Diego Borba dos Santos

**Desenvolvimento de método analítico para a determinação simultânea de
para-cresol e compostos guanidínicos em plasma de cães**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

2014

Dedicatória

Dedico essa dissertação à minha família.

Agradecimentos

Agradeço a minha família pelo constante apoio e incentivo: minha mãe Denise, minha tia Noêmia, meu avô Geraldo, meu irmão Guilherme, minha namorada Thaisa, meu sogros Maisa e Tadeu, meus cunhados Thiago e Susi.

Agradeço aos amigos do CROMA pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Agradeço ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pela orientação desse trabalho, por ser uma pessoa dedicada e sempre estar acompanhando o trabalho desenvolvido de perto e disposto a ajudar. Muito obrigado pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pelo apoio à pesquisa e por ter disponibilizado a infraestrutura do CROMA para o desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro prestado ao trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro também prestado a esse trabalho.

A todos meus amigos e pessoas que participaram de alguma maneira desse trabalho.

RESUMO

O para-cresol (4-metilfenol) e as guanidinas são compostos envolvidos em uma série de processos bioquímicos e fisiológicos. Em condições normais esses compostos são eliminados do organismo pelos rins. Entretanto, em pacientes com doença renal crônica (DRC), esses compostos acumulam nos fluidos biológicos e tecidos, e são de difícil remoção, gerando alta taxa de mortalidade em pacientes humanos hemodialisados. Cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são as técnicas analíticas mais utilizadas para a separação e quantificação de p-cresol e guanidinas. A derivatização pré ou pós-coluna geralmente é empregada para aumentar a volatilidade, absorbância ou fluorescência desses compostos, permitindo a detecção e quantificação. A ninidrina é um dos reagentes mais utilizados para a derivatização das guanidinas pois apresenta alta sensibilidade, solubilidade em água e o procedimento aplicado para a derivatização é simples, permitindo a automação do sistema de preparo de amostras quando necessário. Embora haja vários estudos sobre a concentração e os efeitos desses compostos no sangue de pacientes humanos com DRC, a concentração de p-cresol e das guanidinas no sangue de cães com DRC e os efeitos associados a tais compostos foram pouco estudados. Assim, são necessários estudos similares aos realizados em humanos, para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento veterinário para cães. Para isso, é importante o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a quantificação desses compostos no sangue de cães. Nesse trabalho desenvolveu-se, validou-se e aplicou-se um método para análise de p-cresol e guanidinas em plasma de cães urêmicos com detecção por fluorescência. A reação de derivatização das guanidinas com a ninidrina foi revisada, caracterizada por espectrometria de massas (MS) e otimizada utilizando planejamento fatorial. Foi analisado um total de 63 amostras de plasma de cães incluindo grupo controle e urêmico. A concentração média de guanidina, metilguanidina e p-cresol livre determinada foi maior no grupo urêmico do que no grupo controle, a exemplo do que ocorre em humanos, sugerindo um comportamento metabólico similar desses compostos em cães. O método desenvolvido possibilitou as análises, sendo relativamente simples, evitando um preparo de amostras complexo. Por sua vez, a otimização por planejamento fatorial da reação de derivatização com ninidrina resultou em ganhos na área dos picos cromatográficos que chegaram a 1000%.

ABSTRACT

Para-cresol (4-methylphenol) and guanidino compounds are involved in a series of biochemical and physiological cycles. Under ordinary conditions, these compounds are excreted from the body by healthy kidneys. However, in uremic patients, the concentration of these compounds is highly increased in biological fluids and tissues and is of hard removal, increasing the mortality rate in dialysis patients. Gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) are the most used techniques for separation and quantification of p-cresol and guanidino compounds. For the guanidines determination, derivatizing reactions are usually employed to enhance the absorbance, fluorescence or volatility of these compounds, allowing the quantification. Ninhydrin is one of the most used reagents for derivatization because it shows high sensitivity and presents water solubility. The procedure employed for the derivatization reaction is simple, allowing the automation of sample preparation system, when it is required. There are few studies quantifying the concentration of guanidino compounds and p-cresol in blood of uremic dogs, therefore, a better understanding of the role of these compounds in the metabolism of dogs are needed. For this reason, it is important to develop an analytical method for the quantification of these compounds in dog's blood. The development of a method for simultaneous determination of these compounds, which is not reported in the literature, can improve the analytical productivity, decreasing the time spent with sample preparation and analysis. Here, a method based in reversed-phase HPLC for simultaneous quantification of guanidino compounds and free p-cresol in plasma of uremic dogs with fluorescence detection was developed, validated and applied. For this purpose, the ninhydrin derivatization reaction was reviewed, characterized by mass spectrometry (MS) and optimized using central composite design (CCD). A total of 63 samples of dog plasma, including healthy and uremic groups, were analyzed. The mean concentration of guanidine, methylguanidine and free p-cresol determined by the validated method, for the uremic group, were higher than the healthy group, alike usual for humans, suggesting a similar metabolic behavior of these compounds in dogs. The obtained method is relatively simple avoiding complex sample preparation and the experimentally designed optimization of the ninhydrin reaction by CCD yielded a gain of area as high as 1000% for the chromatographic peaks.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Rota metabólica da tirosina	14
Figura 2 – Estrutura de alguns compostos guanidínicos: (a) creatinina; (b) guanidina; (c) metilguanidina; (d) ácido guanidinoacético	16
Figura 3 – Reação de derivatização da arginina com a ninidrina: (a) formação de álcool terciário; (b) eliminação de álcool em meio ácido	17
Figura 4 – Exemplo de superfície de resposta.	18
Figura 5 – Planejamentos experimentais com três variáveis: (a) planejamento fatorial completo; (b) planejamento CCD	19
Figura 6 - Espectros de absorção UV-Vis das guanidinas e do p-cresol	27
Figura 7 - Espectros de absorção UV-Vis das guanidinas derivatizadas e da ninidrina (branco)	27
Figura 8 – Cromatogramas dos padrões derivatizados de guanidinas com detecção por UV-Vis em 210nm.	28
Figura 9 – Espectro de massas da arginina derivatizada	29
Figura 10 – Cromatograma de padrões de compostos guanidínicos derivatizados e do p-cresol: (a) arginina; (b) guanidina; (c) ácido guanidinoacético; (d) p-cresol; (e) etilguanidina	29
Figura 11 – Espectros de massas da arginina derivatizada pelo método descrito por Buchberger	30
Figura 12 - Gráfico de Pareto dos fatores estudados para a guanidina	32
Figura 13 - Modelos de desejabilidade: (a) KOH; (b) Ninidrina; (c) Ácido Ascórbico; (d) Ácido Fosfórico	33
Figura 14 - Comparação das áreas dos picos sem otimização e após otimização obtida pelo modelo de desejabilidade (cromatograma em vermelho)	33
Figura 15 - Comparação dos detectores UV-Vis e de fluorescência (cromatograma em vermelho)	34
Figura 16 - Cromatogramas de amostras de plasma de cães: (a) Compostos guanidínicos (excitação 390nm; emissão 470nm); (b) p-cresol (excitação 275nm; emissão 300nm)	35
Figura 17 - Curvas analíticas: (a) guanidina; (b) p-cresol; (c) ácido guanidinoacético; (d) metilguanidina	36
Figura 18 – Gráfico de resíduos relativos da guanidina	37
Figura 19 – Gráfico de resíduos relativos da metilguanidina	37
Figura 20 – Gráfico de resíduos relativos do ácido guanidinoacético	37
Figura 21 – Gráfico de resíduos relativos do p-cresol	38

Figura 22 – Cromatograma obtido no desenvolvimento do método de análise de p-cresol total utilizando extração com acetonitrila em uma amostra fortificada do grupo controle	42
Figura 23 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando a acetonitrila como solvente extrator	43
Figura 24 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando NaCl + MgSO ₄ e a acetonitrila como solvente extrator	43
Figura 25 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando acetato de etila como solvente extrator	44
Figura 26 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando éter isopropílico como solvente extrator	44
Figura 27 – Cromatograma da análise de p-cresol total – branco urêmico	46
Figura 28 – Cromatograma da análise de p-cresol total – controle fortificado	46
Figura 29 – Curva analítica do p-cresol no método de análise de p-cresol total	47
Figura 30 - Cromatogramas das determinações de p-cresol livre e total em plasma humano	49
Figura 31 – Cromatogramas das determinações de p-cresol livre e total em soro humano	49
Figura 32 – Cromatogramas das determinações de p-cresol livre e total em amostra do grupo renal	50
Figura 33 – Cromatogramas das análises de p-cresol total em amostras de plasma e soro humano por extração com acetonitrila	51
Figura 34 – Cromatogramas das análises de p-cresol total por extração com acetonitrila comparando as amostras de humanos e as de cães	51
Figura 35 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para o fluxo de 0,38 mL min. ⁻¹ (pressão ~ 230 bar)	53
Figura 36 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para o fluxo de 0,80 mL min. ⁻¹ (pressão ~ 470 bar)	54
Figura 37 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para o fluxo de 0,90 mL min. ⁻¹ (pressão ~ 525 bar)	55
Figura 38 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para o fluxo de 0,95 mL min. ⁻¹ (pressão ~ 540-575 bar)	56
Figura 39 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para o fluxo de 1,00 mL min. ⁻¹ (pressão ~ 590 bar)	57

Lista de tabelas

Tabela 1 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental	23
Tabela 2 - Precisão estimada para os níveis baixo, médio e alto das curvas e exatidão estimada com base nas amostras controle de qualidade (CQ)	36
Tabela 3 – Concentrações determinadas para as amostras de plasma de cães do grupo controle (GC).....	39
Tabela 4 – Concentrações determinadas para as amostras de plasma de cães do grupo urêmico (GU).....	40
Tabela 5 – Comparação das áreas nos diferentes solventes de extração	44
Tabela 6 – Comparação das áreas amostras controle, incubadas e não incubadas	46
Tabela 7 - Precisão estimada para os níveis baixo, médio e alto das curvas e exatidão estimada com base nas amostras controle de qualidade (CQ)	47

