

*Vanessa
Moreira
em 2002*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Triagem de diuréticos por cromatografia a líquido de alta
eficiência com finalidade de controle da dopagem no esporte

Vanessa Moreira,

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Regina Lúcia M. Moreau

São Paulo
2002

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Triagem de diuréticos por cromatografia a líquido de alta
eficiência com finalidade de controle da dopagem no esporte

Vanessa Moreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Regina Lúcia M. Moreau

São Paulo
2002

17026

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004434

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

Moreira, Vanessa

M838t Triagem de diuréticos por cromatografia líquida de alta
eficiência com finalidade de controle de dopagem no esporte/
Vanessa Moreira. -- São Paulo, 2002.
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador : Moreau, Regina Lúcia de Moraes

1. Cromatografia líquida de alta eficiência : Análise toxicológica
2. Medicina esportiva : Dopagem I. T. II. Moreau, Regina Lúcia
de Moraes, orientador.

615.907 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Vanessa Moreira

**Triagem de diuréticos por cromatografia a líquido de alta
eficiência com finalidade de controle da dopagem no esporte**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lúcia M. Moreau
orientador/presidente

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva
1º. examinador

Dra. Miriam Clara Salvadori
2º. examinador

São Paulo, 18 de janeiro de 2002.

A Deus,
pela vocação que me foi concedida...

*Aos meus pais, **Antonio Carlos e Élia**,
aos meus irmãos, **Marcelo e Alessandro**
e ao meu tio, **Ivo**, por sempre acreditarem em mim
e por serem meus exemplos de dedicação
ao estudo e ao trabalho.*

Ao **Eduardo**, anjo que cruzou o meu caminho e
me fez sentir alegria com pequenos gestos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Regina Lúcia de Moraes Moreau, por ter me dado incentivo e oportunidade de realizar o curso de pós-graduação em Toxicologia, área em que optei dedicar-me inteiramente.

Aos meus amigos pós-graduandos: Alessandra, Cláudia, Cláudia Isabel, Cristiana, Daniela, Eliane, Fábio, Isarita, Michela, Nádia, Nájlá, Patrícia e Simone, pela amizade em todos os momentos de convívio.

Ao Prof. Dr. Ovandir Alves Silva e aos funcionários do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) (FCF-USP): Maurício, Júnior, Carmem e Alessandro, pela colaboração prestada.

Ao Marcelo Sena (Empresa CH₅), pela amizade e auxílio técnico.

À Prof^ª Dr^ª Elizabeth de Souza Nascimento e à Prof^ª Dr^ª Rosemary Custódio Pedroso, pelos preciosos conselhos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo: Dalva, Luzia, Roseli, Helena e Márcia.

Ao Dr. Edmundo Arteaga, médico cardiologista do Instituto do Coração (INCOR), pelo grande auxílio na doação de amostras de seus pacientes.

A Carlos Riyoshi, professor de Educação Física do Clube Palmeiras, por intermediar e facilitar o contato com os atletas.

Aos voluntários desta pesquisa.

À Prof^ª Rosângela Gonçalves Peccinin Machado, por incentivar o ingresso no curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Lourival Larini e Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira, pela iniciação e apoio nos meus primeiros passos na carreira científica.

Às amigas Jacqueline, Rosângela, Cristiane e Ana Paula, pelos bons momentos de convivência, que já fazem parte da minha história.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

*De longe, o maior prêmio que a vida oferece
é a chance de trabalhar muito
e se dedicar a algo que valha a pena.
(Theodore Roosevelt)*

RESUMO

Apesar de serem considerados fármacos ergolíticos, os diuréticos foram incluídos na lista de substâncias proibidas, em 1986, elaborada pelo *International Comitte Olympic* (IOC), por serem utilizados como agentes mascarantes e para uma rápida redução de peso em modalidades esportivas, como halterofilismo, luta greco-romana, judô, karatê e boxe. Desde então, são requeridos procedimentos de triagem para detectar a presença desses compostos na urina. Um simples e adequado método de triagem por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD), foi otimizado e validado, com finalidade de controle de dopagem dos seguintes diuréticos: acetazolamida, amilorida, bumetanida, clopamida, clortalidona, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida e triantereno. O método envolveu extrações simultâneas de 2 mL de urina com acetato de etila em pH diferentes. A extração ácida foi feita com a adição de tampão sólido KH_2PO_4 e NaH_2PO_4 (99:1 p/p), pH 5,0 a 5,5, e para remoção dos interferentes urinários, utilizou-se solução de acetato de chumbo a 5%. Na extração básica, a alcalinização da urina foi feita com NaHCO_3 e K_2CO_3 (3:2 p/p), pH 9,0 a 9,5. A fase móvel consistiu de acetonitrila e tampão acetato de amônio 0,05 M (pH 3,0), com gradiente de eluição e a detecção foi feita em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm. O método desenvolvido apresentou detecção de até 0,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com valores de recuperação, entre 55,26% a 94,82%. Também mostrou-se preciso, tanto em condições de intra como interensaios. Além disso, foi testado a especificidade para quatro diuréticos, dos dez selecionados: clortalidona, espironolactona, furosemida e hidroclorotiazida, na presença de outros fármacos. Os dez diuréticos mantiveram-se estáveis por 24 horas, à 22,5 a 24°C e após armazenamento por quase dois meses, em freezer à -20°C. Foram analisadas dezesseis amostras de urina de atletas para a aplicação do método otimizado e validado, as quais foram detectadas cinco amostras positivas, na fase de triagem, para: clortalidona, furosemida e hidroclorotiazida.

ABSTRACT

Despite of diuretics are considered ergolytic drug, these compounds were included in International Olympic Committee's list of prohibited substances, since 1986, because these substances are considered masking agents and are misused in sports with weight classes such as weightlifting, wrestling, judo, karate and boxing for rapid body weight reduce. Hence, screening procedures to detect their presence in urine are required. One simple and suitable screening method by high performance liquid chromatography with diode array detection, was optimized and validated to doping control of the follow diuretics: acetazolamide, amiloride, bumetanide, clopamide, chlorthalidone, spironolactone, furosemide, hydrochlorotiazide, piretanide and triamterene. Aliquots of 2 mL urine samples were extracted with ethyl acetate. The acid extraction was performed with $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ solid buffer (99:1 w/w), pH ranged from 5.0 to 5.5. In order to remove urinary interferences was added 5% aqueous lead acetate solution. In the basic extraction, the alcalinization of urine samples was made with $\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ (3:2 w/w), pH ranged from 9.0 to 9.5. The gradient mobile phase was acetonitrile and 0.05 M ammonium acetate buffer, pH 3.0, with the diode array detector set to monitor the signal at 260, 270 and 360 nm. The overall lower limits for detection was 0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the recovery range from 55.26% to 94.82%. The inter and intra-assay-precision tests showed good values. Furthermore, four diuretics (chlorthalidone, spironolactone, furosemide and hydrochlorotiazide) was assayed for specificity in the presence of other classes of compounds. The stability tests showed that these ten diuretics was stable for 24 hours at temperatures range from 22.5 to 24°C and stable after stored at -20°C for 2 month. Sixteen urine samples of athletes was screening to verify the method efficiency and five samples were positive for chlorthalidone, furosemide and hydrochlorotiazide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. GENERALIDADES	7
2.1. Fisiologia e função renal	7
2.1.1. Mecanismos de reabsorção dos íons e da água	9
2.2. Classificação dos diuréticos	11
2.3. Inibidores da Anidrase Carbônica	14
2.3.1. Farmacocinética	15
2.3.2. Farmacodinâmica	15
2.3.3. Efeitos Adversos e Toxicidade.....	16
2.4. Diuréticos de Alça	17
2.4.1. Farmacocinética	19
2.4.2. Farmacodinâmica	23
2.5. Diuréticos Tiazídicos	24
2.5.1. Farmacocinética	27
2.5.2. Farmacodinâmica	28
2.5.3. Efeitos Adversos e Toxicidade.....	29
2.6. Diuréticos Pouparadores de Potássio	30
2.6.1. Inibidores de Canais Epiteliais de Sódio	30
2.6.1.1. Farmacocinética	32
2.6.1.2. Farmacodinâmica	34
2.6.1.3. Efeitos Adversos e Toxicidade	34
2.6.2. Antagonistas de Receptores Mineralocorticóides	35
2.6.2.1. Farmacocinética	36
2.6.2.2. Farmacodinâmica	38
2.6.2.3. Efeitos Adversos e Toxicidade	38
2.7. Aspectos analíticos	40
2.7.1. Técnicas Cromatográficas	41
2.7.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	41

