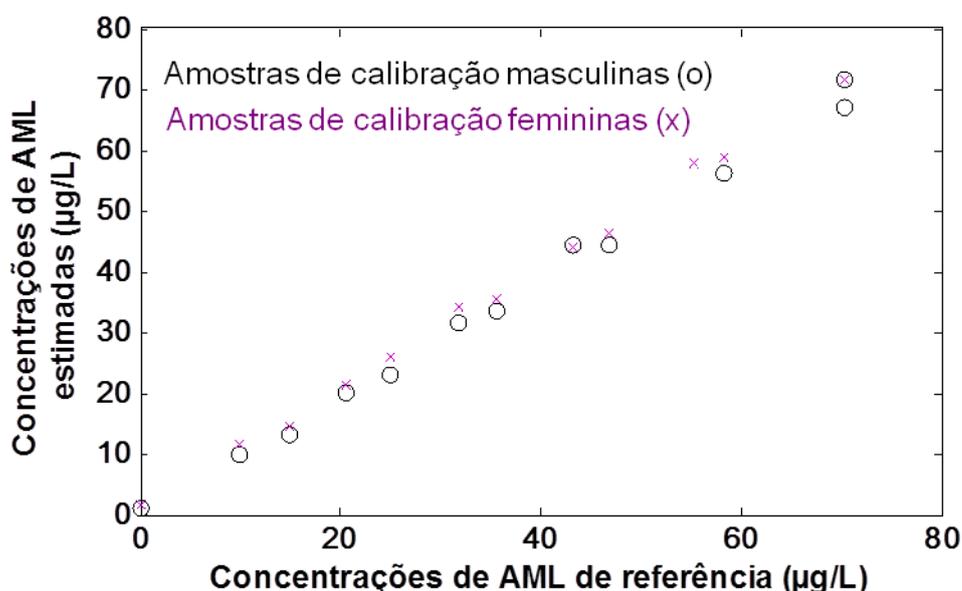
**Tabela 4.6:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelo modelo PARAFAC e recuperação média para cada nível de concentração.

[AML] esperada (µg/L)	[AML] estimada pelo modelo PARAFAC (µg/L)	Recuperação média (%)
<b>0,00</b>	1,08 (± 0,81)	--
<b>2,50</b>	1,19 (± 0,48)	48 (± 19)
<b>5,00</b>	2,61 (± 1,62)	54 (± 32)
<b>7,50</b>	3,53 (± 0,93)	47 (± 12)
<b>10,00</b>	7,47 (± 1,78)	75 (± 18)
<b>12,50</b>	8,79 (± 3,26)	56 (± 26)
<b>15,00</b>	10,36 (± 0,97)	69 (± 6)
	<b>LD médio</b>	0,72 (± 0,23) µg/L
	<b>LQ médio</b>	2,16 (± 0,68) µg/L
	<b>Precisão média</b>	0,21 µg/L
	<b>R<sup>2</sup> médio</b>	0,9981 (± 0,0011)

#### 4.4.3 Determinação por regressão empregando UPLS

Para realização do modelo UPLS, quatro amostras, e as respectivas adições de padrão, foram usadas na calibração, e as demais foram usadas na validação. Dessas quatro amostras usadas na calibração, duas amostras foram do branco, sendo de gêneros diferentes e as outras duas amostras continham 15,0 µg/L de AML (nível máximo de concentração), sendo novamente de gêneros diferentes.

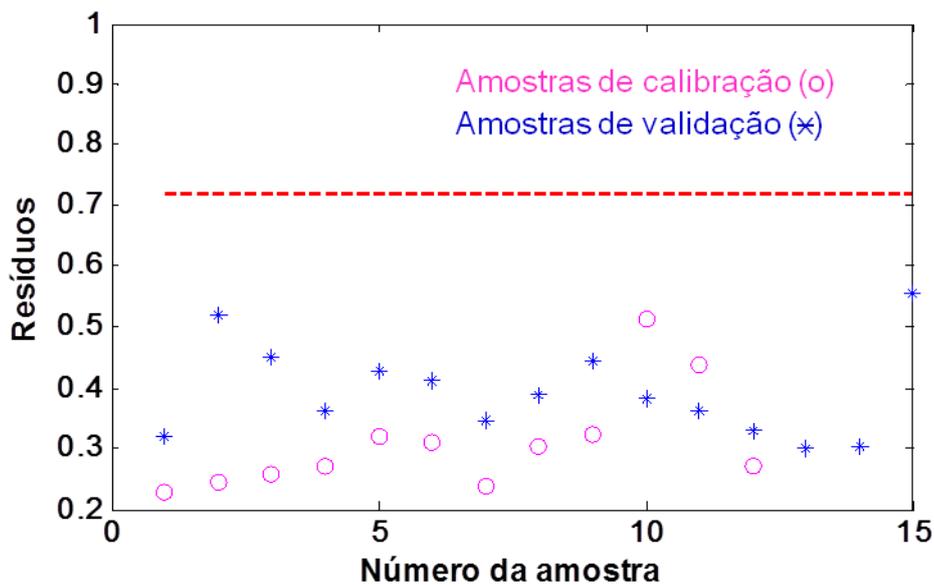
O modelo UPLS para a determinação de TRI, como já discutido anteriormente, foi realizado a partir de uma calibração mista. Para determinação de AML a calibração mista não se mostrou eficiente. Como pode ser observado na Figura 4.19 as amostras femininas e masculinas não podem ser calibradas e analisadas juntas. Observou-se que existe um erro sistemático significativo entre as determinações de amostras masculinas e femininas. Como pode ser observado na Figura 4.19, a estimativa da concentração das amostras femininas é sempre superior à estimativa da concentração das amostras masculinas. Por esse motivo optou-se por separar as amostras masculinas e femininas para realização do modelo UPLS.