Lista de abreviaturas e siglas

AA – ácido ascórbico

AF – ácido fosfórico

ALT – alanina aminotransferase

ANOVA – análise de variância

AST – aspartato aminotransferase

CCD – planejamento fatorial com ponto central e estrela (do inglês “composite central design”)

CE – eletroforese capilar (do inglês “capillary electrophoresis”)

CQ – controle de qualidade

CV – coeficiente de variação

DMF - dimetilfenol

DRC – doença renal crônica

FDA – “U.S. Food and Drug Administration”

GAA – Ácido guanidinoacético

GC – cromatografia gasosa (do inglês “gas chromatography”)

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

GCT – grupo controle

GU – grupo urêmico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “high performance liquid chromatography”)

IRC – insuficiência renal crônica

IS – padrão interno (do inglês “internal standard”)

LC-MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MS – espectrometria de massas

NND - ninidrina

RP-HPLC – cromatografia líquida em fase reversa

UHPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês “ultra high performance liquid chromatography”)

UV-Vis – luz ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doença renal crônica e compostos de retenção urêmica	12
1.2 O para-cresol (4-metilfenol).....	13
1.3 Compostos guanidínicos	15
1.4 Superfícies de resposta e planejamento experimental.....	17
2 OBJETIVOS	20
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1 Reagentes e materiais	21
3.2 Instrumentação	21
3.2.1 Condições cromatográficas	21
3.3 Desenvolvimento de método para análise de guanidina e p-cresol livre	22
3.3.1 Derivatização com ninidrina em meio alcalino	22
3.3.2 Derivatização com ninidrina em meio alcalino e eliminação ácida de álcool.....	22
3.3.3 Otimização da derivatização dos compostos guanidínicos	22
3.4 Amostras	23
3.5 Análises de guanidinas e p-cresol livre nas amostras de plasma de cães	24
3.6 Desenvolvimento de método cromatográfico para análise de p-cresol total em plasma de cães	24
3.7 Análise de p-cresol total em amostras de plasma de cães	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Desenvolvimento do método para análise de guanidina e p-cresol	26
4.2 Otimização da resposta analítica	30
4.3 Análise de guanidinas e p-cresol livre em plasma de cães.....	34
4.4 Desenvolvimento de método para análise de p-cresol total em plasma de cães	41
4.5 Análise de p-cresol total em amostras de plasma de cães	47
4.6 UHPLC	52
5 CONCLUSÃO.....	58
6 REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A análise de fluidos biológicos em laboratórios clínicos é feita a fim de diagnosticar, prevenir e realizar o controle terapêutico de doenças. Ensaios fotométricos, eletroquímicos e imunoensaios são amplamente utilizados pois são padronizados, automatizados e não necessitam de etapas de preparo de amostra manuais. Entretanto, a maioria dessas técnicas são limitadas, permitindo a análise de apenas um parâmetro por vez. As análises mais complexas como monitoramento terapêutico de fármacos, aminas biogênicas, aminoácidos, vitaminas, entre outras, são efetuadas utilizando técnicas cromatográficas e eletroforéticas¹. Uma série de doenças, em particular as desordens metabólicas, causam acúmulo de compostos no sangue e na urina. Técnicas de análise multicomponente como a cromatografia e a eletroforese podem ser aplicadas no diagnóstico de importantes mudanças no perfil metabólico, obtido pela análise de fluidos biológicos². Em pacientes com doença renal crônica, técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) podem ser utilizadas para monitorar metabólitos potencialmente tóxicos, denominados compostos de retenção urêmica, os quais são filtrados pelos rins normalmente em indivíduos saudáveis³.

1.1 Doença renal crônica e compostos de retenção urêmica

Doença renal crônica (DRC) é um termo geral para determinar desordens heterogêneas que afetam a estrutura e o funcionamento dos rins⁴. A doença é classificada em cinco estágios com base na taxa de filtração glomerular, calculada com base na depuração de creatinina endógena variando de leve (taxa de filtração glomerular em torno de 75 mL/min/1,73 m² de superfície corporal) a grave (taxa de filtração glomerular igual ou menor a 10 mL/min/1,73 m² de superfície corporal)^{4,5}.

A síndrome urêmica pode ser definida como a deterioração das funções bioquímicas e fisiológicas do corpo em paralelo com a evolução da DRC, resultando em uma série de sintomas variados. Como resultado da perda da filtração glomerular, os rins dos pacientes com DRC perdem a capacidade de remover do corpo compostos potencialmente tóxicos⁶. Os compostos que se acumulam no sangue e nos tecidos dos pacientes com síndrome urêmica são chamados de

compostos de retenção urêmica⁷, e no caso de apresentarem atividade biológica/bioquímica são chamados de toxinas urêmicas⁶. Esses compostos podem modificar funções bioquímicas e fisiológicas, agravando a síndrome urêmica, resultando em uma intoxicação endógena⁷. Alguns solutos de retenção urêmica, mesmo não apresentando toxicidade, ainda são de interesse, pois podem ser utilizados como marcadores para outros compostos tóxicos. Entre os efeitos tóxicos, danos cardiovasculares são os que geram maior taxa de morbidade e mortalidade, mesmo nos primeiros estágios da DRC.

Os compostos de retenção urêmica podem ser classificados em três grandes grupos com base nas características físico-químicas das moléculas que influenciam sua remoção por diálise ou outros tratamentos relacionados⁶:

1. Compostos solúveis em água com peso molecular até 500 Da, como uréia e creatinina, que são facilmente removidos por diálise;
2. Moléculas com peso molecular maior que 500 Da, como a β_2 -microglobulina. Essas moléculas podem apenas ser removidas empregando-se estratégias especiais de diálise que utilizam membranas porosas;
3. Compostos ligados às proteínas, como fenóis e indóis, que são de difícil remoção mesmo empregando estratégias de diálise de alto-fluxo. Muitos dos compostos desse grupo apresentam toxicidade.

Dentre os compostos de retenção urêmica de grande interesse pode-se destacar o para-cresol e as guanidinas.

1.2 O para-cresol (4-metilfenol)

O p-cresol (4-metilfenol), uma das principais toxinas urêmicas, é um composto fenólico volátil, metabólito da tirosina, produzido principalmente pelas bactérias intestinais, sendo eliminado naturalmente pelos rins saudáveis, mas sendo acumulado em pacientes com DRC^{8,9,10,11}. A Figura 1 ilustra a rota metabólica da tirosina que leva à formação do p-cresol.

Figura 1 – Rota metabólica da tirosina.

Fonte: Adaptação de NIWA, T.; MAEDA, K.; OHKI, T.; SAITO, A.; KOBAYASHI, K. A gas chromatographic-mass spectrometric analysis for phenols in uremic serum. **Clinica Chimica Acta**, v. 110, p. 51-7, 1981.

Estudos sugerem que o p-cresol interfere em uma série de processos bioquímicos e fisiológicos nas concentrações observadas na uremia⁸. Vanholder et al.¹² demonstraram que o p-cresol exerce um efeito inibitório na NADPH-oxidase do sistema enzimático dos granulócitos polimorfonucleares e na sua capacidade de consumo de glicose e produção de radicais livres em resposta à fagocitose. Assim sendo, o p-cresol desempenha uma importante função na suscetibilidade a infecções nos pacientes urêmicos¹³. Outras funções biológicas e fisiológicas também afetadas pelo p-cresol incluem o aumento da fração livre no soro sanguíneo dos fármacos varfarina e diazepam¹⁰ e aumento na permeabilidade e variação na composição da membrana celular^{14,15}. Além disso, essa toxina urêmica possui a capacidade de se ligar fortemente a proteínas, tornando sua remoção difícil pela maioria das técnicas de diálise atualmente disponíveis, incluindo a diálise de alto fluxo¹⁶, por isso vem sendo associada com a alta taxa de mortalidade em pacientes humanos hemodialisados¹⁷. Bray, Thorpe e White¹⁸, em um estudo antigo sobre os metabólitos do tolueno em coelhos, fizeram uma breve revisão sobre os estudos envolvendo a eliminação de p-cresol em animais. Embora há muito tempo esse tema

tenha sido investigado em cães, até o momento não há registros sobre a concentração plasmática dessa toxina durante a síndrome urêmica nessa espécie.

A concentração de p-cresol no soro sanguíneo de pacientes urêmicos tem sido determinada por métodos colorimétricos com nitroanilina¹⁹, cromatografia gasosa (GC)²⁰ e cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS)¹¹. Os métodos colorimétricos são poucos específicos para o p-cresol, não podendo quantificar p-cresol e fenol separadamente, enquanto que os métodos por GC e GC-MS requerem extrações complexas e processos de derivatização antes das análises²¹. Métodos mais específicos para análise do soro sanguíneo de pacientes urêmicos foram desenvolvidos por Niwa²¹ e De Smet⁸, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e detecção por fluorescência. Porém, não foram encontrados estudos na literatura utilizando essa técnica para quantificação de p-cresol no soro sanguíneo de cães urêmicos.

1.3 As guanidinas

As guanidinas são compostos presentes no soro sanguíneo que estão envolvidos em uma série de processos bioquímicos, entre eles os ciclos da uréia e da guanidina. São compostos pequenos e solúveis em água que são excretados do corpo humano pelos rins saudáveis. Entretanto, a concentração desses compostos, principalmente da guanidina, ácido guanidinosuccínico, creatinina e metilguanidina, aumenta nos fluidos biológicos e tecidos de pacientes urêmicos, e alguns desses compostos são considerados toxinas urêmicas^{22,23,24}. Além disso, vários medicamentos importantes contêm um grupo guanidínico, sendo assim importante a utilização de uma metodologia analítica sensível e seletiva para a análise desses compostos²⁵. As estruturas de alguns compostos guanidínicos são representadas na Figura 2. Os procedimentos analíticos para a determinação dos compostos guanidínicos são baseados em HPLC^{24,25,26}, GC^{27,28} e eletroforese capilar (CE)²⁹. Geralmente é empregada derivatização pré-coluna para volatilizar esses compostos ou conferir absorvância ou fluorescência²⁶. Os reagentes utilizados para a derivatização nas determinações por HPLC são ninidrina^{25,30,31}, benzoína³², anisoína³³, furoína³⁴, 9,10-fenantrenoquinona³⁵, 9,10-fenantrenoquinona-3-

sulfonato³⁶ e a piridoína²⁶. A detecção geralmente é feita por espectrofotometria ou espectrofluorimetria^{24,32,33,34,35,36,37}.