2.7.1.1.1. <i>Preparação das amostras</i>	41
2.7.1.1.2. <i>Parâmetros para análise em CLAE</i>	43
2.7.1.2. <i>Cromatografia a gás</i>	45
2.7.1.2.1. <i>Preparação das amostras</i>	45
2.7.1.2.2. <i>Detecção por Espectrometria de Massa (EM)</i>	46
2.7.1.3. <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	53
2.7.1.4. <i>Eletroforese Capilar (EC)</i>	54
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1. Material	56
4.1.1. Padrões	56
4.1.2. Soluções-padrão	57
4.1.2.1. <i>Soluções-estoque</i>	57
4.1.2.2. <i>Soluções de trabalho</i>	57
4.1.3. Solventes e reagentes	57
4.1.4. Equipamentos e acessórios	58
4.1.5 Amostra de urina	59
4.1.5.1. <i>Amostras de referência negativa</i>	59
4.1.5.2. <i>Amostras de referência positiva</i>	59
4.1.5.3. <i>Amostras selecionadas para o estudo da especificidade do método</i>	60
4.1.5.4. <i>Amostras de urina de atletas para análise de triagem de diuréticos</i>	60
4.2. Métodos	60
4.2.1. Otimização das condições cromatográficas	60
4.2.2. Otimização do procedimento de extração líquido-líquido	61
4.2.3. Validação do método proposto	65
4.2.3.1. <i>Limite de detecção</i>	65
4.2.3.2. <i>Estabelecimento da faixa de concentração dos diuréticos utilizada na validação do método proposto</i>	65
4.2.3.3. <i>Recuperação</i>	66

4.2.3.4. <i>Precisão intra-ensaio e interensaio</i>	67
4.2.3.5. <i>Especificidade</i>	67
4.2.3.6. <i>Estabilidade</i>	67
4.2.3.6.1. <i>Após 24 horas da extração</i>	67
4.2.3.6.2. <i>Após 52 dias de armazenamento</i>	68
4.2.4. <i>Aplicação do método otimizado e validado</i>	68
5. RESULTADOS	69
5.1. <i>Otimização das condições cromatográficas</i>	69
5.2 <i>Otimização do procedimento de extração líquido-líquido</i>	74
5.3. <i>Validação do método proposto</i>	78
5.3.1. <i>Limite de detecção</i>	78
5.3.2. <i>Recuperação</i>	79
5.3.3. <i>Precisão intra e interensaio</i>	80
5.3.4. <i>Especificidade</i>	82
5.3.5. <i>Estabilidade</i>	85
5.3.5.1. <i>Após 24 h da extração</i>	85
5.3.5.2. <i>Após 52 dias de armazenamento</i>	87
5.4. <i>Triagem de diuréticos em amostras de urina de atletas</i>	88
6. DISCUSSÃO	91
7. CONCLUSÕES	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO	116
ANEXO II. QUESTIONÁRIO	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Segmentos do néfron.....	8
FIGURA 2. Sítios de ação dos diuréticos.....	12
FIGURA 3. Biotransformação da bumetanida em ratos.....	20
FIGURA 4. Estrutura do principal produto de biotransformação da furosemida.....	21
FIGURA 5. Biotransformação da furosemida.....	21
FIGURA 6. Biotransformação da piretanida.....	22
FIGURA 7. Biotransformação da amilorida.....	32
FIGURA 8. Biotransformação do triantereno.....	33
FIGURA 9. Biotransformação da espironolactona.....	37
FIGURA 10. Fluxograma representando o procedimento analítico para a extração de diuréticos em pH 5,0 –5,5, baseada em Cooper e col. (1989).....	63
FIGURA 11. Fluxograma representando o procedimento analítico da extração de diuréticos em pH 9,0-9,5, baseada em Cooper e col. (1989).	64
FIGURA 12. Espectros de absorbância no UV-visível (varredura de 200 a 400 nm) dos dez diuréticos e da cafeína (PI).....	70
FIGURA 13. Cromatogramas do <i>pool</i> de soluções de padrões de diuréticos a 100 µg/ mL, em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm e gradiente de eluição com inicialmente 10% de acetonitrila, 15% em 2 min, 30% em 4 min e 60% em 8 min, totalizando 10 min de tempo de	

análise. (1) acetazolamida; (2) hidroclorotiazida; (3) triantereno; (4) clortalidona; (5) clopamida; (6) furosemida; (7) piretanida; (8) bumetanida; (9) espironolactona; (10) amilorida; (PI) cafeína..... 71

FIGURA 14. Cromatogramas obtidos no presente estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração ácida (pH 5,0-5,5), sugerido por Cooper e col (1989), do *pool* (n=5) de urina referência negativa para diuréticos e cafeína..... 74

FIGURA 15. Cromatogramas obtidos no presente estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração básica (pH 9,0-9,5), sugerido por Cooper e col (1989), do *pool* (n=5) de urina referência negativa para diuréticos e cafeína..... 75

FIGURA 16. Cromatogramas obtidos no presente estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração ácida (pH 5,0 -5,5), sugerido por Cooper e col. (1989), do *pool* (n=5) de urina com adição dos seguintes padrões (1) acetazolamida (20 µg/mL); (2+1) hidroclorotiazida coeluído com interferente; (3) triantereno (1,25 µg/mL); (4) clortalidona (1,0 µg/mL); (5) clopamida (0,75 µg/mL); (6) furosemida (3,0 µg/ mL); (7) piretanida (1,44 µg/mL); (8) bumetanida (0,5 µg/mL); (9) espironolactona (0,3 µg/mL); (10) amilorida (1,25 µg/mL); (PI) cafeína (2 µg/mL). 75

FIGURA 17. Cromatogramas obtidos no presentes estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração básica (pH 9,0-9,5), sugerido por Cooper e col. (1989), do *pool* (n=5) de urina com adição dos seguintes padrões (1) hidroclorotiazida (20 µg/mL); (2) triantereno (1,25 µg/mL); (3) clortalidona (1,0 µg/mL); (4) clopamida (0,75 µg/ mL); (5) furosemida (3,0 µg/mL); (6) piretanida (1,44 µg/mL); (7) bumetanida (0,5 µg/mL); (8) espironolactona (0,3 µg/mL); (9) amilorida (1,25 µg/mL); (PI) cafeína (2 µg/mL)..... 76

FIGURA 18. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0- 5,5, a 260 nm, referente ao teste de especificidade para clortalidona (C), obtido de

amostra de paciente do INCOR, que além do diurético era submetido ao tratamento com captopril, ácido acetil salicílico e mononitrato de isossorbida. (PI) cafeína.....84

FIGURA 19. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0-5,5, a 260 nm, referente ao teste de especificidade para Espironolactona (E) e furosemida (F) obtido de amostra de paciente do INCOR, que além do diuréticos era submetido ao tratamento com digoxina e warfarina. (PI) cafeína.....84

FIGURA 20. Cromatograma de extração básica em pH 9,0-9,5, a 270 nm, referente ao teste de especificidade para Hidroclorotiazida (H) obtido de amostra de paciente do INCOR, que além do diurético era submetido ao tratamento com verapamil, captopril, carbamazepina e ranitidina. (PI) cafeína.....85