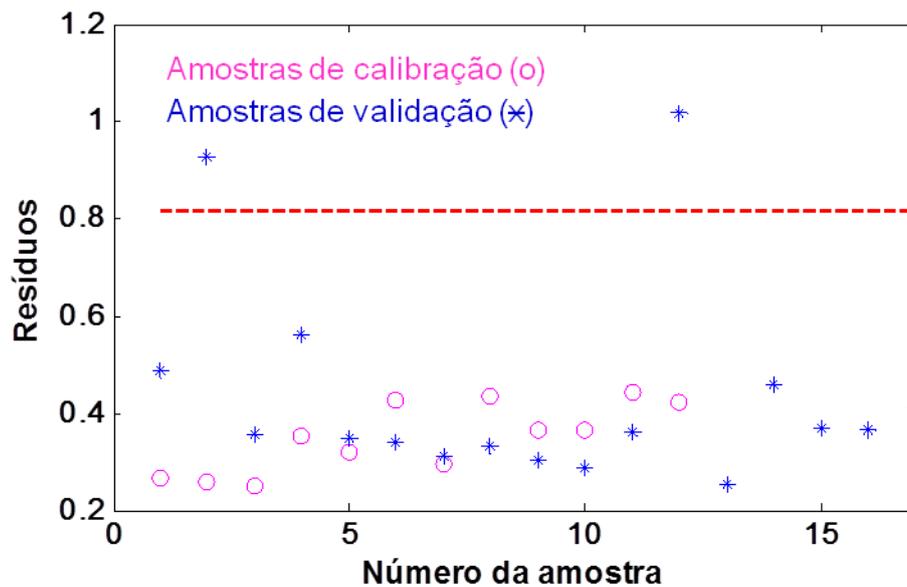
**Figura 4.19:** Gráfico de calibração mista, usando 2 cubos femininos e 2 cubos masculino (branco e nível máximo de concentração – amostra fortificada com 15,0 µg/L de amilorida), 3 variáveis latentes e sem centrar os dados na média.

Os modelos UPLS ajustados para ambos os gêneros (modelados individualmente) foram obtidos a partir do uso de três variáveis latentes e considerando que não existem interferentes diferentes entre as amostras de calibração e validação. No modelo masculino os dados foram centrados na média, e no feminino os dados não foram centrados na média. Sendo esses parâmetros otimizados com base nos erros obtidos para as estimativas de concentração para as amostras de calibração e nos resíduos de deconvolução do UPLS.

A Figura 4.20 e a Figura 4.21 apresentam os gráficos de resíduos de decomposição para as amostras de calibração e validação utilizando 3 variáveis latentes, para as amostras masculinas e femininas respectivamente. Pode-se observar que os resíduos das amostras de calibração e validação estão dentro da mesma faixa de variação, o que indica que nas amostras de validação não são observados interferentes diferentes das amostras de calibração. Observa-se que duas amostras femininas excederam o valor crítico estimado pelo ruído instrumental, o que indica que essas amostras podem apresentar algum interferente diferente das amostras utilizadas na etapa de calibração. Quando um fator foi adicionado ao modelo para modelar esse suposto interferente o valor de concentração estimado não apresentou melhora significativa, sendo que a amostra 12 apresentou elevados erros em comparação com seu valor de referência em todos os modelos de regressão desenvolvidos. Portanto essa amostra foi considerada anômala em todos os casos.