Figura 2 – Estrutura de alguns compostos guanidínicos: (a) creatinina; (b) guanidina; (c) metilguanidina; (d) ácido guanidinoacético.

Dentre os reagentes citados para derivatização pré-coluna de compostos guanidínicos em análises por HPLC, a ninidrina apresenta maior sensibilidade às guanidinas, maior solubilidade em água e o procedimento empregado para a reação de derivatização mais simples, com menos etapas de adição de reagentes e aquecimento/resfriamento do que outros reagentes derivatizantes, facilitando assim a automação do sistema^{25,30,31}. A reação da ninidrina com as guanidinas ocorre em meio fortemente básico, formando um aduto com alta eficiência quântica para detecção por fluorescência. Essa reação foi introduzida por Conn e Davis³⁸ em 1959 para detecção e quantificação de compostos como arginina e creatinina. Embora haja vários trabalhos na literatura empregando a reação desenvolvida por Conn e Davis, em um artigo publicado em 2004, Buchberger e Ferdig²⁵ relataram que por razões desconhecidas não conseguiram obter adutos fluorescentes utilizando as condições descritas na literatura para reação da ninidrina com compostos guanidínicos. Os autores modificaram a reação original adicionando uma segunda etapa de eliminação de álcool em meio ácido, levando assim à formação de adutos fluorescentes. A reação da ninidrina com a arginina é ilustrada na Figura 3.

Figura 3 – Reação de derivatização da arginina com a ninidrina: (a) formação de álcool terciário; (b) eliminação de álcool em meio ácido.

Fonte: Adaptação de BUCHBERGER, W.; FERDIG, M. Improved high-performance liquid chromatographic determination of guanidino compounds by precolumn derivatization with ninhydrin and fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 15-16, p. 1309-12, 2004.

Embora haja vários estudos utilizando HPLC para a análise de compostos guanidínicos em sangue de pacientes urêmicos humanos, foram encontrados apenas dois estudos sobre a concentração de guanidinas em cães urêmicos na literatura: Giovanetti & Balestri³⁹ evidenciaram uma alta concentração sanguínea de guanidina em cães urêmicos após ligadura de ureter e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem em casos de DRC. Segundo esses autores a concentração no soro de metilguanidina em cães com anúria foi em média 0,21mg/100mL e em cães normais 0,01mg/100mL. Um único estudo *in vivo* em cães com DRC revelou aumento na concentração plasmática e excreção urinária⁴⁰.

1.4 Superfícies de resposta e planejamento experimental

Superfícies de resposta são modelos matemáticos que ajustam uma resposta como função de determinados fatores, permitindo prever o comportamento de um sistema. Esses modelos podem ser utilizados na otimização das respostas, predição dos níveis das variáveis nos quais é possível obter a resposta desejada e conhecimento do sistema estudado⁴². A modelagem de superfícies de resposta envolve a realização de uma série de experimentos, variando-se sistematicamente os fatores experimentais de acordo com o planejamento experimental utilizado. Nos

experimentos realizados uma ou mais respostas são obtidas e um modelo polinomial correlacionando a resposta com as variáveis é construído por meio de regressão. A equação (1) mostra o modelo resultante para um sistema com três variáveis, x_i , suas interações x_{ij} , e os termos quadráticos x_i^2 . O coeficiente de regressão b_i explica como a resposta y responde às mudanças nas condições experimentais. Os termos x_1x_2 , x_1x_3 e x_2x_3 representam as interações entre as variáveis. Duas variáveis interagem se o efeito de uma variável depende do valor da outra. Em muitos casos a superfície de resposta é curvada e um modelo contendo apenas efeitos principais e interações entre as variáveis não é adequado, sendo necessária a inclusão dos termos quadráticos como x_1^2 e x_2^2 para aumentar a exatidão do modelo⁴³. Na Figura 4 é mostrado um exemplo de superfície de resposta.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad (1)$$

Figura 4 – Exemplo de superfície de resposta.

O termo planejamento experimental é utilizado para: descrever os estágios de identificação de fatores que podem afetar o resultado de um experimento; o planejamento do experimento de forma que variáveis que não possam ser controladas exerçam mínima influência nos resultados; o uso de métodos estatísticos para separar e avaliar o efeito dos vários fatores envolvidos em um experimento⁴⁴.

Os planejamentos mais utilizados para construir-se superfícies de resposta são os planejamentos fatoriais fracionários e completos, Box-Behnken, Doehlert e planejamento fatorial com ponto central. Embora o planejamento fatorial fracionário possa ser utilizado para a construção de superfícies de resposta, geralmente ele é utilizado para determinar as variáveis mais importantes a serem investigadas e quais não afetam significativamente os resultados de um experimento.

Planejamentos fatoriais são amplamente utilizados para investigar os efeitos que causam maior influência nas respostas obtidas de um experimento e as interações entre esses efeitos. Quando cada um dos fatores estudados é variado em dois níveis, o planejamento fatorial é chamado de planejamento fatorial 2^n , onde n é o número de variáveis estudadas. O número de experimentos a serem realizados nesse tipo de planejamento é igual a 2^n . O planejamento fatorial com ponto central e estrela (*central composite design*, ou CCD) é uma ampliação do planejamento fatorial anteriormente mencionado e é amplamente utilizado na otimização de sistemas cromatográficos. Ele consiste de um planejamento fatorial convencional (2 níveis) mais a adição de pontos axiais, como mostrado na Figura 5. Os pontos fatoriais contribuem para estimarem-se os termos de interação e os axiais para os termos quadráticos. Nesse tipo de planejamento é necessária a inclusão de pelo menos um ponto central⁴³.

Figura 5 – Planejamentos experimentais com três variáveis: (a) planejamento fatorial completo; (b) planejamento CCD.

Fonte: Adaptação de SKARTLAND, L. K.; MJOS, S. A.; GRUNG, B. Experimental designs for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6823-31, 2011.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento, a validação e a aplicação de um método para a análise simultânea de guanidina e para-cresol em plasma de cães urêmicos utilizando HPLC. Para o desenvolvimento desse método a reação de derivatização das guanidinas com a ninidrina foi caracterizada por LC-MS e o sinal analítico foi otimizado utilizando-se planejamento experimental.

Como perspectiva futura, avaliou-se o uso de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) para esse tipo de análise.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e materiais

Os padrões de 2,6-dimetilfenol (99,5%), ácido fórmico (98%), ácido guanidinoacético (99%), creatinina (98%), etilguanidina (98%), guanidina (99%), L-arginina (99,5%), metilguanidina, ninidrina e p-cresol (99%) utilizados foram adquiridos de Sigma-Aldrich. O padrão de L-ácido ascórbico (99,7%) foi adquirido de Reagen. A água utilizada foi purificada por uma estação Milli-Q da Millipore. A acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida de Tedia. Foram utilizados dispositivos de ultrafiltração Centrifree de 30.000 Da, adquiridos de Millipore.

3.2 Instrumentação

Nas análises por espectrometria de absorção na região do UV-Vis foi utilizado um espectrofotômetro Jasco modelo v-630. Nas separações foi utilizada uma coluna Kinetex da Phenomenex XB-C18 100 Å (100 x 2,1 mm; 2,6 µm). As análises cromatográficas foram feitas em um HPLC Shimadzu série Prominence 20A, com detector UV/Vis Shimadzu SPD-20A e detector de fluorescência Shimadzu RF-10AxL. Nas análises por espectrometria de massas (MS) foi utilizado um sistema LC-MS/MS híbrido Q-TOF/MS (microTOF-Q II) – Bruker Daltonics. Nas análises por UHPLC e LC capilar foi usado um cromatógrafo ThermoScientific/Dionex modelo Ultimate 3000 equipado com bombas NCS e HPG, forno para colunas com válvulas de 6 e 10 pórticos, injetor automático e detectores UV/Vis variável e com arranjo de fotodiodos.

3.2.1 Condições Cromatográficas

Utilizou-se como fase móvel água purificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. Para a detecção dos compostos guanidínicos foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 390 nm e emissão em 470 nm. Para o p-cresol utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão em 300 nm. Foi utilizado o método de eluição gradiente, com composição da fase móvel variando de 5 – 23% de acetonitrila em 9 minutos, 23 – 50% de acetonitrila em 3 minutos, 50 – 5% em 1 minuto e constante em 5% de acetonitrila por 4 minutos, totalizando o tempo de

análise cromatográfica de 17 minutos. O volume de injeção das amostras processadas foi de 10 µL e a temperatura do forno 45°C

3.3 Desenvolvimento de método para análise de guanidina e p-cresol livre

3.3.1 Derivatização com ninidrina em meio alcalino³¹

Para a derivatização das guanidinas adicionou-se 25 µL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e 5 µL de solução de ninidrina 0,9% (m/v) em 30 µL de soluções de padrão de guanidinas com concentração de 100 mg L⁻¹. As soluções foram agitadas por 5 minutos.

3.3.2 Derivatização com ninidrina em meio alcalino e eliminação ácida de álcool²⁵

Em 400 µL de soluções de padrões guanidínicos adicionou-se 300 µL de KOH 1,3 mol L⁻¹ e 150 µL de ninidrina 0,9%. A mistura foi deixada em descanso por 15 minutos e adicionou-se 100 µL de ácido ascórbico 5% (m/v) e 100 µL de ácido fosfórico 5 mol L⁻¹. Em seguida, a solução foi aquecida em forno a 90°C por 30 minutos e resfriada a temperatura ambiente.