FIGURA 21. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0- 5,5, a 260 nm, referente ao teste de triagem positivo para Clortalidona (C) obtido de amostra de urina de atleta que praticava fisiculturismo. (PI) cafeína.89

FIGURA 22. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0- 5,5, a 270 nm, referente ao teste de triagem positivo para Furosemida (F) obtido de amostra de urina de atleta que praticava Jiu-jitsu. (PI) cafeína.....90

FIGURA 23. Cromatograma de extração básica em pH 9,0-9,5 a 270 nm, referente ao teste de triagem positivo para Hidroclorotiazida (H) obtido de amostra de urina de atleta que praticava Taekwondo. (PI) cafeína.90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Diuréticos comercializados no Brasil e dados farmacocinéticos.	13
TABELA 2 Classificação dos diuréticos de acordo com o comportamento ácido- básico.	40
TABELA 3. Procedimentos em cromatografia líquida de alto desempenho para triagem em diuréticos	48
TABELA 4. Procedimentos de derivatização e sistemas de detecção utilizados para análise de diuréticos em cromatografia à gás.	52
TABELA 5. Valores encontrados na literatura referentes às concentrações urinárias dos diuréticos após 24 h da administração de uma única dose	66
TABELA 6. Valores de comprimentos de onda mais adequados para análise de cada diurético e cafeína nas condições cromatográficas otimizadas.	72
TABELA 7. Tempo de retenção (TR) e respectivos desvios padrão, coeficiente de variação (CV) e tempo de retenção relativo (TRR) dos dez diuréticos e cafeína (PI) nas condições cromatográficas otimizadas.	73
TABELA 8. Condições de pH de extração, mais adequadas para análise de cada diurético.	77
TABELA 9. Valores dos limites de detecção dos dez diuréticos.....	78
TABELA 10. Valores das recuperações obtidas para concentrações altas e baixas de cada um dos dez diuréticos estudados, após extrações ácida e básica.	79
TABELA 11. Resultados obtidos na avaliação da precisão intra-ensaio realizada em sextuplicata em amostras de urina adicionadas de diuréticos.	80

TABELA 12. Resultados obtidos na avaliação da precisão interensaio, realizada em sextuplicata (de concentrações altas e baixas dos diuréticos) durante três dias alternados.....	81
TABELA 13. Fármacos que não interferem nas análises cromatográficas de Clortalidona, Espironolactona, Furosemida e Hidroclorotiazida, segundo o método proposto.....	83
TABELA 14. Valores médios das áreas imediatamente e após 24 h da extração de amostras referência positiva.....	86
TABELA 15. Valores das áreas de amostras analisadas imediatamente a extração de urina referência positiva e de amostras extraídas, após armazenamento de 52 dias em freezer à – 20 ° C.	87
TABELA 16. Triagem positiva para alguns diuréticos em CLAE, para atletas e modalidades esportivas correspondentes.	89

1. INTRODUÇÃO

O uso não médico de substâncias químicas, como um meio de alterar, artificialmente, o desempenho esportivo, é um problema reconhecido há mais de trinta anos. Além de ser uma prática eticamente condenável, existe uma grande preocupação relativa à saúde do atleta, uma vez que esta utilização é, geralmente, feita de maneira inadequada, seja pela dosagem excessiva, pela interação com outros fármacos ou pelo consumo de produtos de origem clandestina (SEGURA 1996, VERROKEN 2000).

O conceito de dopagem tem sido objeto de muita discussão desde quando foi enunciado, pela primeira vez, pelo Conselho de Medicina da Europa, em 1963. De acordo com a definição atualmente proposta pelo *International Comitte Olympic* (IOC 2000), dopagem é qualificada como: o uso de um artifício, seja uma substância ou um método, potencialmente danoso à saúde dos atletas e/ou capaz de melhorar o seu desempenho, ou presença de uma substância proibida no organismo do atleta, a constatação do seu uso ou da aplicação de um método proibido.

A primeira lista de substâncias proibidas foi instituída pelo IOC em 1968, nos Jogos Olímpicos de Verão, no México, e de Inverno, em Grenoble, na qual estavam incluídas apenas os analgésicos narcóticos e estimulantes. Com o passar dos anos, esta lista vem sendo modificada, conforme a descoberta da utilização de novos agentes e métodos de dopagem. De acordo com a última revisão (IOC 2001), está em vigor a proibição das seguintes classes de substâncias e métodos:

I. Classes de substâncias proibidas

- A. Estimulantes
 - B. Narcóticos
 - C. Agentes Anabólicos
 - D. Diuréticos
-

E. Hormônios peptídeos e análogos

II. Métodos proibidos

- A. Dopagem sanguínea
- B. Administração de carregadores artificiais de oxigênio ou expansores do volume plasmático
- C. Manipulação farmacológica, química e física

III. Classes de substâncias proibidas submetidas a certas restrições

- A. Álcool
- B. Canabinóides
- C. Anestésicos Locais
- D. Glicocorticóides
- E. Beta-Bloqueadores

Segundo Wagner (1991), a utilização de fármacos pelos atletas pode ser dividida em quatro categorias: ergogênica, terapêutica, abusiva recreativa ou até mesmo para mascarar a presença de outros fármacos na urina. Ressaltando esta última categoria, as substâncias mais utilizadas são os diuréticos (COOPER e col. 1989, VENTURA e col. 1993, CARRERAS 1994).

Os diuréticos são amplamente empregados na terapêutica, principalmente, para tratamentos de hipertensão e edemas. Já no universo esportivo, são considerados fármacos ergolíticos, isto é que diminuem o desempenho dos atletas, devido a uma rápida redução de volume plasmático. A hidroclorotiazida e a furosemida ainda apresentam outros efeitos ergolíticos: depleção de potássio e contração ventricular prematura (EICHNER 1993).

No entanto, mesmo sendo fármacos ergolíticos, foram incluídos na lista de substâncias proibidas, em 1986, por serem considerados agentes mascarantes e por proporcionarem rápida redução de peso. Por mecanismos diversos, os diuréticos aumentam o fluxo e volume urinário, podendo reduzir a concentração de outras substâncias, abaixo dos respectivos limites de detecção, levando assim, a falsos resultados negativos. Além disso, alguns diuréticos, como os da classe de inibidores da anidrase carbônica, atuam como alcalinizantes urinários, reduzindo a excreção de fármacos alcalinos de uso proibido. Também são utilizados em modalidades esportivas como halterofilismo, luta greco-romana, judô, karatê e boxe para a redução rápida de peso e disputa numa categoria imediatamente inferior, ou em modalidades em que é fundamental o controle de peso, como hipismo, corridas a distância, ginástica olímpica, dança e fisiculturismo. Um outro uso é para controlar a retenção de água, efeito provocado pelos esteróides anabólicos (CADWELL 1987, COOPER e col. 1989, PARK e col. 1990, EICHNER 1993, RIEKKOLA e col. 1996, GUCHELAAR e col. 1999).

Segundo Cadwell (1987), fazer uso de diuréticos para alcançar um determinado peso padronizado, é perigoso e ilegal. Em relação à saúde do atleta, o efeito deletério primário resulta de uma hipohidratação induzida, além da possibilidade de distúrbios eletrolíticos que podem afetar o funcionamento cardíaco e muscular.

De fato, alguns estudos simulando a desidratação, hipertemia e fadiga circulatória, induzidos por um exercício físico, comprovaram a consideração feita acima, por meio de administração de diuréticos em atletas voluntários.

Claremont e col. (1976), administrou 40-80 mg de furosemida a sete voluntários e, após duas horas de exercícios ergométricos, apresentaram uma perda de peso de 3%. Três dos voluntários foram incapazes de se exercitar além de uma hora, no estado hipohidratado, enquanto que, aqueles

que permaneceram se exercitando, tiveram acréscimo de 20-25 batimentos/min e redução do volume plasmático de 15,3%.