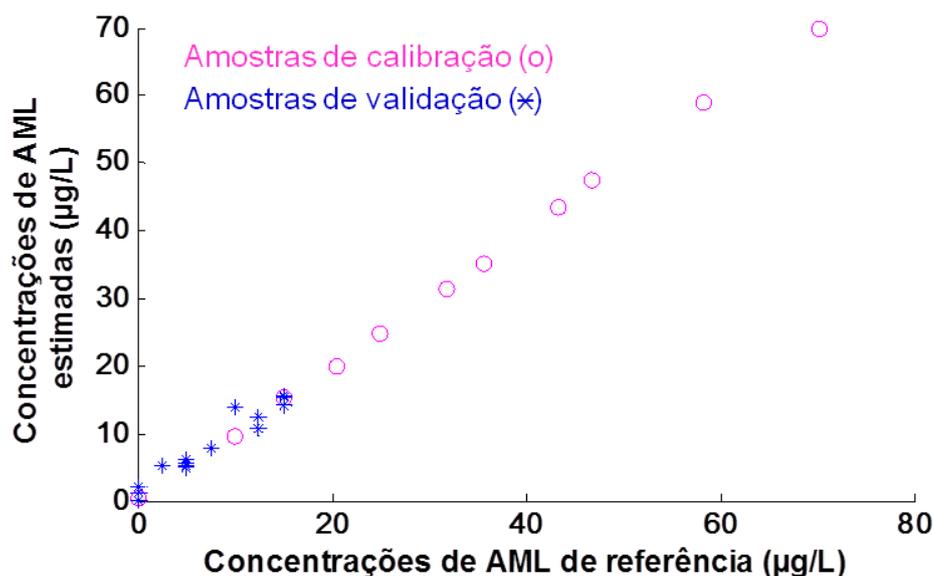


**Figura 4.20:** Resíduos de decomposição para o modelo UPLS masculino com 3 variáveis latentes. Onde as amostras de calibração estão representadas pelas bolinhas em rosa (o), as amostras de validação pelos asteriscos em azul (\*) e o valor crítico estimado pelo ruído instrumental pela linha tracejada em vermelho (---).

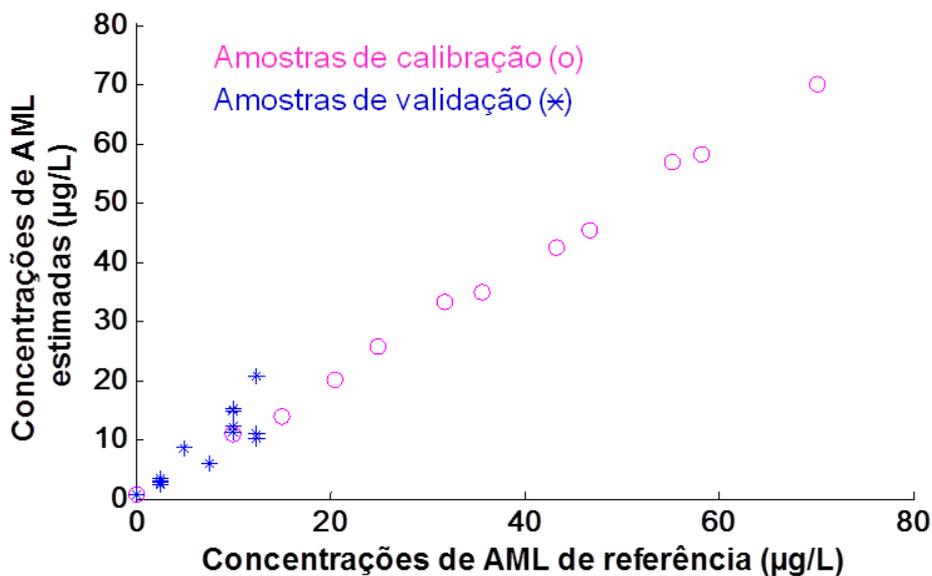


**Figura 4.21:** Resíduos de decomposição para o modelo UPLS feminino com 3 variáveis latentes. Onde as amostras de calibração estão representadas pelas bolas em rosa (o), as amostras de validação pelos asteriscos em azul (\*) e o valor crítico estimado pelo ruído instrumental pela linha tracejada em vermelho (---).

Observando-se a Figura 4.22 e a Figura 4.23, que mostram os gráficos das concentrações de referência versus as concentrações estimadas para os modelos masculino e feminino, respectivamente, observa-se que o modelo masculino apresenta menores erros em relação ao modelo UPLS construído com amostras femininas.