3.3.3 Otimização da derivatização dos compostos guanidínicos

Foi realizado um planejamento experimental com ponto central e estrela (CCD) para otimizar o volume de reagentes utilizados na reação de derivatização dos compostos guanidínicos, a fim de obter melhora no sinal analítico. Foram feitos 30 experimentos em 2 blocos com 6 réplicas no ponto central (3 em cada bloco). O procedimento utilizado nos experimentos foi realizar a derivatização de 400 µL de uma solução de padrões contendo arginina, guanidina, ácido guanidinoacético e etilguanidina conforme o método descrito no item 3.3.2, porém variando-se os volumes de KOH, ninidrina, ácido ascórbico e ácido fosfórico. As variáveis e os níveis utilizados são mostrados na Tabela 2. Após a derivatização as soluções-teste foram injetadas no HPLC com detecção UV-Vis utilizando-se as condições descritas em 3.2 e a área dos picos dos analitos de interesse foi avaliada. O software

Statistica® 7.0 foi utilizado para análise de variância dos resultados (ANOVA) e na construção de modelos de desejabilidade.

Tabela 1 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental.

Variável	Níveis (volume em µL)				
	- α	-1	0	1	α
KOH (6,5 mol L ⁻¹)	5,0	13,8	22,5	31,2	40,0
Ninidrina (1,8 mol L ⁻¹)	5,0	15,0	25,0	35,0	45,0
Ácido ascórbico (10% (m/v))	30,0	47,5	65,0	82,5	100,0
Ácido fosfórico (10 mol L ⁻¹)	5,0	28,8	52,5	76,2	100,0

3.4 Amostras

As amostras de plasma de cães utilizadas foram fornecidas pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Araçatuba, instituição na qual desenvolve-se a linha de pesquisa a qual o projeto desta pesquisa esteve vinculado (Projeto APR FAPESP, processo nº 2011/18746-3). O experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA-00762/2012).

Para o grupo controle (GCT) foram selecionados 10 cães adultos hígidos, de diferentes raças e sexos, sem alteração nos exames clínico geral e laboratoriais (hemograma completo, fibrinogênio plasmático, urinálise tipo I e perfil bioquímico plasmático como ácido úrico, proteína total, albumina, bilirrubina total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia, creatinina, colesterol, fósforo e cálcio total). Animais recentemente tratados com vacina ou medicamento que altera a função leucocitária e o estado antioxidante não foram incluídos no estudo.

Para constituição do grupo urêmico (GU) foram selecionados 20 cães adultos, de diferentes raças e sexos, com uremia atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, São Paulo, Brasil, portadores de IRC com nível 4. O estadiamento da IRC foi feito de acordo com o sistema de estadiamento da *International Renal Interest Society*⁴⁵.

Durante todo o estudo as amostras foram mantidas em freezer a -18°C , sendo descongeladas a temperatura ambiente por aproximadamente 1 h antes do uso.

3.5 Análises de guanidinas e p-cresol livre nas amostras de plasma de cães

Nas análises de guanidinas e p-cresol livre as amostras de plasma de cães foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, sendo retirada uma alíquota de 250 μL do sobrenadante. Em seguida as amostras foram submetidas à ultrafiltração a 6.000 rpm em um dispositivo de ultrafiltração Centrifree de 30.000 Da. Uma alíquota de 100 μL do filtrado foi transferida para um tubo tipo *ependorf* adicionando-se 15 μL de solução dos padrões internos 2,6-dimetilfenol (padrão interno do p-cresol, concentração de $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) e etilguanidina (padrão interno das guanidinas, concentração de $1.500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), 5,6 μL de KOH $6,5\text{ mol L}^{-1}$ e 9,1 μL de solução de ninidrina $1,8\text{ mol L}^{-1}$. Após o tempo de reação de 15 minutos, foi adicionado 49,9 μL de solução de ácido ascórbico 10% (m/v) e 6,45 μL de H_3PO_4 10 mol L^{-1} . As amostras foram submetidas a aquecimento em forno a 90°C por 30 minutos, resfriadas a temperatura ambiente e injetadas no sistema HPLC da Shimadzu descrito em 3.2, utilizando-se as condições cromatográficas descritas em 3.2.1.

3.6 Desenvolvimento de método cromatográfico para análise de p-cresol total em plasma de cães

Nos testes para p-cresol total utilizando a precipitação de proteínas por ácido utilizou-se 15 μL de HCl 6 mol L^{-1} em 100 μL de amostras de plasma fortificados com p-cresol, fenol e 2,6 – DMF nas concentrações de 2 mg L^{-1} . Após, adicionou-se 100 mg de NaCl e 200 μL de um dos solventes extratores (acetonitrila, acetato de etila e éter isopropílico), agitando-se a mistura em agitador do tipo “vórtex” por cerca de 30 segundos e centrifugando-se as amostras a 10.000 rpm por 10 minutos, retirando-se em seguida uma alíquota da fase sobrenadante e injetando-se em HPLC nas mesmas condições descritas em 3.2.1. Em um dos testes utilizando acetonitrila como solvente extrator, além do NaCl adicionou-se 50 mg de MgSO_4 .

3.7 Análise de p-cresol total em amostras de plasma de cães

Para as análises de p-cresol total adicionou-se 15 μL de HCl 6 mol L^{-1} a 100 μL de amostra de plasma de cães. Em seguida adicionou-se 100 mg de NaCl , 200 μL de acetonitrila e agitou-se a mistura em agitador do tipo “vórtex” por cerca de 30 segundos. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e alíquotas das fases sobrenadantes foram transferidas para os vials, sendo injetadas no HPLC com detecção por fluorescência nas mesmas condições descritas na seção 3.2.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método para análise de guanidina e p-cresol

Inicialmente pretendia-se utilizar o detector UV-Vis para as análises do p-cresol e dos compostos guanidínicos. Assim sendo, o primeiro teste realizado foi a varredura de padrões dos analitos na faixa de 200-800 nm a fim de verificar a absorção desses compostos. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 6. Pelos espectros pode-se observar que os compostos guanidínicos testados não apresentam nenhuma banda de absorção significativa no UV-Vis, enquanto que o p-cresol apresenta uma banda de absorção em 275 nm. Para possibilitar a análise das guanidinas com detecção por UV-Vis foi preciso recorrer à derivatização.

Na literatura são descritos vários reagentes para derivatização de guanidinas. Dentre os reagentes disponíveis para a derivatização foi escolhida a ninidrina por apresentar um procedimento mais simples e utilizar reagentes menos tóxicos, sendo utilizado o procedimento descrito na seção 3.3.1. Após a derivatização dos padrões foram obtidos os espectros ultravioleta mostrados na Figura 7. Nesses espectros foi possível observar bandas de absorção em 230 e 250 nm, porém o comprimento de onda máximo para as bandas dos compostos formados pela reação das guanidinas com a ninidrina descrito na literatura é de 390 nm³¹. A ninidrina apresentou as mesmas bandas de absorção das soluções derivatizadas das guanidinas, indicando a possibilidade de não ter ocorrido a reação esperada. Em seguida essas amostras foram injetadas no HPLC utilizando detector UV-Vis em 250 nm. Pelos cromatogramas mostrados na Figura 8 é possível observar que para o ácido guanidinoacético, arginina e guanidina foi detectado um pico com tempo de retenção de aproximadamente 2 min que não foi detectado nas soluções “branco”, creatinina e etilguanidina. Esses resultados indicam a possibilidade de que a reação de derivatização possa ter ocorrido para esses compostos, embora não tenha sido possível observar as bandas de absorção no comprimento de onda relatado na literatura.

Figura 6 - Espectros de absorção UV-Vis das guanidinas e do p-cresol.

Figura 7 - Espectros de absorção UV-Vis das guanidinas derivatizadas e da ninidrina (branco).

Para confirmar se as reações ocorreram as soluções dos padrões derivatizados foram injetadas no sistema LC-MS. O espectro de massas da arginina derivatizada é mostrados na Figura 9. O íon mais abundante apresenta razão massa/carga (m/z) 335, compatível com o aduto formado pela ninidrina e arginina mostrado na reação mostrada na Figura 3-a (massa uma unidade superior ao calculado para o aduto pois a análise foi realizada no modo positivo, com protonação). Os outros compostos analisados também apresentaram m/z compatíveis, indicando que a reação de derivatização da ninidrina com os compostos guanidínicos ocorreu (etilguanidina m/z

248, guanidina 220 m/z). O p-cresol apresentou razão m/z 109, indicando que o composto não reage no procedimento de derivatização dos compostos guanidínicos. Para a creatinina não foi possível obter sinal na análise por LC-MS.

Figura 8 – Cromatogramas dos padrões derivatizados de guanidinas com detecção por UV-Vis em 210 nm.

Os espectros de massa indicaram a ocorrência da reação de derivatização, porém, com o método de derivatização indicado não foi possível obter a separação cromatográfica desejada para os compostos guanidínicos (Fig. 8). Assim, testou-se o método de derivatização com ninidrina proposto por Buchberger²⁵ no qual se adiciona uma etapa de eliminação ácida de álcool (Fig. 3.b) à primeira reação de derivatização, utilizando-se o procedimento descrito na seção 3.3.2. Após a adição dessa segunda etapa de derivatização, o comprimento de onda máximo de absorção no UV-Vis dos compostos guanidínicos derivatizados foi o mesmo que o descrito na literatura (385 nm) e foi possível obter a separação dos compostos guanidínicos como é mostrado no cromatograma da Figura 10.

Figura 9 – Espectro de massas da arginina derivatizada.

Figura 10 – Cromatograma de padrões de compostos guanidínicos derivatizados e do p-cresol: (a) arginina; (b) guanidina; (c) ácido guanidinoacético; (d) p-cresol; (e) etilguanidina.

Na análise mostrada na Figura 10 foi feita a análise simultânea dos compostos guanidínicos com o p-cresol. O comprimento de onda de detecção do p-cresol (275 nm) é diferente do utilizado para os compostos guanidínicos (385 nm). Nos primeiros testes de análise simultânea tentou-se utilizar o detector em dois canais, porém por limitações instrumentais do detector UV-Vis não foi possível

monitorar esses dois comprimentos de onda simultaneamente. Assim, utilizou-se a mudança de comprimento de onda de 385 nm para 275 nm no tempo de eluição do p-cresol, retornando-se para 385 nm após a eluição deste composto.