Armstrong e col. (1985), realizaram um estudo em competições de corrida à distância de 1.500, 5.000 e 10.000 m, administrando 40 mg de furosemida a oito jovens, cinco horas antes do início da corrida. Foi constatado uma diminuição no desempenho dos atletas, devido ao acréscimo de tempo de duração das corridas de 0,17, 0,39 e 1,57 minutos, para as respectivas distâncias, em relação ao grupo controle.

Também a acetazolamida, utilizada por alpinistas como um meio de prevenir a doença aguda da montanha, não melhora o desempenho, podendo mesmo diminuí-lo em uma altitude extrema (acima de 7000 m). Este fato foi comprovado por Hackett e col. (1985), que examinaram quatro membros da *American Medical Research Expedition to Mount Everest*, ambientados a uma altitude de 6300 m, por no mínimo duas semanas, onde a pressão barométrica é cerca de 350 mm Hg. Após exercícios progressivos até a exaustão, em bicicleta ergométrica, os atletas foram reavaliados após a administração de três doses de 250 mg de acetazolamida, a cada 8 horas de intervalo. Os resultados mostraram que a acetazolamida produz acidemia em grau semelhante ao observado em baixas altitudes. A acidose metabólica reduz a ação de tampões orgânicos ácidos, como piruvatos e lactatos, resultando em diminuição do pH frente aos ácidos gerados durante os exercícios (ácido láctico). Durante o exercício, houve também um aumento da ventilação e razão cardíaca, diminuição nas trocas gasosas e pequeno aumento no consumo de oxigênio em um dado nível do exercício. Dois dos quatro indivíduos, apresentaram decréscimo no desempenho durante o exercício.

Em 1988, quando foi implantado o controle dessa classe de substâncias, não houve nenhum caso de dopagem nos Jogos de Inverno de Calgary, enquanto que, nos Jogos Olímpicos de Verão, dos dez casos

positivos, quatro foram para o diurético furosemida (CHAN e col. 1991, FRENKL e JÁKÓ 1991, IOC 2000). Nas Olimpíadas de Barcelona (1992) e Atlanta (1996), não ocorreu nenhum caso de dopagem por diuréticos. Já nos últimos Jogos Olímpicos, em Sydney, dos nove casos de dopagem, quatro foram positivos para furosemida (IOC 2000).

Em 1992, de todas substâncias detectadas em laboratórios credenciados pelo IOC, 5,59% eram diuréticos, entre eles a canrenona, a furosemida e a hidroclorotiazida (BENZI 1994). Nos anos seguintes, esta porcentagem sofreu progressiva queda: em 1993, 4,48%, em 1994, 4,35%, em 1995, 3,60% e em 1996, o valor diminuiu para 3,24% (MOTTRAM 1999).

Sturmi e Rutecki, (1995), relataram o caso de um atleta fisiculturista francês, que sofreu morte súbita durante uma competição. Ele foi vítima de hiperpotassemia e desidratação, após 72 h de ingestão de altas dosagens de diuréticos que incluíam: hidroclorotiazida, triantereno, espironolactona e suplementos contendo potássio. No Brasil, é inexistente dados na literatura que relate a ocorrência de mortes ou a freqüência de uso de diuréticos entre os atletas. Também não há referência de métodos otimizados para análise de diuréticos, afim de controle de dopagem no esporte. Dessa maneira, as pesquisas que abordam a questão do uso de diuréticos e técnicas de detecção, poderiam auxiliar na obtenção de um quadro representativo de sua utilização, além de incentivar a adoção de uma prática mais efetiva para o seu controle no âmbito esportivo.

Segundo a literatura (FAGERLUNG e col. 1979, DE CROO e col. 1985, COOPER e col. 1989, LISI e col. 1991, SAUGY e col. 1991, LISI e col. 1992, JUMPANNEN e col. 1993, CARRERAS e col. 1994, GONZÁLEZ e col. 1996, RIEKKOLA e col. 1996, VENTURA e SEGURA 1996, GUCHELAAR e col. 1999, ABDEL-HAMID 2000, OLMOS e col. 2000), a análise de diuréticos pode ser efetuada por dois tipos de técnicas: a cromatográfica, podendo ser em camada delgada, líquida ou a gás; e por

eletroforese capilar. O Código do Movimento Olímpico Anti-Dopagem (2000) recomenda, para a análise de triagem dessas substâncias, as técnicas de cromatografia a gás, acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

No presente trabalho, em vista do tempo e custos envolvidos, a técnica de escolha para análise de triagem de diuréticos, foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, principalmente pela limitação que envolve a técnica de cromatografia à gás, em relação a baixa volatilidade destes fármacos e por isso, a exigência da etapa de derivatização (CAMPÍNS-FALCÓ e col. 1993).

Por ser uma classe de fármacos muito ampla, a escolha dos diuréticos a serem analisados, foi baseada naqueles que são comercializados atualmente no Brasil, perfazendo um total de dez compostos: acetazolamida, amilorida, bumetanida, clopamida, clortalidona, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida e triantereno. Também foi levada em consideração a facilidade na obtenção de padrões. (DEF 1999/2000)

2. GENERALIDADES

Os diuréticos são um grupo indispensável de agentes terapêuticos, utilizados para ajustar o volume e a composição dos fluidos biológicos em uma variedade de situações clínicas: hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, falha renal aguda e crônica, glaucoma, síndrome nefrótica, nefrolitíase de cálcio, edema cerebral, edema pulmonar, cirrose com ascite, diabetes *insipidus* e hiperparatireodismo (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, JACKSON 1996, BRATER 2000).

Para compreender os mecanismos de ações dos diuréticos é necessário o conhecimento básico sobre a função e fisiologia renal, no que diz respeito ao transporte de íons ao longo do epitélio tubular.

2.1. Fisiologia e função renal

As duas principais funções dos rins são a excreção de catabólitos como uréia, ácido úrico e creatinina e a manutenção da homeostase dos fluidos corpóreos, por meio da regulação do conteúdo de eletrólitos e do volume do líquido extracelular (RANG e DALE 1993). Estes processos ocorrem na unidade funcional deste órgão, denominado néfron (Figura 1), onde é filtrado grande quantidade de fluido e soluto sangüíneos, exceto proteínas. A reabsorção de água, íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{+2} , Ca^{+2} , HCO_3^-) e outras substâncias é efetuada por meio de processos ativos e passivos, ao longo do túbulo renal. Estes últimos, por sua vez, estão relacionados com a capacidade metabólica das células epiteliais da parede tubular e a ação de hormônios. Na última etapa, os produtos em excesso (água e catabólitos) são excretados em uma pequena fração de volume do fluido, daquela previamente filtrada, geralmente menor que 1%, na forma de urina (CADWELL 1987, GUYTON 1988, KAISLING e DøRUP 1995, LANG e BUSCH 1995).