**Figura 4.22:** Concentração de referência versus concentração estimada pelo modelo UPLS masculino.



**Figura 4.23:** Concentração de referência versus concentração estimada pelo modelo UPLS feminino.

A Tabela 4.7 e a Tabela 4.8 apresentam as concentrações de AML estimadas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e precisão médios, coeficientes de determinação de calibração e validação ( $R^2_{cal}$  e  $R^2_{val}$ , respectivamente) estimados pelo modelo UPLS masculino e feminino, com os respectivos desvios padrão e a recuperação média para cada nível de concentração. É importante destacar que, como mencionado na seção 3.3.2.1, o planejamento para uso das amostras de plasma seguiu um padrão aleatório, por esse motivo em alguns níveis de concentração há apenas uma amostra, tanto no modelo masculino quanto no feminino, o que impossibilita o cálculo do desvio padrão.

**Tabela 4.7:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão médios, e coeficiente de determinação de calibração e validação estimados pelo modelo UPLS masculino, e recuperação média para cada nível de concentração.

[AML] esperada ( $\mu\text{g/L}$ )	[AML] estimada pelo modelo UPLS ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação média (%)
0,00	1,17 ( $\pm 1,03$ )	---
2,50	5,28	211,2
5,00	5,54 ( $\pm 0,51$ )	110,70 ( $\pm 10,28$ )
7,50	7,86	104,86
10,00	13,94	139,40
12,50	11,63 ( $\pm 1,67$ )	93,05 ( $\pm 9,34$ )
15,00	15,04 ( $\pm 0,66$ )	100,25 ( $\pm 4,46$ )
	<b>LD médio</b>	2,42 $\mu\text{g/L}$
	<b>LQ médio</b>	7,27 $\mu\text{g/L}$
	<b>Precisão média</b>	0,44 $\mu\text{g/L}$
	$R^2_{\text{cal}}$	0,9996
	$R^2_{\text{val}}$	0,9492

Para o modelo UPLS masculino o nível de concentração 2,5  $\mu\text{g/L}$  está muito próximo ao limite de detecção, o que sugere que ele seja válido apenas para as concentrações acima de desse nível. Considerando apenas os níveis de concentração seguintes, as recuperações e valores estimados obtidos por esse modelo são próximos aos valores esperados, com exceção do nível 10  $\mu\text{g/L}$ , onde foi obtido um valor consideravelmente maior que o esperado. Infelizmente não foram realizadas análises de outras amostras masculinas nesse nível de concentração. Uma vez que para os níveis de concentração superiores a 2,5  $\mu\text{g/L}$  foram obtidos bons resultados, sugere-se que essa única amostra no nível de 10  $\mu\text{g/L}$  seja uma amostra anômala (“*outlier*”). Os coeficiente de determinação de calibração e validação mostram que o modelo apresentou um bom ajuste. A precisão média indica que os valores estimados apresentam baixa dispersão entre os resultados.

**Tabela 4.8:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão médios, e coeficiente de determinação de calibração e validação estimados pelo modelo UPLS feminino, e recuperação média para cada nível de concentração.

[AML] esperada (µg/L)	[AML] estimada pelo modelo UPLS (µg/L)	Recuperação média (%)
0,00	0,86	---
2,50	3,13 (± 0,40)	125,11 (± 16,19)
5,00	8,55	171,00
7,50	6,05	80,69
10,00	13,35 (± 1,96)	133,50 (± 19,56)
12,50	10,59 (± 0,33)	84,69 (± 2,67)
15,00	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>
	<b>LD médio</b>	5,47 µg/L
	<b>LQ médio</b>	16,44 µg/L
	<b>Precisão média</b>	0,92 µg/L
	<b>R<sup>2</sup><sub>cal</sub></b>	0,9977
	<b>R<sup>2</sup><sub>val</sub></b>	0,7965

<sup>b</sup> Amostra utilizada na etapa de calibração.

Para o modelo UPLS feminino o limite de quantificação está acima do nível máximo de concentração estudado, como o intervalo dos níveis de concentração foi escolhido de acordo com a farmacocinética do fármaco, pode-se concluir que o modelo UPLS não pode ser aplicado à amostras femininas no intervalo de concentração estudado. É importante ressaltar também que os resultados estimados pelo modelo UPLS feminino apresentam baixa concordância com os valores esperados.

Em resumo, pode-se apresentar a Tabela 4.9 onde os valores médios estimados para cada nível de concentração, obtidos a partir dos três modelos, são dispostos lado a lado para facilitar a comparação. A partir dessa tabela e do que já foi discutido anteriormente, é possível observar que a determinação de amilorida em plasma sanguíneo masculino por espectrofluorimetria foi possível com o uso do modelo UPLS em concentrações acima de 7 µg/L, e que o modelo apresentou os resultados mais próximos do esperado, acima dessa concentração. Para a determinação em amostra de plasma feminino ou em

amostra cujo sexo seja desconhecido, nenhum dos métodos desenvolvidos pode ser considerado adequado para determinações nesse intervalo de concentração.