Também foram obtidos espectros de massa dos picos dos compostos guanidínicos mostrados na Figura 11, no sistema LC-MS, e as razões m/z dos íons mais abundantes concordaram com a estequiometria da reação descrita por Buchberger²⁵. O espectro de massas da arginina é mostrado na Figura 10. Para esse composto, a razão m/z do íon mais abundante foi 317 (modo positivo), razão compatível com a do composto formado na reação mostrada na Figura 3-b. Para os outros compostos analisados também houve concordância entre a razão m/z e a massa calculada para a reação (etilguanidina m/z 230 e guanidina m/z 202).

Figura 11 – Espectros de massas da arginina derivatizada pelo método descrito por Buchberger²⁵.

4.2 Otimização da resposta analítica

Nesse ponto do trabalho, embora tenha sido conseguida a separação dos analitos, os limites de detecção e quantificação obtidos utilizando o detector UV-Vis e o espectrômetro de massas foram da ordem de mg L^{-1} enquanto que o apropriado para as análises a serem realizadas seria na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim sendo, a fim de otimizar os níveis de detecção e quantificação, aumentou-se as concentrações dos reagentes utilizados na reação de derivatização a fim de reduzir o fator de diluição (por meio do uso de menor volume dos reagentes) e realizou-se o planejamento

experimental do tipo CCD das variáveis envolvidas na reação de derivatização dos compostos guanidínicos. Primeiramente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) das respostas para cada um dos analitos e construídos gráficos de Pareto. Para a arginina, guanidina e etilguanidina os fatores que apresentaram maior influência na área dos picos foram o termo quadrático do volume de ácido fosfórico (AF(Q)) e a interação entre o volume de ácido fosfórico e o volume de hidróxido de potássio (AF x KOH). Para o ácido guanidinoacético, os fatores que apresentaram maior influência na área do pico referente a esse analito foram os volumes de KOH, ninidrina (NND) e AF. O gráfico de Pareto obtido para a guanidina é mostrado na Figura 12, onde AA representa o volume de ácido ascórbico.

Foram construídos modelos de desejabilidade para otimizar simultaneamente a área dos 4 analitos estudados na otimização. Os perfis de desejabilidade são mostrados na Figura 13. Os volumes nos quais a desejabilidade é mais próxima de 100% (maior área dos picos) para os quatro analitos estudados na otimização são representados pelas linhas verticais vermelhas do gráfico. Para o KOH temos que o volume ótimo a ser utilizado na reação de derivatização é de 11,2 μL , para a ninidrina é 18,2 μL , para o ácido ascórbico 99,8 μL e para o ácido fosfórico 12,9 μL .

Na Figura 14 são mostrados os cromatogramas com detecção UV-Vis para soluções de padrão de compostos guanidínicos na concentração de 10 mg L^{-1} utilizando os volumes de reagentes para a reação de derivatização descritos por Buchberger e os volumes obtidos pela otimização (cromatograma em vermelho). Comparando a área dos picos obtidos pelos dois métodos foi possível obter-se um aumento da ordem de 215% para a área do pico da arginina, 757% para o pico da guanidina, 1168% para o ácido guanidinoacético e 170% para a área do pico da etilguanidina.

Figura 12 - Gráfico de Pareto dos fatores estudados para a guanidina.

Mesmo com um aumento significativo na detectabilidade dos analitos após a otimização, não foi possível chegar-se aos níveis de detecção requeridos para as análises utilizando o detector UV-Vis. Assim sendo, foram realizados testes com detecção por fluorescência. Na Figura 15 são mostrados os cromatogramas de uma injeção de solução de padrões guanidínicos na concentração de 10 mg L^{-1} com o detector de fluorescência ligado em série com o detector UV-Vis. É possível observar-se um grande aumento na detectabilidade dos compostos na detecção por fluorescência em relação ao UV-Vis. Esse aumento na detectabilidade possibilitou a quantificação e detecção dos analitos na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, um aumento de aproximadamente 1000 vezes em relação ao detector UV-Vis. Assim, o detector de fluorescência foi o utilizado para a análise das amostras de plasma de cães.

Figura 13 - Modelos de desejabilidade: (a) KOH; (b) ninidrina; (c) ácido ascórbico; e (d) ácido fosfórico.

Figura 14 - Comparação das áreas dos picos sem otimização e após otimização obtida pelo modelo de desejabilidade (cromatograma em vermelho; concentração dos padrões: 10 mg L⁻¹).

Figura 15 - Comparação dos detectores UV-Vis e de fluorescência (cromatograma em vermelho).

4.3 Análise de guanidinas e p-cresol livre em plasma de cães

Para as calibrações necessárias às análises das amostras, foi utilizado um “pool” de plasma branco de cães (matriz isenta de níveis detectáveis dos analitos). Essas alíquotas da matriz foram submetidas à ultrafiltração e fortificadas com os padrões dos analitos nas concentrações referentes aos níveis da curva analítica e com os padrões internos. Em seguida essas soluções de calibração foram submetidas à derivatização conforme descrito em 3.5. As curvas foram construídas de acordo com as recomendações da agência US Food and Drug Administration (FDA)⁴⁶ para ensaios bioanalíticos, sendo feitas determinações em 6 níveis de concentração, com quintuplicatas nos pontos baixo, médio e alto, e duplicatas nos outros pontos. Para as curvas analíticas da guanidina e do p-cresol foi utilizada calibração ponderada, sendo que o fator de ponderação foi “(concentração)⁻²”. Também foram realizados ensaios de exatidão com amostras controle de qualidade e de precisão, intra e inter-dias. As análises cromatográficas dos compostos guanidínicos e de p-cresol não foram realizadas de forma simultânea nesta etapa, por limitação instrumental do sistema de detecção. O método empregado anteriormente para a análise simultânea utilizava mudança de comprimento de onda na detecção cromatográfica por UV-Vis. Todavia o modelo do detector de fluorescência usado causou limitações

instrumentais que impediram essa estratégia. Dessa forma, houve a necessidade de fazerem-se duas injeções por amostra em diferentes comprimentos de onda de excitação/emissão, possibilitando uma melhor detecção dos compostos de interesse. Na Figura 16 são mostrados dois exemplos de cromatogramas obtidos. Na Figura 17 são mostradas as curvas analíticas da guanidina, do p-cresol, do ácido guanidinoacético e da metilguanidina e nas Figuras 18-21 seus respectivos gráficos de resíduos relativos. Todas as curvas apresentaram linearidade na faixa estudada e coeficientes de variação abaixo dos estipulados pelo FDA para os ensaios de exatidão e precisão. Na Tabela 2 são mostrados os coeficientes de variação (CV) para os ensaios de precisão e exatidão. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram, respectivamente, 4 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a guanidina, 3 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o p-cresol, 15 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a metilguanidina e 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o ácido guanidinoacético. Esses limites de quantificação e detecção foram estimados previamente por injeções sucessivas dos analitos medindo-se a relação altura do pico/ruído sendo que para o limite de quantificação utilizou-se concentração na qual a altura do sinal do analito fosse pelo menos 10 vezes maior que o ruído e para o limite de detecção, 3 vezes a altura do ruído.

Figura 16 - Cromatogramas de amostras de plasma de cães: (a) Compostos guanidínicos (excitação 390nm; emissão 470nm); (b) p-cresol e demais compostos fenólicos (excitação 275nm; emissão 300nm).

Após a validação do método foram analisadas as amostras de plasma de cães. Ao todo foram analisadas 57 amostras, sendo 21 amostras pertencentes ao

grupo controle e 36 ao grupo renal. As concentrações determinadas para guanidina, metilguanidina, ácido guanidinoacético e p-cresol livre são mostradas nas Tabelas 3 e 4. As análises foram realizadas com uma única injeção por amostra.

Figura 17 - Curvas analíticas: (a) guanidina; (b) p-cresol; (c) ácido guanidinoacético; (d) metilguanidina.

(a)

(b)

(c)

(d)

Tabela 2 - Precisão estimada para os níveis baixo, médio e alto das curvas e exatidão estimada com base nas amostras controle de qualidade (CQ).

Analito	Precisão ponto baixo (conc.)	Precisão ponto médio (conc.)	Precisão ponto alto (conc.)	Exatidão CQ1 (conc.)	Exatidão CQ2 (conc.)	Exatidão CQ3 (conc.)
Guanidina	4,82% (15 µg L ⁻¹)	5,23% (2000 µg L ⁻¹)	6,36% (10000 µg L ⁻¹)	31,63% (250µg/L)	-1,94% (1000 µg L ⁻¹)	-8,55% (3000 µg L ⁻¹)
p-cresol	7,76% (10 µg L ⁻¹)	8,08% (1000 µg L ⁻¹)	3,31% (2600 µg L ⁻¹)	1,87% (250µg/L)	3,61% (700 µg L ⁻¹)	-11,08% (1250 µg L ⁻¹)
Ácido guanidinoacético	7,19% (15 µg L ⁻¹)	6,06% (2000 µg L ⁻¹)	8,12% (10000 µg L ⁻¹)	10,63% (250µg/L)	-1,79% (1000 µg L ⁻¹)	6,70% (3000 µg L ⁻¹)
Metilguanidina	8,85% (100 µg L ⁻¹)	2,06% (2000 µg L ⁻¹)	2,87% (10000 µg L ⁻¹)	22,92% (250µg/L)	-26,77% (1000 µg L ⁻¹)	-3,99% (3000 µg L ⁻¹)

Figura 18 – Gráfico de resíduos relativos da guanidina.

Figura 19 – Gráfico de resíduos relativos da metilguanidina.

Figura 20 – Gráfico de resíduos relativos do ácido guanidinoacético.

Figura 21 – Gráfico de resíduos relativos do p-cresol.