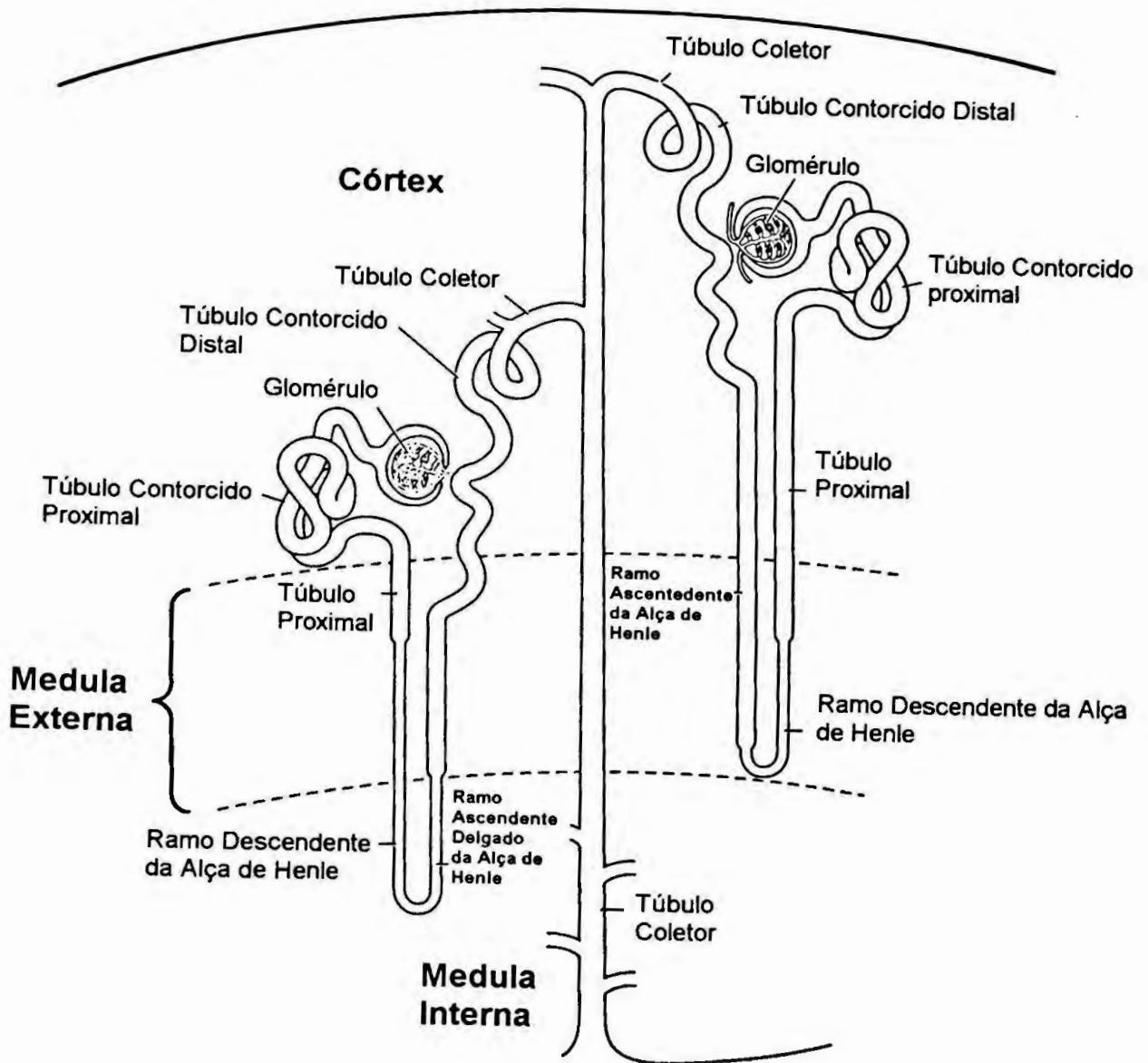


FIGURA 1. Segmentos do néfron.

2.1.1. Mecanismos de reabsorção dos íons e da água

O ajuste de reabsorção de sódio ocorre tanto no túbulo contorcido proximal, como no túbulo distal e nos ductos coletores. A força de orientação para reabsorção do filtrado no túbulo contorcido proximal é o mecanismo de transporte ativo primário no rim mediada pela Na^+/K^+ -ATPase na membrana basolateral. A célula tubular, como a maioria das células, é impermeável ao sódio. A Na^+/K^+ -ATPase transporta Na^+ da célula para o espaço peritubular, enquanto desloca o K^+ para o interior da célula (RANG e DALE 1993). No túbulo distal e no túbulo coletor, o mecanismo da bomba de Na^+ , mediada também pela Na^+/K^+ -ATPase, favorece um transporte obrigatório de K^+ de dentro das células dos capilares para o lúmen tubular. O aumento da concentração do íon potássio exerce um efeito sobre o córtex supra-renal, aumentando a secreção de aldosterona, que é então transportada pelo sangue circulante, até atingir os rins. Neste órgão, a aldosterona difunde-se para o núcleo das células epiteliais do túbulo, ativando o DNA e, conseqüentemente, a produção de RNA-mensageiro, responsável pela formação de novas moléculas protéicas constituintes da bomba Na^+/K^+ . O efeito imediato é a retenção de sódio e água e perda de grandes quantidades de potássio pela urina (CADWELL 1987, GUYTON 1988).

Os íons K^+ apresenta em torno de 85% de reabsorção ao longo do túbulo proximal e ramo ascendente delgado da alça de Henle, principalmente pelo mecanismo de difusão celular passiva. Porém, como já foi mencionado, no túbulo distal e no túbulo coletor, estes íons são secretados devido à ação do hormônio aldosterona (JACKSON 1996).

O epitélio tubular, ao longo de todo o sistema renal, secreta, continuamente, íons hidrogênio para o líquido tubular, que reagem com os sais de sódio para formar ácidos fracos e liberar o íon sódio. Assim, ocorre a troca de íons hidrogênio pelos de sódio, com a reabsorção destes últimos. A

intensidade da secreção de íons hidrogênio para o lúmen tubular, portanto, é, aproximadamente, proporcional ao grau de acidose (GUYTON 1988).

O dióxido de carbono (CO_2) gerado a partir de reações metabólicas gerais, reage com a água, dentro da célula, sob influência da anidrase carbônica, formando ácido carbônico, que por sua vez, é dissociado em HCO_3^- e H^+ . O íon hidrogênio é secretado para o lúmen tubular, juntamente com Na^+ (CADWELL 1987). Na alcalose metabólica, as substâncias alcalinas combinam-se com HCO_3^- para formação de sais de bicarbonato. Como o bicarbonato de sódio é o componente alcalino do sistema tampão bicarbonato, essa excreção representa, na verdade, perda de compostos alcalinos pelo organismo e assim, correção da alcalose (GUYTON 1988).

O túbulo proximal e a porção delgada da alça de Henle são sempre permeáveis à água. A porção delgada ascendente da alça de Henle, no entanto, é sempre impermeável, de modo que a urina se torna diluída, devido a reabsorção contínua de sódio, nesta região. Quando o hormônio antidiurético (ADH) está presente, canais do túbulo distal se abrem, permitindo que a água seja passivamente reabsorvida. A ausência deste hormônio torna a urina hipotônica. Toda vez que uma substância osmoticamente ativa, como glicose, uréia ou manitol, não for normalmente reabsorvida, ou estiver presente em excesso, não haverá também reabsorção de água, em decorrência do aumento da pressão oncótica tubular. Com isso, haverá aumento do volume urinário (CADWELL 1987).