**Tabela 4.9:** Valores médios, limites de detecção, quantificação, precisão, coeficiente de determinação médios estimados pelos modelos Univariado, PARAFAC e UPLS masculino para a amilorida.

[AML] esperada ( $\mu\text{g/L}$ )	[AML] estimada pelos modelos ( $\mu\text{g/L}$ )		
	Univariado	PARAFAC	UPLS Masculino
<b>0,00</b>	2,6 ( $\pm$ 1,6)	1,1 ( $\pm$ 0,8)	1,2 ( $\pm$ 1,0)
<b>2,50</b>	3,7 ( $\pm$ 0,5)	1,2 ( $\pm$ 0,5)	5,3
<b>5,00</b>	5,9 ( $\pm$ 1,8)	2,6 ( $\pm$ 1,6)	5,5 ( $\pm$ 0,5)
<b>7,50</b>	6,3 ( $\pm$ 1,3)	3,5 ( $\pm$ 0,9)	7,9
<b>10,00</b>	11,1 ( $\pm$ 2,9)	7,5 ( $\pm$ 1,8)	13,9
<b>12,50</b>	10,9 ( $\pm$ 0,8)	8,8 ( $\pm$ 3,3)	11,6 ( $\pm$ 1,7)
<b>15,00</b>	14,2 ( $\pm$ 1,5)	10,4 ( $\pm$ 1,0)	15,0 ( $\pm$ 0,7)
<b>LD médio</b>	0,79 ( $\pm$ 0,22)	0,72 ( $\pm$ 0,23)	2,42
<b>LQ médio</b>	2,38 ( $\pm$ 0,65)	2,16 ( $\pm$ 0,68)	7,27
<b>Precisão média</b>	1,20	0,21	0,44
<b>R<sup>2</sup> médio</b>	0,9979 ( $\pm$ 0,0012)	0,9981 ( $\pm$ 0,0011)	0,9699 ( $\pm$ 0,0420) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Média entre os coeficientes de determinação de calibração e validação.

## 5 **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nesse trabalho para determinação de amilorida e triantereno em plasma sanguíneo mostraram que é possível realizar essas determinações com a utilização de espectrofluorimetria e calibração de segunda ordem.

O método foi otimizado para uma rotina de laboratório e a precipitação das proteínas plasmáticas com acetonitrila se mostrou uma etapa simples e de grande contribuição para o método, uma vez que diminui significativamente a intensidade de fluorescência da matriz biológica sem interferir na intensidade de fluorescência dos analitos. Porém a etapa de *clean-up* não eliminou completamente a presença de interferentes fluorescentes, sendo necessário o uso de calibração multivariada.

Os modelos univariado, PARAFAC e UPLS foram otimizados, sendo o modelo UPLS o que apresentou melhores estimativas para a determinação de triantereno e amilorida (em amostras masculinas). Para esse segundo analito a determinação em amostras femininas não foi possível com nenhum dos três modelos propostos.

A determinação de triantereno em plasma sanguíneo por espectrofluorimetria e uso do modelo UPLS foi possível em concentrações acima de 0,52 µg/L e sua quantificação em concentrações acima de 1,57 µg/L, valor que está dentro da faixa terapêutica do fármaco.

Já a determinação de amilorida em plasma sanguíneo masculino por espectrofluorimetria e uso do modelo UPLS foi possível em concentrações acima de 2,42 µg/L e sua quantificação em concentrações acima de 7,27 µg/L, valor que também está dentro da faixa terapêutica do fármaco.

É válido lembrar que as amostra analisadas foram diluídas 10 vezes na etapa de *clean-up* e que métodos experimentais que diluam menos a amostra podem ser usados a fim de melhorar o sinal instrumental medido, em especial para a amilorida, que possui baixa intensidade de fluorescência. Nesse estudo a diluição do analito foi necessária, pois a precipitação das proteínas plasmáticas apresentou mais vantagens que a não diluição da amostra.

As regiões espectrais de fluorescência dos dois analitos são diferentes e o triantereno apresenta maior intensidade de fluorescência que a amilorida, o

que explica a maior facilidade em determinar o primeiro fármaco pelo método proposto.