As concentrações médias encontradas para guanidina, p-cresol e metilguanidina concordaram com as concentrações descritas na literatura para análises em plasma de humanos, com níveis desses compostos maiores em pacientes urêmicos do que em pacientes saudáveis (grupo controle). A exceção foi o ácido guanidinoacético, que por motivos ainda não conhecidos foi encontrado em níveis maiores em amostras do grupo controle do que do grupo urêmico, enquanto que em trabalhos encontrados na literatura como o de Kandhro e Kuhawar²⁶, esse composto apresentou uma concentração menor em pacientes saudáveis do que em pacientes urêmicos humanos.

Tabela 3 – Concentrações determinadas para as amostras de plasma de cães do grupo controle (GCT).

Amostra	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Guanidina	p-cresol	Metilguanidina	Ácido Guanidinoacético
GCT-1	77,3	<LQ	<LQ	<LQ
GCT-2	76,7	31,0	<LQ	<LQ
GCT-3	80,4	20,0	<LQ	59,3
GCT-4	65,5	<LQ	<LQ	144,7
GCT-5	66,0	11,8	<LQ	<LQ
GCT-6	90,1	30,9	201,8	61,8
GCT-7	74,5	21,5	<LQ	<LQ
GCT-8	90,2	<LQ	<LQ	174,6
GCT-9	50,5	<LQ	<LQ	154,4
GCT-10	81,9	<LQ	180,0	99,4
GCT-11	88,3	13,6	<LQ	34,1
GCT-12	58,5	29,0	<LQ	<LQ
GCT-13	74,7	42,7	<LQ	28,3
GCT-14	122,0	17,9	<LQ	395,7
GCT-15	163,1	22,0	<LQ	<LQ
GCT-16	41,6	23,2	<LQ	17,4
GCT-17	83,9	<LQ	<LQ	<LQ
GCT-18	68,8	32,7	<LQ	<LQ
GCT-19	73,3	<LQ	<LQ	<LQ
GCT-20	57,2	25,6	338,1	<LQ
GCT-21	87,6	<LQ	<LQ	<LQ

Tabela 4 – Concentrações determinadas para as amostras de plasma de cães do grupo urêmico (GU).

Amostra	Concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Guanidina	p-cresol	Metilguanidina	Ácido Guanidinoacético
GU-1	219,4	405,5	962,3	<LQ
GU-2	205,9	46,9	739,6	<LQ
GU-3	264,7	78,9	877,0	<LQ
GU-4	68,4	41,8	<LQ	<LQ
GU-5	218,1	27,1	944,3	<LQ
GU-6	87,3	40,0	<LQ	<LQ
GU-7	98,9	24,4	648,4	<LQ
GU-8	157,2	<LQ	332,4	<LQ
GU-9	298,3	13,4	2053,8	<LQ
GU-10	128,9	7,6	1330,0	<LQ
GU-11	660,5	80,2	3172,0	<LQ
GU-12	64,1	70,1	<LQ	<LQ
GU-13	63,2	95,2	<LQ	<LQ
GU-14	355,2	111,8	4955,8	<LQ
GU-15	70,6	25,3	182,1	<LQ
GU-16	232,4	38,5	803,6	<LQ
GU-17	283,2	20,7	986,9	<LQ
GU-18	178,0	55,3	1132,0	<LQ
GU-19	151,4	21,8	204,2	ND
GU-20	114,4	ND	189,8	<LQ
GU-21	771,9	122,4	5010,6	<LQ
GU-22	182,0	20,2	207,5	<LQ
GU-23	177,0	19,5	1575,2	<LQ
GU-24	432,5	18,9	211,2	<LQ
GU-25	161,6	<LQ	668,9	<LQ
GU-26	213,0	21,2	114,1	<LQ
GU-27	148,0	120,9	342,2	<LQ
GU-28	244,0	138,4	413,5	<LQ
GU-29	165,5	21,8	474,4	<LQ
GU-30	603,4	50,3	3494,2	ND
GU-31	256,6	65,6	1478,0	<LQ
GU-32	837,8	42,7	3488,5	ND
GU-33	215,2	26,4	1574,4	<LQ
GU-34	16212,7	16,5	<LQ	ND
GU-35	131,3	28,7	<LQ	<LQ
GU-36	232,6	11,0	1552,4	<LQ

4.4 Desenvolvimento de método para análise de p-cresol total em plasma de cães

Como o p-cresol se liga fortemente às proteínas, a maior fração do p-cresol presente no sangue se encontra ligada às proteínas. Assim sendo, para analisar-se a concentração de p-cresol total foi preciso empregar-se um método de desproteinização. Há vários métodos de desproteinização descritos na literatura, a maioria empregando solventes orgânicos, ácidos, sais e íons metálicos. Para os testes iniciais decidiu-se empregar a precipitação com ZnSO_4 pois de acordo com dados presentes na literatura⁴⁷, o ZnSO_4 apresentaria maior eficiência na precipitação de proteínas quando comparado com os métodos de precipitação: por solventes orgânicos, ácidos e sais. Nos testes realizados para precipitação de proteínas com ZnSO_4 utilizou-se a extração com acetato de etila e éter isopropílico. Não foi possível conseguir sinal em nenhum dos solventes de extração testados. Como a utilização de ZnSO_4 na precipitação de proteínas não apresentou resultados satisfatórios testou-se a precipitação com ácido clorídrico. O método testado foi adaptado dos trabalhos de Niwa²¹ e De Smet⁸, utilizando precipitação com ácido clorídrico e extração com acetonitrila, conforme descrito no item 3.6. A Figura 21 mostra o perfil de um cromatograma obtido utilizando esse método. Pelo cromatograma é possível observar que o método conseguiu extrair o p-cresol do plasma, assim como seu padrão interno, o 2,6 – DMF, e que as condições cromatográficas utilizadas tornaram possível a separação do p-cresol.

Figura 22 – Cromatograma obtido no desenvolvimento do método de análise de p-cresol total utilizando extração com acetonitrila em uma amostra fortificada do grupo controle.

Após conseguir-se extrair o p-cresol e o seu padrão interno com a acetonitrila decidiu-se testar outros solventes a fim de obter-se melhora no sinal analítico. Assim, testou-se acetato de etila e éter isopropílico, que foram os solventes utilizados pelos autores dos trabalhos nos quais baseou-se o método utilizado. Para esses testes fortificou-se amostras do grupo controle com p-cresol, 2,6-DMF e fenol na concentração de 2 mg/mL. Procedeu-se como o descrito em 3.6, testando-se os diferentes solventes na extração. Além disso, testou-se um preparo de amostra com acetonitrila utilizando-se NaCl + MgSO₄ (50 mg). Os cromatogramas obtidos são mostrados nas Figuras 22-25. A Tabela 5 compara as áreas dos picos do p-cresol e do 2,6-DMF, assim como a razão entre essas áreas. O solvente no qual obteve-se o maior valor de área absoluta para o p-cresol foi a acetonitrila, seguida pela acetonitrila com MgSO₄, acetato de etila e éter isopropílico. Assim, optou-se por utilizar a acetonitrila como solvente extrator.

Figura 23 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando a acetonitrila como solvente extrator.

Figura 24 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando NaCl + MgSO₄ e a acetonitrila como solvente extrator.

Figura 25 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando acetato de etila como solvente extrator.

Figura 26 – Cromatograma da análise de p-cresol total utilizando éter isopropílico como solvente extrator.

Tabela 5 – Comparação das áreas nos diferentes solventes de extração.

Solvente	Área p-cresol	Área 2,6-DMF (IS)	Razão
Acetonitrila	952101	543486	1,751841
Acetonitrila MgSO4	831021	418099	1,987618
Éter isopropílico	737282	662247	1,113304
Acetato de etila	827046	538912	1,534659

Para garantir uma adequada interação dos compostos fenólicos fortificados com a matriz, incubou-se algumas amostras fortificadas por 30 minutos em banho a 37°C (4 do grupo controle) e em seguida aplicou-se o método para certificar-se que os resultados seriam semelhantes quando fossem analisadas amostras “reais”. As Figuras 27 e 28 mostram os cromatogramas obtidos e a Tabela 6 mostra os valores de área comparando-se as amostras que foram incubadas e as que não foram incubadas. Para as amostras do grupo controle a concentração de p-cresol, fenol e 2,6 - DMF utilizada foi de 1,0 mg/L. Em todas as amostras o volume de injeção utilizado foi de 1 µL. As amostras foram fortificadas com fenol a fim de caracterização. É possível observar pelos valores de área que não houve diferenças significativas nesse teste entre as amostras que foram incubadas e a amostra que não foi incubada, sendo que a diferença na razão área do pico do p-cresol/área do pico do 2,6-DMF foi de -2,13%. Além disso, o coeficiente de variação entre as replicatas calculado foi de 2,54% indicando boa repetibilidade do método.

Assim, após a etapa de desenvolvimento, aplicou-se o método nas amostras de cães do grupo controle e do grupo urêmico.

Figura 27 – Cromatograma da análise de p-cresol total – branco urêmico.

Figura 28 – Cromatograma da análise de p-cresol total – controle fortificado.

Tabela 6 – Comparação das áreas amostras controle, incubadas e não incubadas.

Amostra	Área p-cresol	Área 2,6-DMF (IS)	Razão
Controle 1*	576404	305042	1,889589
Controle 2	499856	257336	1,942425
Controle 3	523568	262972	1,990965
Controle 4	559500	290671	1,924857
Controle 5	532478	285573	1,864595

*Amostra não incubada

4.5 Análise de p-cresol total em amostras de plasma de cães

Para a validação do método de análises de p-cresol total nas amostras de plasma de cães também foi feito um “pool” de amostras do grupo controle para a construção da curva analítica. Essas amostras foram fortificadas com os padrões do p-cresol nas concentrações referentes aos níveis da curva e o padrão interno do p-cresol (2,6-dimetilfenol). O método desenvolvido para a análise de p-cresol total apresentado na seção anterior foi aplicado às amostras fortificadas e a curva analítica obtida é mostrada na Figura 29.