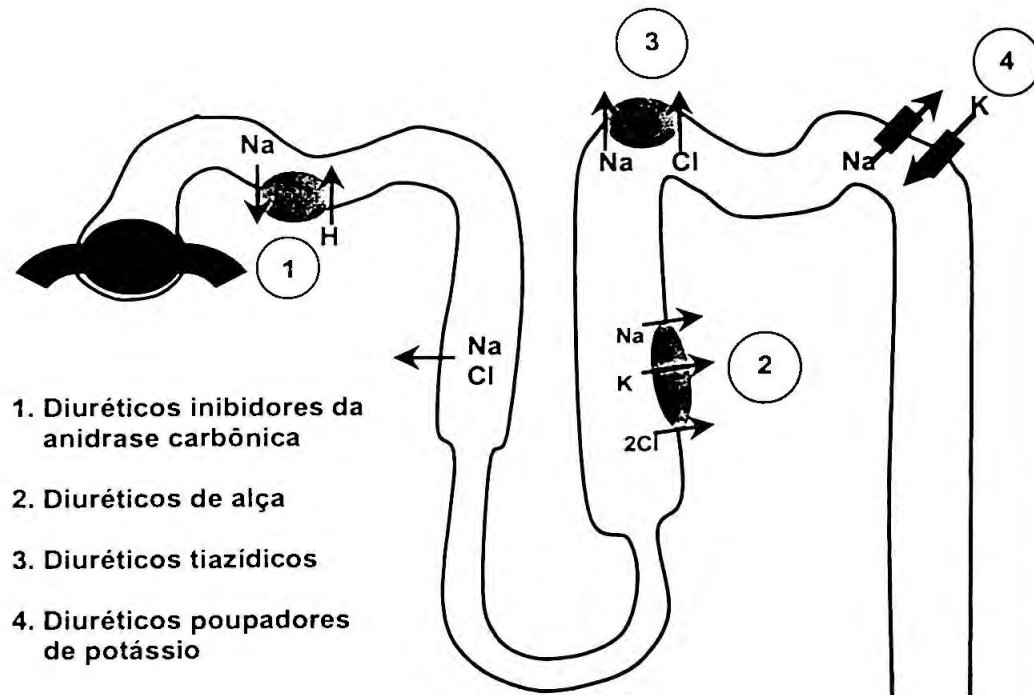
2.2. Classificação dos diuréticos

Os diuréticos utilizados antes de 1920 eram as xantinas, como a teofilina e a cafeína e os osmóticos, como a uréia. No início dos anos 20, o desenvolvimento e a introdução de diuréticos mercuriais na terapia foi um passo decisivo em direção a novas descobertas.

Na década de 50, a partir de modificação original das sulfonamidas, que são agentes antibacterianos, foram sintetizados a acetazolamida e os diuréticos tiazídicos como a clorotiazida e a hidroclorotiazida, ainda atualmente utilizadas. Outras modificações moleculares levaram, no início da década de 60, às substâncias furosemida, bumetanida e piretanida que, embora também sejam derivadas de sulfonamidas, possuem pouquíssimos aspectos químicos em comum com os tiazídicos. Nesta mesma década, também ocorreu a introdução de diuréticos poupadores de potássio, como a espironolactona, o triantereno e a amilorida. O final dos anos 70 e início dos anos 80, foram dominados pela busca dos chamados diuréticos polivalentes, que possuem efeitos renais adjuntivos e/ou extrarenais, tais como, a influência sobre o ácido úrico, glicose e lipídios séricos e a pressão sangüínea. Uma destas substâncias é a indacrina, derivada do ácido etacrínico. Este, por sua vez, foi desenvolvido na década de 60, por meio de ligação aos grupos sulfidrílicos, como o da cisteína, para que tivesse ação semelhante aos diuréticos mercuriais (LANG e HROPOT 1995, RANG e DALE 1993).

Conforme o sítio de ação no túbulo renal, os diuréticos podem ser classificados em quatro classes principais (Figura 2):

- Inibidores da anidrase carbônica (acetazolamida);
- Diuréticos de alça (bumetanida, furosemida, piretanida);
- Diuréticos tiazídicos (clopamida, clortalidona e hidroclorotiazida);
- Diuréticos poupadores de potássio:
 - Inibidores de canais epiteliais de sódio (amilorida, triantereno);
 - Antagonistas de receptores mineralocorticóides (espironolactona).



1. Diuréticos inibidores da anidrase carbônica
2. Diuréticos de alça
3. Diuréticos tiazídicos
4. Diuréticos poupadores de potássio

FIGURA 2. Sítios de ação dos diuréticos.

A Tabela 1 descreve os principais dados farmacocinéticos das respectivas classes de diuréticos no Brasil.

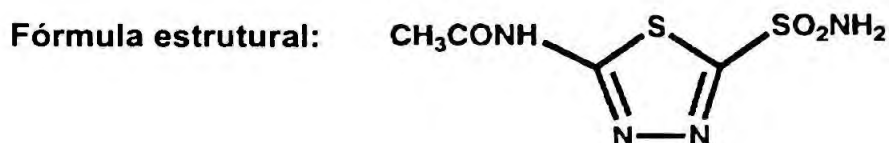
TABELA 1. Diuréticos comercializados no Brasil e dados farmacocinéticos.

Classe Farmacológica	Nome Genérico	Especialidade Farmacêutica ^a	Apresentação ^a (mg)	Biodisponibilidade	Clearance ^e (mL/min/kg)	Tempo de Meia-vida ^e (h)
Inibidor da anidrase carbônica	Acetazolamida	Diamox	250	1 ^b		13
Diuréticos de alça	Bumetanida	Burinax	1; 0.5	0.9 ^b	2 a 3.5	0.3-1.5
	Furosemida	Lasix, Fluxil, Diurana	60; 50; 40; 10	0.65 ^b	1.5 a 3	0.3-3.4
	Piretanida	Arelix	6	0.9 ^b		
Diuréticos Tiazídicos	Clopamida	Viskaldix	5	0.3 ^c		8-12
	Clortalidona	Clortalil, Higroton	25; 50; 12.5	0.64 ^d	4.6	24-55
	Hidroclorotiazida	Clorana, Diurezin, Diurix	50; 25	0.6 ^b		3-10
Diuréticos poupadores de potássio	Amilorida	Diupress, Diurisa,	10; 5	0.5 ^b	3.0	17-26
	Triantereno	Moduretic	50	0.5 ^b		3
	Espironolactona	Diurana, Iguassina Aldactone	100; 25	0.7 ^b		1.5

a: DEF 1999/2000; b: Möhrke W. e Ullrich F. (1995); c: Guchelaar H. J. e col. (1999); d: Brater. (1997); e: Brater D. C. (2000).

2.3. Inibidores da Anidrase Carbônica

O inibidor da anidrase carbônica, a acetazolamida foi o primeiro diurético amplamente utilizado no tratamento de falha cardíaca congestiva nos anos de 1954 a 1958. No entanto, um fator limitante para sua utilização é a excessiva excreção de bicarbonato (LANG e HROPOT 1995).



Nome genérico: Acetazolamida

Nomes químicos: N-[5-(aminosulfonila)-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida;
2-acetilamino-1,3,4,-tiadiazol-5-sulfonamida (MOFFAT 1986;
MERCK 1996).

Especialidades Farmacêuticas: Diamox, Emoclot DI (DEF 1999/2000, SILVA 1999)

Aspectos físico-químicos: Ponto de fusão em 260°C. Insolúvel em tetracloreto de carbono, clorofórmio e éter (MOFFAT 1986). O coeficiente de partição (clorofórmio e água) é de 0,001. A acetazolamida contém um grupamento sulfonamida, que uma vez substituído, ocorre a perda da atividade inibidora de anidrase carbônica. (FRIEDMAN e HEBERT 1997).

2.3.1. Farmacocinética

A acetazolamida é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal (TGI). Segundo Beerman e col. (1974) é transportada pela corrente sanguínea, ligada à enzima anidrase carbônica dos eritrócitos. Aproximadamente 90% da dose é excretada na forma inalterada. Seus produtos de biotransformação ainda não foram determinados (MÖHRKE e ULLRICH 1995, BRATER 2000).

2.3.2. Farmacodinâmica

O mecanismo de ação é basicamente a inibição da enzima anidrase carbônica (AC), presente na parede das células do túbulo renal proximal (Figura 2). Esta inibição determina um atraso na conversão do ácido carbônico (H_2CO_3) intraluminal, em H_2O e CO_2 . A elevação na concentração luminal de H^+ estabelece um gradiente contra a secreção deste último íon da célula tubular; com isso, a hidratação intracelular do CO_2 em H_2CO_3 e a produção subsequente de HCO_3^- e H^+ serão retardadas. Por conseguinte, verifica-se também uma diminuição do H^+ intracelular disponível, para secreção na luz tubular. Como a reabsorção tubular proximal de bicarbonato filtrado (HCO_3^-) ocorre, indiretamente, pela sua combinação com o H^+ secretado para formar H_2O e CO_2 que são imediatamente reabsorvidos, a inibição da AC faz com que o HCO_3^- permaneça no líquido tubular. Também, considerando-se o fato de o sódio ser o cátion que acompanha a entrada de HCO_3^- na circulação peritubular, a inibição da AC provoca certo grau de natriurese. Além disso, a presença de bicarbonato no meio intraluminal cria um gradiente de carga negativa, facilitando a secreção de potássio.