Outro aspecto a ser destacado neste trabalho é a quantidade de amostras de plasma usadas nesse estudo. São poucos os trabalhos que determinam TRI, AML, e fármacos em geral, em plasma sanguíneo. A maioria desses trabalhos usa poucas amostras de plasma, validando os métodos propostos com quase a mesma quantidade de amostras que a utilizada na etapa de calibração. Nesse trabalho um número significativo de amostras foi usado para validação do método proposto.

Por fim, pode-se concluir que os resultados obtidos nesse trabalho ressaltam as vantagens da aplicação de métodos de calibração de segunda ordem na determinação de analitos de interesse em matrizes complexas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. O. Rankin in *Principles of Medicinal Chemistry* (Eds.: W. O. Foye, T. L. Lemke, D. A. Williams), 4ª ed., Williams & Wilkins, USA, **1995**, pp. 405-415.
- [2] Hammam, E.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 1109.
- [3] Deventer, K.; Delbeke, F. T.; Roels, K.; Van Eenoo P.; *Biomed. Chromatogr.* **2002**, *16*, 529.
- [4] Merás, I. D.; Mansilla, A. E.; López, F. S.; Gómez, M. J. R.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 81.
- [5] Pulgarín, J. A. M.; Molina, A. A.; López, P. F.; *Anl. Chim. Acta* **1996**, *326*, 117.
- [6] <http://www.olympic.org/medical-commission>, acessado em outubro de 2013.
- [7] Amin, M. K. R.; Patel, D. R.; Shan, R. J.; Amin, J. M.; Jain, N.; Jain, D. K.; *Der Pharm. Sinica* **2010**, *1*, 117.
- [8] Vidal, A. D.; Barrales, P. O.; Díaz, A. M.; *Talanta* **2002**, *56*, 1005.
- [9] Bechgaard, E.; *J.Chromatogr.* **1989**, *490*, 219.
- [10] Smith, A. J.; Smith, R. N.; *Br. J. Pharmac.* **1973**, *48*, 646.
- [11] Jankowski, A.; Skorek-Jankowska, A.; Lamparczyk, H.; *J. Chromatogr. B* **1997**, *693*, 383.
- [12] Myung, C. S.; Bae, J. W.; Park, Y. S.; Kim, M. J.; Choi, C. I.; Song, Y.; Sa, J. H.; Jang, C. G.; Lee, S. Y.; *J. Liq. Chromotogr. & Rel. Technol.* **2008**, *31*, 2455.
- [13] Forrest G.; McInnes G. T.; Fairhead A. P.; Thompson G. G.; Brodie M. J.; *J. Chromatogr. B: Biomed Sci. Appl.* **1988**, *42*, 123.
- [14] Xu, D. K.; Zhou, J. H.; Yuan, Y. S.; *J. Chromatogr.* **1991**, *567*, 451.
- [15] Jangid, A. G.; Tale, R. H.; Vaidya V. V.; *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 95.
- [16] Song, M.; Hang, T.; Zhao, H.; Wang, L.; Ge, P.; Ma, P.; *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3427.
- [17] Desai, P. B.; Srivastava, A. K.; *Sens. Actuators, B.* **2012**, *169*, 341.
- [18] Sádecká, J.; Polonský, J.; *J. Chromatogr. A.* **1996**, *735*, 403.
- [19] Agência Nacional de Vigilância Sanitária & Fundação Oswaldo Cruz; *Farmacopeia Brasileira, Volume 2- Monografias*, 5<sup>th</sup> ed.; Anvisa, 2010.
- [20] Hamidi, M.; Shahbazi, M. A.; Azimi, K.; *Regul. Toxicol. Pharm.* **2011**, *29*, 149.
- [21] Swart, K. J.; Botha, H.; *J.Chromatogr.* **1987**, *413*, 315.
- [22] Oertel, R.; Richter, K.; Gramatté, T.; Kirck, W.; *J.Chromatogr.* **1998**, *797*, 203.
- [23] Sved, S.; Sertié J. A. A.; McGilveray, I. J.; *J.Chromatogr.* **1979**, *162*, 474.