Figura 29 – Curva analítica do p-cresol no método de análise de p-cresol total.

Tabela 7 - Precisão estimada para os níveis baixo, médio e alto das curvas e exatidão estimada com base nas amostras controle de qualidade (CQ).

Analito	Precisão ponto baixo (conc.)	Precisão ponto médio (conc.)	Precisão ponto alto (conc.)	Exatidão CQ1 (conc.)	Exatidão CQ2 (conc.)	Exatidão CQ3 (conc.)
p-cresol	11,39% (30 µg L ⁻¹)	9,27% (1000 µg L ⁻¹)	4,78% (3000 µg L ⁻¹)	-28,69% (300 µg L ⁻¹)	0,18% (750 µg L ⁻¹)	-15,33% (1500 µg L ⁻¹)

A curva apresentou linearidade na faixa estudada e os coeficientes de variação abaixo dos estipulados pelo FDA para os ensaios de exatidão e precisão mostrados na Tabela 7. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram, respectivamente, 10 e 30 µg L⁻¹, que foram estimados como o descrito para as guanidinas e o p-cresol livre. Após a validação, o método foi aplicado às amostras.

Poucas amostras apresentaram sinal analítico, mesmo aquelas em que na análise de p-cresol livre a concentração determinada estava dentro do limite de detecção do método para p-cresol total. Durante a etapa de desenvolvimento o método mostrou-se eficaz para as análises, sendo utilizado plasma de cães tanto do grupo controle quanto urêmico fortificados a fim de caracterizar possíveis efeitos de matriz. Além disso, foram feitos testes de incubação das amostras com aquecimento a fim de testar-se a eficiência do método de desproteinização. Ainda, de acordo com os resultados encontrados na literatura, a concentração de p-cresol total deveria ser bem maior que a de p-cresol livre. Assim, elaborou-se a hipótese de que o problema poderia estar com as amostras, que embora estivessem armazenadas em freezer, poderiam ter sofrido algum tipo de degradação. Para testar essa hipótese, o método foi testado em uma amostra “fresca” de plasma e de soro de origem humana.

Foram testadas amostras de soro e plasma humano na determinação de p-cresol livre e total utilizando a seguinte metodologia:

I – Para a determinação de p-cresol livre uma alíquota de 200 μL de plasma e outra de 200 μL de soro foram ultrafiltradas em dispositivos de ultrafiltração Centrifree, sendo que 100 μL do filtrado de cada amostra foi recolhido e injetado no sistema HPLC;

II – Para a determinação de p-cresol total adicionou-se 30 μL de solução de HCl 6 mol L^{-1} em 200 μL de plasma e de soro para a precipitação das proteínas, sendo que as misturas foram colocadas em ultrassom por 15 min e os sobrenadantes foram submetidos à ultrafiltração. Uma alíquota de 100 μL de cada amostra foi recolhida e injetada no sistema HPLC.

Nas Figuras 30 e 31 são mostrados os cromatogramas obtidos para p-cresol livre e total nas amostras de plasma e soro. É possível observar que tanto para o soro quanto para o plasma não foi possível detectar o pico do p-cresol nas análises de p-cresol livre (abaixo do limite de detecção, 3 $\mu\text{g L}^{-1}$) enquanto que nas análises de p-cresol total foi possível observar o pico no tempo de retenção característico do p-cresol e estimar a concentração do composto nas amostras (378 $\mu\text{g L}^{-1}$ no soro e 364 $\mu\text{g L}^{-1}$ no plasma).

Figura 30 - Cromatogramas das determinações de p-cresol livre e total em plasma humano.

Figura 31 – Cromatogramas das determinações de p-cresol livre e total em soro humano.

O mesmo procedimento para análise de p-cresol livre e total foi aplicado em uma amostra de cão (grupo renal 15732). A área determinada para o pico do p-cresol nas duas análises foi bem próxima (185247 no livre e 181452 no total, Fig.32), indicando que todo o p-cresol presente na amostra se encontrava na forma livre.

Figura 32 – Cromatogramas das determinações de p-cresol livre e total em amostra do grupo renal.

Em outro experimento foi aplicado o método de precipitação com ácido e seguido por extração com acetonitrila nas amostras de soro e plasma humano para a determinação de p-cresol total: em 100 μL de amostra adicionou-se 15 μL de solução de 2,6-dimetilfenol (padrão interno), 15 μL de solução HCl 6 mol L^{-1} , 100 mg de NaCl e 200 μL de acetonitrila. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min, sendo retirada uma alíquota de 50 μL do sobrenadante e injetada no HPLC. Na Figura 33 são mostrados os cromatogramas para as amostras de soro e plasma e em ambas foi possível observar o pico do p-cresol, sendo que as concentrações estimadas de p-cresol foram de 329,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ em plasma e 304,42 $\mu\text{g L}^{-1}$ em soro, sendo que essas concentrações são bem próxima das estimadas pelo método da ultrafiltração. Esse método da extração com acetonitrila foi aplicado nas amostras de cães, porém na maioria das amostras não foi possível detectar o p-cresol. Na Figura 34 é mostrado um cromatograma comparando o plasma de humanos com duas amostras de cães.

Figura 33 – Cromatogramas das análises de p-cresol total em amostras de plasma e soro humano por extração com acetonitrila.

Figura 34 – Cromatogramas das análises de p-cresol total por extração com acetonitrila comparando as amostras de humanos e as de cães.

Os resultados obtidos nas análises de p-cresol livre e total nas amostras de plasma e soro de humanos indicam que ambos os métodos desenvolvidos (precipitação + ultrafiltração ou precipitação + extração) foram capazes de analisar o p-cresol total, discriminando-o da fração livre que é praticamente inexistente nessas amostras de plasma e soro de humano controle. Nas amostras de cães em que se detectou o p-cresol, há fortes indícios de que todo ele se encontra na forma livre,

pois não houve diferenças significativas nas concentrações determinadas de p-cresol livre e total (método da ultrafiltração), ao contrário do que ocorreu nas amostras de origem humana. Além disso, em algumas amostras não se detectou quantidades mensuráveis do p-cresol em resultados repetidos e confirmados.

Segundo A. Cuoghi et al.⁴⁸ o sulfato de p-cresol, um composto análogo ao p-cresol, é estável em plasma a -80°C por mais de três meses. Talvez devido ao armazenamento das amostras de cães por tempo prolongado o p-cresol possa ter se desligado das proteínas e até mesmo degradado, justificando talvez as baixas concentrações de p-cresol livre determinadas nas análises de amostras de cães quando comparadas aos dados da literatura para amostras de humanos.

4.6 Análises por UHPLC

Embora tenha sido possível analisar-se as amostras de plasma de cães por HPLC, decidiu-se testar o UHPLC a fim de obter-se uma otimização da eficiência do método. A coluna utilizada nas análises apresenta eficiência ótima em vazões acima dos 0,38 mL/min utilizados em HPLC, sendo essa vazão limitada no HPLC devido à máxima pressão de trabalho permitida pelo instrumento. Assim, realizou-se algumas injeções dos padrões derivatizados das guanidinas e do p-cresol no UHPLC variando-se a vazão, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente e detecção por ultravioleta, pois não havia disponível no laboratório um detector por fluorescência compatível com o UHPLC e com cela de dimensões compatíveis com UHPLC. As Figuras 35-39 mostram os cromatogramas obtidos para os compostos guanidínicos e p-cresol livre. Pode-se observar que as melhores separações são obtidas a 0,95 mL/min e 1,00 mL/min, sendo que nessas vazões o pico do p-cresol não coelui com nenhum pico dos compostos guanidínicos, sendo possível analisar ambos na mesma corrida. Além disso, utilizando essas condições poderia diminuir-se consideravelmente o tempo de análise.

Figura 35 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para a vazão de 0,38 mL min.⁻¹ (pressão ~ 230 bar).

Figura 36 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para a vazão de 0,80 mL min.⁻¹ (pressão ~ 470 bar).

Figura 37 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para a vazão de 0,90 mL min.⁻¹ (pressão ~ 525 bar).

Figura 38 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para a vazão de 0,95 mL min.⁻¹ (pressão ~ 540-575 bar).

Figura 39 – Cromatogramas das guanidinas (a) e p-cresol (b) para a vazão de 1,00 mL min.⁻¹ (pressão ~ 590 bar).

5 CONCLUSÃO

No primeiro método de derivatização testado (sem etapa de eliminação de álcool em meio ácido) foi possível obter os compostos previstos na literatura, confirmando-os por LC-MS de alta resolução, porém não foi possível separá-los utilizando coluna cromatográfica C18 e nem detectá-los no comprimento de onda relatado na literatura. Já o segundo método testado possibilitou a separação e detecção dos compostos, entretanto em concentrações acima daquela adequada para as análises de amostras de plasma, sendo que a otimização da reação utilizando planejamento experimental e superfícies de resposta e a mudança do detector UV-Vis para um detector de fluorescência possibilitou a redução dos LQ's e LD's para um nível adequado para as análises.

O método desenvolvido para análise de guanidinas e p-cresol livre em amostras de plasma de cães foi validado e possibilitou a análise dos analitos desejados sendo que as concentrações determinadas concordaram com as encontradas na literatura para amostras de plasma de humanos, com níveis de guanidina, metilguanidina e p-cresol maiores em amostras do grupo urêmico e menores em amostra do grupo controle, com exceção do ácido guanidinoacético, que apresentou concentrações maiores em amostras do grupo controle.

Nas análises de p-cresol total, embora não tenha sido possível quantificar as amostras de plasma de cães, os testes feitos com amostras de plasma humano fresco indicam que o método desenvolvido funciona e que devido ao alto tempo de armazenamento das amostras de plasma de cães o p-cresol presente na mesma pode ter se degradado.

Os testes feitos com UHPLC indicam que o método é viável para a análise de guanidinas e p-cresol, sendo possível diminuir o tempo de corrida e melhorar a separação dos compostos. O método não foi aplicado às amostras pois não havia disponível no laboratório um detector de fluorescência compatível com o UHPLC.