A acetazolamida é um agente natriurético fraco, devido a seu sítio de ação proximal, que não altera a reabsorção de sódio na porção mais distal. Eleva a excreção urinária de bicarbonato de forma aguda porém, neste caso, verifica-se o desenvolvimento de acidose metabólica sistêmica e a diminuição da concentração de bicarbonato tubular filtrado. (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, BRATER 2000)

A anidrase carbônica está presente em outros tecidos, incluindo, olhos, mucosa gástrica, pâncreas, sistema nervoso central (SNC) e eritrócitos. No olho, a inibição da AC está associada à formação diminuída de humor aquoso, e, conseqüentemente, redução da pressão ocular. Por isso, a acetazolamida é muito utilizada no tratamento de glaucoma. Grandes doses desses inibidores de AC, reduzem a secreção gástrica, mas este fator não é aplicado na terapêutica (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, JACKSON 1996).

2.3.3. Efeitos Adversos e Toxicidade

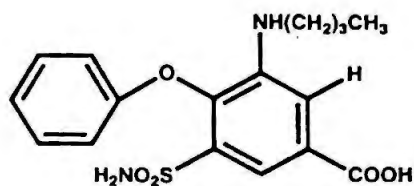
São infreqüentes as reações tóxicas causadas por inibidores da anidrase carbônica. No entanto, como estes fármacos são derivados de sulfonamidas e podem causar toxicidade semelhante a estas últimas, tais como, depressão da medula óssea, toxicidade cutânea e lesões renais, além de reações alérgicas em pacientes hipersensíveis. Altas doses podem causar sonolência, parestesia e insuficiência renal aguda causada por nefrolitíase. (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, JACKSON 1996).

- A maioria dos efeitos adversos é devido à alcalinização da urina, tais como:
- desvio da amônia de origem renal da urina, para a circulação sangüínea, um processo que pode induzir encefalopatia hepática, portanto, o fármaco é contra-indicado para pacientes com cirrose hepática;
 - formação de cálculo e cólica uretral, devido à precipitação de fosfato de cálcio em uma urina alcalina;
 - redução da excreção urinária de bases orgânicas fracas.
-

2.4. Diuréticos de Alça

Estes fármacos inibidores da reabsorção de NaCl, no ramo ascendente da alça de Henle, possuem ação diurética muito potente. Os principais diuréticos representantes dessa classe são: bumetanida, furosemida, piretanida, e ácido etacrínico (JACKSON 1996, FRIEDMAN e HEBERT 1997).

Fórmula estrutural:



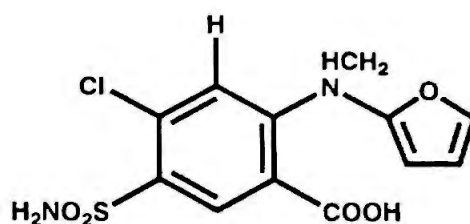
Nome Genérico: Bumetanida

Nomes químicos: ácido 3-(aminosulfonil)-5-(butilamino)-4-fenóxibenzóico;
 ácido 3-(butilamina)-4-fenóxi-5-sulfamoilbenzóico (MOFFAT
 1986; MERCK 1996)

Especialidades Farmacêuticas: Burinax (DEF 1999/2000, SILVA 1999)

Aspectos físico-químicos: Massa molecular é de 364,2 e o ponto de fusão é 230°C (MOFFAT 1986).

Fórmula estrutural:



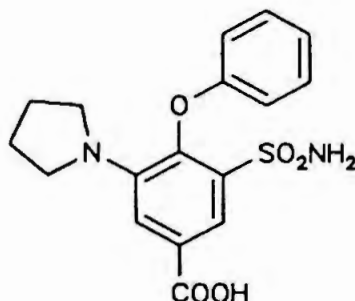
Nome genérico: Furosemida

Nomes químicos: ácido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil) amino] benzóico;
ácido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranílico (MOFFAT 1986, MERCK 1996).

Especialidades Farmacêuticas: Fluxil; Furosemida; Lasix; Rovelan; Diurana; Diurisa (DEF 1999/2000, SILVA 1999).

Aspectos físico-químicos: Pó cristalino branco. É instável na presença de luz e condições ácidas (MERCK 1996). Insolúvel em água e clorofórmio; pouco solúvel em etanol, acetona e éter; solúvel em dimetilformamida e soluções alcalinas (MOFFAT 1986).

Fórmula estrutural:



Nome genérico: Piretanida

Nomes químicos: ácido 3-(aminosulfonil)-4 fenoxi-5-(1-pirrolidinil) benzóico;
ácido 4-fenoxi-3-(1-pirrolidinil)-5-sulfamoilabenzóico (MOFFAT 1986, MERCK 1996).

Nomes comerciais: Arelix (DEF 1999/2000, SILVA 1999)

Aspectos físico-químicos: Massa molecular é de 362,4 e o ponto de fusão é aproximadamente é 225°C (MORAES 1993).

2.4.1. Farmacocinética

- Bumetanida:

Por via oral, a bumetanida é quase completamente absorvida pelo TGI e o efeito máximo ocorre no prazo de duas horas; por via intravenosa, o efeito ocorre em 30 minutos. Possui alta afinidade por proteínas plasmáticas, cerca de 94 a 96%. É excretada na urina em 48 horas: 40% na forma biotransformada e 40% na forma inalterada; cerca de 14%, é excretada na bile, na maior parte como metabólito inativo (HALLADAY e col.1978).

Experimentos em ratos mostraram que este fármaco é quase completamente biotransformado pela oxidação da cadeia lateral e que após administração intravenosa, mais de 50% da dose é excretada como 4'-hidroxibumetanida. Os produtos de menor concentração na urina são o desbutilbumetanida e o 3'-carboxibumetanida. O principal produto de biotransformação, excretado através da via biliar-fecal, é o 2' hidroxibumetanida. Todos os metabólitos foram encontrados na urina e bile, conjugados, principalmente, com o ácido glicurônico (Figura 3) (HALLADAY e col. 1978).