## Referências Bibliográficas

- [24] Vidal, A. D.; Barrales, P. O.; Díaz, A. M.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2002**, 28, 721.
- [25] Martínez, E. J. L.; Barrales, P. O.; Díaz, A. M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 797.
- [26] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8<sup>th</sup> ed.; Thomson Learning, 2007.
- [27] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Princípios de Análise Instrumental*, 6<sup>th</sup> ed.; Bookman, 2009.
- [28] Sotomayor M. D. P. T.; Dias, I. L. T.; Lanza, M. R. V.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova* **2008**, 31 (7), 1755.
- [29] Sena, M. M.; Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; *Quím. Nova* **2005**, 28 (5), 910.
- [30] Braga, J. W. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2008.
- [31] Escandar, G. M.; Damiani, P. C.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Microchem. J.* **2006**, 82, 29.
- [32] Gómez, V. & Callao, M. P.; *Anal. Chem. Acta* **2008**, 627, 169.
- [33] Escandar, G. M.; Faber, N. K. M.; Goicoechea, H. C.; Peña, A. M.; Olivieri, A. C.; Poppi, R. J.; *Trens Anal. Chem.* **2007**, 26 (7), 752.
- [34] Booksh, K. S. & Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1994**, 66 (15), 782A.
- [35] Bro, R.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Amsterdam, Holanda, 1998.
- [36] <http://www.models.life.ku.dk/algorithms>, acessado em novembro de 2013.
- [37] Thomas, E. V.; *Anal. Chim.* **1994**, 66 (15), 795A.
- [38] Sena, M. M.; Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; *Talanta* **2006**, 68, 1707.
- [39] Bader, M.; *J. of Chem. Educ.* **1980**, 57, 703.
- [40] Bro, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, 38, 149.
- [41] Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J.; *J. Chemom.* **1987**, 1, 41.
- [42] Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S.; *J. Chemom.* **1990**, 4, 79.
- [43] Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S.; *J. Chemom.* **1990**, 4, 135.
- [44] Olivieri, A. C.; *J. Chemom.* **2005**, 19, 253.
- [45] Nascimento, J. W. L.; Omosako, C. E.; Carmona, M. J.; Junior, J. A. O.; Santos, S. R. C. J.; *Ver. Bras. Cienc. Farm.* **2003**, 39 (3), 265.
- [46] ISO 11843-2, *Capability of detection - Part 2: Methodology in the linear calibration case* (ISO 11843-2:2000).
- [47] Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B.; *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 4<sup>th</sup> ed.; Pharmaceutical Press, 2011.

## 7 ANEXOS

### Anexo A – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB.



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

#### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 041/12

Título do Projeto: “Determinação de Diuréticos em Amostra de Urina ou Plasma por Espectrofluorimetria e Calibração de Segunda Ordem”.

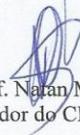
Pesquisadora Responsável: Gabriela Gennari de Souza

Data de Entrada: 17/04/12

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **041/12** com o título: “Determinação de Diuréticos em Amostra de Urina ou Plasma por Espectrofluorimetria e Calibração de Segunda Ordem”, analisado na 5ª Reunião Ordinária, realizada no dia 12 de junho de 2012.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 21 de junho de 2012.

  
Prof. Natan Monsores  
Coordenador do CEP-FS/UnB

### Referências

- <sup>1</sup> [1] G. O. Rankin in *Principles of Medicinal Chemistry* (Eds.: W. O. Foye, T. L. Lemke, D. A. Williams), 4<sup>a</sup> ed., Williams & Wilkins, USA, **1995**, pp. 405-415.
- <sup>2</sup> [2] Hammam, E.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 1109.
- <sup>3</sup> [3] Deventer, K.; Delbeke, F. T.; Roels, K.; Van Eenoo P.; *Biomed. Chromatogr.* **2002**, *16*, 529.
- <sup>4</sup> [4] Merás, I. D.; Mansilla, A. E.; López, F. S.; Gómez, M. J. R.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 81.
- <sup>5</sup> [5] Pulgarín, J. A. M.; Molina, A. A.; López, P. F.; *Anl. Chim. Acta* **1996**, *326*, 117.
- <sup>6</sup> [6] <http://www.olympic.org/medical-commission>, acessado em outubro de 2013.
- <sup>7</sup> [7] Amin, M. K. R.; Patel, D. R.; Shan, R. J.; Amin, J. M.; Jain, N.; Jain, D. K.; *Der Pharm. Sinica* **2010**, *1*, 117.
- <sup>8</sup> [8] Vidal, A. D.; Barrales, P. O.; Díaz, A. M.; *Talanta* **2002**, *56*, 1005.
- <sup>9</sup> [9] Bechgaard, E.; *J. Chromatogr.* **1989**, *490*, 219.
- <sup>10</sup> [10] Smith, A. J.; Smith, R. N.; *Br. J. Pharmac.* **1973**, *48*, 646.
- <sup>11</sup> [11] Jankowski, A.; Skorek-Jankowska, A.; Lamparczyk, H.; *J. Chromatogr. B* **1997**, *693*, 383.
- <sup>12</sup> [12] Myung, C. S.; Bae, J. W.; Park, Y. S.; Kim, M. J.; Choi, C. I.; Song, Y.; Sa, J. H.; Jang, C. G.; Lee, S. Y.; *J. Liq. Chromotogr. & Rel. Technol.* **2008**, *31*, 2455.
- <sup>13</sup> [13] Forrest G.; McInnes G. T.; Fairhead A. P.; Thompson G. G.; Brodie M. J.; *J. Chromatogr. B: Biomed Sci. Appl.* **1988**, *42*, 123.
- <sup>15</sup> [15] Jangid, A. G.; Tale, R. H.; Vaidya V. V.; *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 95.
- <sup>16</sup> [16] Song, M.; Hang, T.; Zhao, H.; Wang, L.; Ge, P.; Ma, P.; *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3427.
- <sup>17</sup> [17] Desai, P. B.; Srivastava, A. K.; *Sens. Actuators, B.* **2012**, *169*, 341.
- <sup>18</sup> [18] Sádecká, J.; Polonský, J.; *J. Chromatogr. A.* **1996**, *735*, 403.
- <sup>19</sup> [19] Agência Nacional de Vigilância Sanitária & Fundação Oswaldo Cruz; *Farmacopeia Brasileira, Volume 2- Monografias*, 5<sup>th</sup> ed.; Anvisa, 2010.