6 REFERÊNCIAS

- 1 KORTZ, L.; HELMSCHRODT, C.; CEGLAREK, U. Fast liquid chromatography combined with mass spectrometry for the analysis of metabolites and proteins in human body fluids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2635-44, 2011.
- 2 JELLUM, E.; DOLLEKAMP, H.; BRUNSVIG, A.; GISLEFOSS, R. Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 689, n. 1, p. 155-64, 1997.
- 3 CALAF, R.; CERINI, C.; GENOVESIO, C.; VERHAEGHE, P.; JOURDE-CHICHE, N.; BERGE-LEFRANC, D.; GONDOUIN, B.; DOU, L.; MORANGE, S.; ARGILES, A.; RATHELOT, P.; DIGNAT-GEORGE, F.; BRUNET, P.; CHARPIOT, P. Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 23, p. 2281-6, 2011.
- 4 LEVEY, A. S.; CORESH, J. Chronic kidney disease. **Lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165-80, 2012.
- 5 RYUZO, M. C.; MACEDO, C. S.; ASSAO, A. E.; FEKETE, S. M. W.; TRINDADE, A. A. T.; BASTOS, H. D. Insuficiência crônica renal na criança: aspectos clínicos, achados laboratoriais e evolução. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 25, n. 4, p. 200-8, 2003.
- 6 VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1211-21, 2008.
- 7 VANHOLDER, R.; DE SMET, R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 8, p. 1815-23, 1999.
- 8 DE SMET, R.; DAVID, F.; SANDRA, P.; VAN KAER, J.; LESAFFER, G.; DHONDT, A.; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 278, n. 1, p. 1-21, 1998.
- 9 CURTIUS, H. C.; METTLER, M.; ETTLINGER, L. Study of the intestinal tyrosine metabolism using stable isotopes and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 126, p. 569-80, 1976.
- 10 BREGA, A.; PRANDINI, P.; AMAGLIO, C.; PAFUMI, E. Determination of phenol, m-, o- and p-cresol, p-aminophenol and p-nitrophenol in urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 535, n. 1-2, p. 311-6, 1990.

- 11 NIWA, T.; MAEDA, K.; OHKI, T.; SAITO, A.; KOBAYASHI, K. A gas chromatographic-mass spectrometric analysis for phenols in uremic serum. **Clinica Chimica Acta**, v. 110, n. 1, p. 51-7, 1981.
- 12 VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; WATERLOOS, M. A.; VAN LANDSCHOOT, N.; VOGELEERE, P.; HOSTE, E.; RINGOIR, S. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. **Kidney International**, v. 47, n. 2, p. 510-7, 1995.
- 13 VANHOLDER, R.; RINGOIR, S. Infectious morbidity and defects of phagocytic function in end-stage renal disease: a review. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 9, p. 1541-54, 1993.
- 14 HEIPIEPER, H. J.; KEWELOH, H.; REHM, H. J. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1213-7, 1991.
- 15 KEWELOH, H.; DIEFENBACH, R.; REHM, H. J. Increase of phenol tolerance of Escherichia coli by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. **Archives of Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 49-53, 1991.
- 16 DE CARVALHO, J. T., Jr.; DALBONI, M. A.; WATANABE, R.; PERES, A. T.; GOES, M. A.; MANFREDI, S. R.; CANZIANI, M. E.; CENDOROGLO, G. S.; GUIMARAES-SOUZA, N.; BATISTA, M. C.; CENDOROGLO, M. Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Artificial Organs**, v. 35, n. 2, p. E27-32, 2011.
- 17 BAMMENS, B.; EVENEPOEL, P.; KEULEERS, H.; VERBEKE, K.; VANRENTERGHEM, Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 69, n. 6, p. 1081-7, 2006.
- 18 BRAY, H. G.; THORPE, W. V.; WHITE, K. Metabolism of derivatives of toluene. 4. Cresols. **Biochemical Journal**, v. 46, n. 3, p. 275-8, 1950.
- 19 WARDLE, E. N.; WILKINSON, K. Free phenols in chronic renal failure. **Clinical Nephrology**, v. 6, n. 2, p. 361-4, 1976.
- 20 WENGLE, B.; HELLSTROM, K. Volatile phenols in serum of uraemic patients. **Clinical Science**, v. 43, n. 4, p. 493-8, 1972.
- 21 NIWA, T. Phenol and p-cresol accumulated in uremic serum measured by HPLC with fluorescence detection. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 108-11, 1993.

- 22 DE DEYN, P. P.; D'HOOGHE, R.; VAN BOGAERT, P. P.; MARESCAU, B. Endogenous guanidino compounds as uremic neurotoxins. **Kidney International**, v. 78, p. S77-83, 2001.
- 23 DE DEYN, P. P.; MACDONALD, R. L. Guanidino compounds that are increased in cerebrospinal fluid and brain of uremic patients inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. **Annals of Neurology**, v. 28, n. 5, p. 627-33, 1990.
- 24 HANAI, T.; INAMAOTO, Y.; INAMOTO, S. Chromatography of guanidino compounds. **Journal of Chromatography B**, v. 747, n. 1-2, p. 123-38, 2000.
- 25 BUCHBERGER, W.; FERDIG, M. Improved high-performance liquid chromatographic determination of guanidino compounds by precolumn derivatization with ninhydrin and fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 15-16, p. 1309-12, 2004.
- 26 KANDHRO, A. J.; KHUHAWAR, M. Y. HPLC determination of guanidino compounds in serum of uremic patients using pyridoin as derivatizing reagent. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 1393-404, 2010.
- 27 HUNNEMAN, D. H.; HANEFELD, F. GC-MS determination of guanidinoacetate in urine and plasma. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 20, n. 3, p. 450-2, 1997.
- 28 STRUYS, E. A.; JANSEN, E. E.; TEN BRINK, H. J.; VERHOEVEN, N. M.; VAN DER KNAAP, M. S.; JAKOBS, C. An accurate stable isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric approach to the diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, n. 4-5, p. 659-65, 1998.
- 29 ZINELLU, A.; CARIA, M. A.; TAVERA, C.; SOTGIA, S.; CHESSA, R.; DEIANA, L.; CARRU, C. Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector. **Analytical Biochemistry**, v. 342, n. 2, p. 186-93, 2005.
- 30 KOBAYASHI, Y.; KUBO, H.; KINOSHITA, T. Post-column derivatization system for the fluorimetric determination of guanidino compounds with ninhydrin by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 400, p. 113-21, 1987.
- 31 BOPPANA, V. K.; RHODES, G. R. High-performance liquid chromatographic determination of guanidino compounds by automated pre-column fluorescence derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 506, p. 279-88, 1990.
- 32 KAI, M.; MIYAZAKI, T.; OHKURA, Y. High-performance liquid chromatographic measurement of guanidino compounds of clinical importance in human urine and serum by pre-column fluorescence derivatization using benzoin. **Journal of Chromatography**, v. 311, n. 2, p. 257-66, 1984.

- 33 GATTI, R.; GIOIA, M. G. Anisoin: a useful pre-chromatographic derivatization fluorogenic reagent for LC analysis of guanidino compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 1, p. 11-6, 2006.
- 34 GATTI, R.; GIOIA, M. G.. Liquid chromatographic of guanidino compounds using furoin as a new fluorogenic reagent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 754-59, 2008.
- 35 KAI, M.; MIYAZAKI, T.; SAKAMOTO, Y.; OHKURA, Y. Use of benzoin as pre-column fluorescence derivatization reagent for the high-performance liquid chromatography of angiotensins. **Journal of Chromatography**, v. 322, n. 3, p. 473-7, 1985.
- 36 YONEKURA, S.; KIHARA, M.; IWASAKI, M.; KAI, M. Chemiluminogenic reaction of arg-containing peptides with benzoin or its analogues. **Analytical Science**, v. 13, p. 479-83, 1997.
- 37 CARDUCCI, C.; BIRARELLI, M.; LEUZZI, V.; CARDUCCI, C.; BATTINI, R.; CIONI, G.; ANTONOZZI, I. Guanidinoacetate and creatine plus creatinine assessment in physiologic fluids: an effective diagnostic tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 1772-8, 2002.
- 38 CONN, R. B.; DAVIS, R. B. Green fluorescence of guanidinium compounds with ninhydrin. **Nature**, v. 183, p. 1053-55, 1959.
- 39 GIOVANNETTI, S.; BALESTRI, P. L.; BARSOTTI, G. Methylguanidine in uremia. **Arch Intern Med**, v. 131, n. 5, p. 709-13, 1973.
- 40 BROOKS, D. P.; RHODES, G. R.; WOODWARD, P.; BOPPANA, V. K.; MALLON, F. M.; GRIFFIN, H. E.; KINTER, L. B. Production of methylguanidine in dogs with acute and chronic renal failure. **Clinical Science**, v. 77, n. 6, p. 637-41, 1989.
- 41 RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, n. 1-2, p. 201-5, 2007.
- 42 DRAPPER, N. R.; LIN, D. K. J. Response surfaces and models. In: **HANDBOOK of Statistics 13: Design and analysis**. North-holland: Elsevier, 1996. v. 13, p. 343-75.
- 43 SKARTLAND, L. K.; MJOS, S. A.; GRUNG, B. Experimental designs for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6823-31, 2011.

- 44 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Harlow: Pearson Educated Limited, 2005. 288 p.
- 45 International renal interest society (Iris). Iris staging of CKD 2006. Disponível em <[http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS 2006 Staging of CKD.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS%2006%20Staging%20of%20CKD.pdf)>.
- 46 U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Maio de 2001. Disponível em <www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf>.
- 47 POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogry B**, v. 785, n. 2, p. 263-75, 2003.
- 48 CUOGHI, A.; CAIAZZO, M.; BELLEI, E.; MONARI, E.; BERGAMINI, S.; PALLADINO, G.; OZBEN, T.; TOMASI, A. Quantification of p-cresol sulphate in human plasma by selected reaction monitoring. **Anal Bioanal Chem**, v. 404, n. 6-7, p. 2097-104, 2012.