- <sup>20</sup> [13] Hamidi, M.; Shahbazi, M. A.; Azimi, K.; *Regul. Toxicol. Pharm.* **2011**, *29*, 149.
- <sup>21</sup> [17] Swart, K. J.; Botha, H.; *J.Chromatogr.* **1987**, *413*, 315.
- <sup>22</sup> [18] Oertel, R.; Richter, K.; Gramatté, T.; Kirck, W.; *J.Chromatogr.* **1998**, *797*, 203.
- <sup>23</sup> Sved, S.; Sertié J. A. A.; McGilveray, I. J.; *J.Chromatogr.* **1979**, *162*, 474.
- <sup>24</sup> [19] Vidal, A. D.; Barrales, P. O.; Díaz, A. M.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 721.
- <sup>25</sup> [20] Martínez, E. J. L.; Barrales, P. O.; Díaz, A. M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 797.
- <sup>26</sup> Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8<sup>th</sup> ed.; Thomson Learning, 2007.
- <sup>27</sup> Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Princípios de Análise Instrumental*, 6<sup>th</sup> ed.; Bookman, 2009.
- <sup>28</sup> Sotomayor M. D. P. T.; Dias, I. L. T.; Lanza, M. R. V.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova* **2008**, *31* (7), 1755.
- <sup>29</sup> Sena, M. M.; Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; *Quím. Nova* **2005**, *28* (5), 910.
- <sup>30</sup> Braga, J. W. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2008.
- <sup>31</sup> Escandar, G. M.; Damiani, P. C.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Microchem. J.* **2006**, *82*, 29.
- <sup>32</sup> Gómez, V. & Callao, M. P.; *Anal. Chem.Acta* **2008**, *627*, 169.
- <sup>33</sup> Escandar, G. M.; Faber, N. K. M.; Goicoechea, H. C.; Peña, A. M.; Olivieri, A. C.; Poppi, R. J.; *Trens Anal. Chem.* **2007**, *26* (7), 752.
- <sup>34</sup> Booksh, K. S. & Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1994**, *66* (15), 782A.
- <sup>35</sup> Bro, R.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Amsterdam, Holanda, 1998.
- <sup>36</sup> <http://www.models.life.ku.dk/algorithms>, acessado em novembro de 2013.
- <sup>37</sup> Thomas, E. V.; *Anal. Chim.* **1994**, *66* (15), 795A.
- <sup>38</sup> Sena, M. M.; Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; *Talanta* **2006**, *68*, 1707.
- <sup>39</sup> Bader, M; *J. of Chem. Educ.* **1980**, *57*, 703.
- <sup>40</sup> Bro, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *38*, 149.
- <sup>41</sup> Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J.; *J. Chemom.* **1987**, *1*, 41.
- <sup>42</sup> Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S.; *J. Chemom.* **1990**, *4*, 79.
- <sup>43</sup> Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S.; *J. Chemom.* **1990**, *4*, 135.
- <sup>44</sup> Olivieri, A. C.; *J. Chemom.* **2005**, *19*, 253.
- <sup>45</sup> Nascimento, J. W. L.; Omosako, C. E.; Carmona, M. J.; Junior, J. A. O.; Santos, S. R. C. J.; *Ver. Bras. Cienc. Farm.* **2003**, *39* (3), 265.

<sup>46</sup> ISO 11843-2, *Capability of detection - Part 2: Methodology in the linear calibration case* (ISO 11843-2:2000).

<sup>47</sup> Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B.; *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 4<sup>th</sup> ed.; Pharmaceutical Press, 2011.

Λ