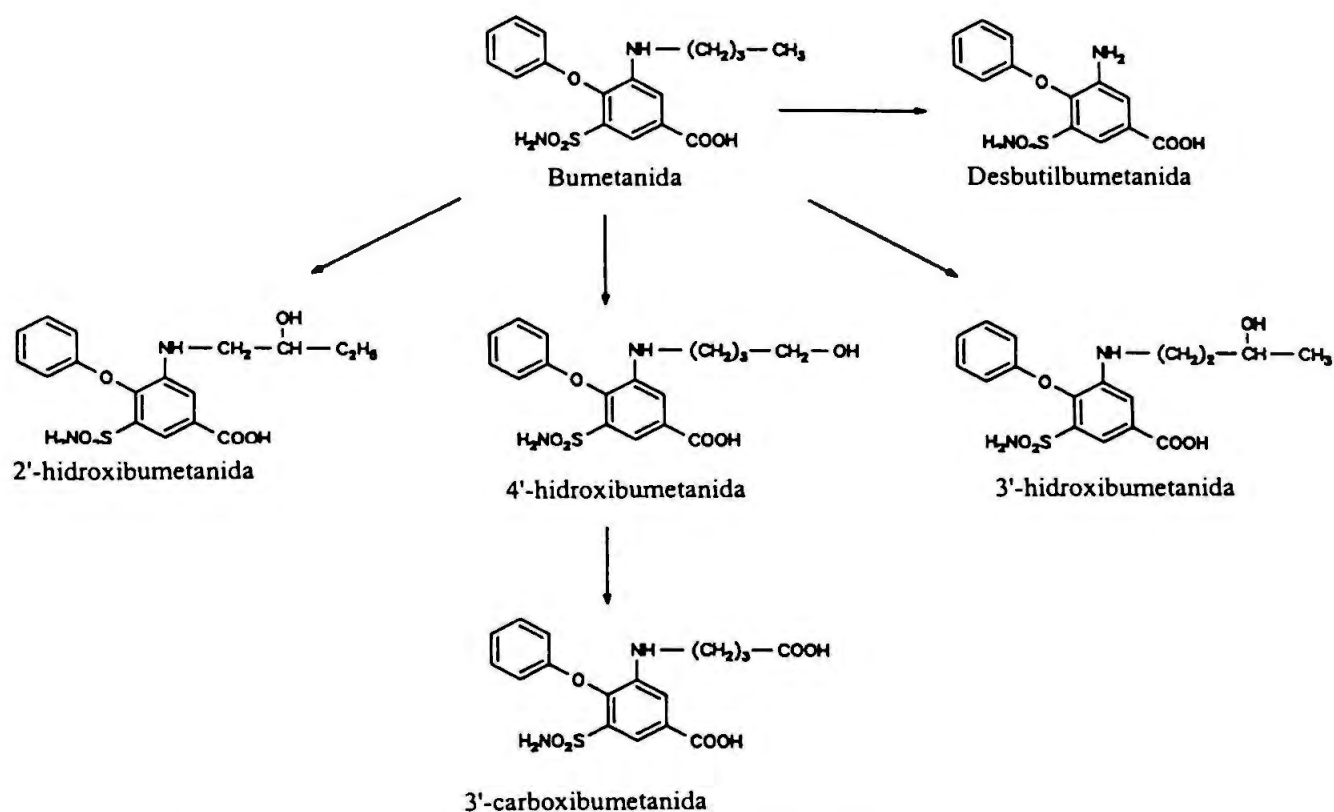
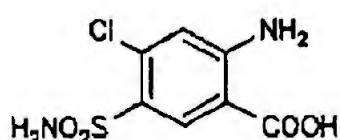


FIGURA 3. Biotransformação da bumetanida em ratos.

- Furosemida

Quando a furosemida é administrada por via oral, ocorre cerca de 60 a 70% de absorção e liga-se à albumina numa proporção de 91 a 99%. A excreção por via renal é de 88% na forma inalterada (KOROKOLVAS 1996).

Os estudos de biotransformação suscitaram muitas controvérsias de que o ácido 4-cloro-5-sulfamóil-antranílico (ACS) (Figura 4), seja o principal produto de biotransformação da furosemida (YAKATAN e col. 1976). Em seres humanos parece haver a formação de éster glicurônico inativo, que é excretado na urina (7 a 15%) e na bile (Figura 5).



ácido 4-cloro-5-sulfamóil-antranílico (ACS)

FIGURA 4. Estrutura do principal produto de biotransformação da furosemida.

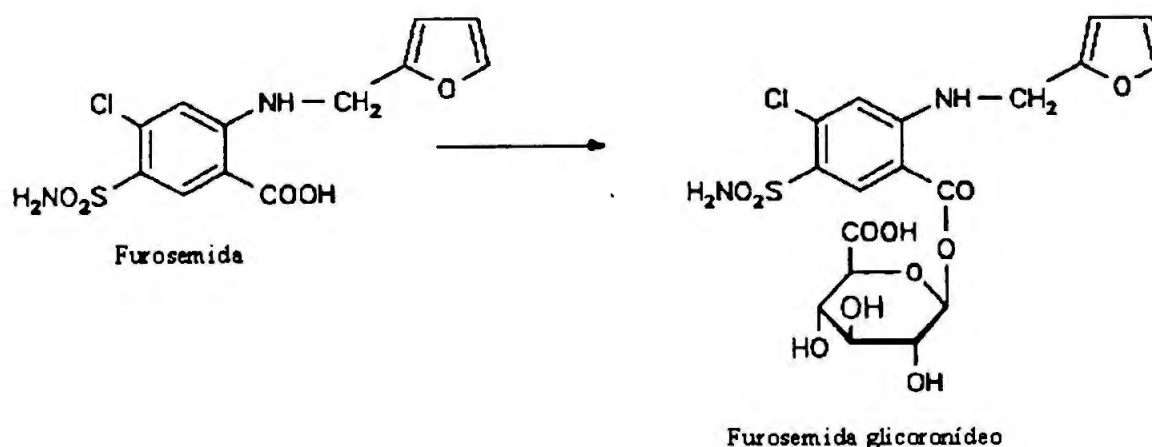


FIGURA 5. Biotransformação da furosemida

- Piretanida:

Quando administrada por via oral, a piretanida é quase completamente absorvida. Liga-se, extensivamente, às proteínas plasmáticas (KOROKOLVAS 1996). A excreção por via renal é de 50 % e 40% ocorre na bile, sob a forma inalterada (MEYER 1983). Há poucas informações sobre as vias de biotransformação, porém pelo menos três metabólitos foram isolados, utilizando-se cromatografia em camada delgada (Figura 6). Ao contrário da furosemida, nenhum derivado de ácido glicurônico foi encontrado (MÖHRKE e ULLRICH 1995).

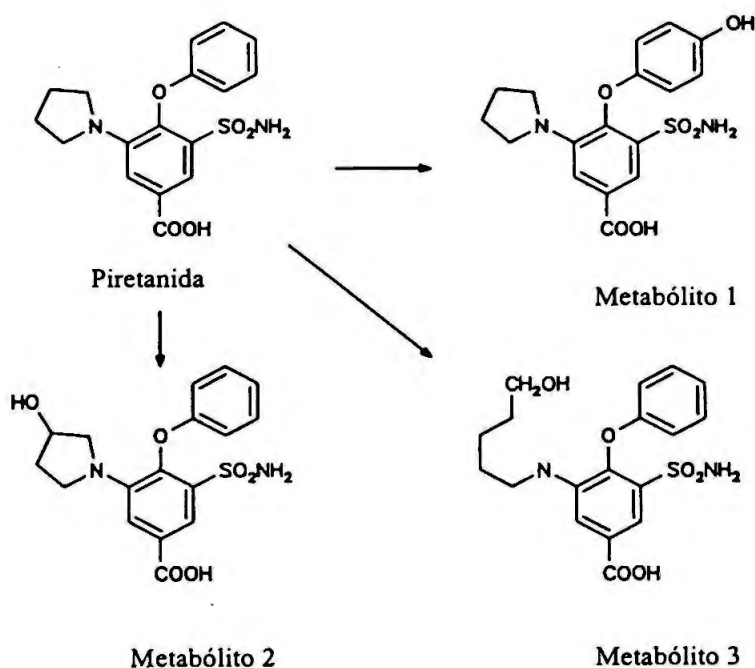


FIGURA 6. Biotransformação da piretanida.

2.4.2. Farmacodinâmica

A ação primária dos diuréticos de alça é o bloqueio da reabsorção de K^+ , Cl^- e Na^+ , na porção ascendente da alça de Henle (Figura 1). O mecanismo de ação é a inibição da bomba ATPase, causando a diurese de NaCl e KCl, que conseqüentemente, provoca a anulação da diferença de potencial transepitelial, resultando também, em um grande aumento da excreção de Ca^{+2} e Mg^{+2} (JACKSON 1996, BRATER 2000).

2.4.3. Efeitos Adversos e Toxicidade

A maioria dos efeitos adversos se deve ao desequilíbrio eletrolítico. A utilização crônica de diuréticos de alça pode causar sérias depleções de Na^+ total no organismo, levando à hiponatremia, que por sua vez, está associado à hipotensão, ao colapso circulatório e à episódios trombo-embólicos. O aumento de perda de Na^+ no túbulo distal, particularmente quando combinado com ativação do sistema renina-angiotensina, conduz ao aumento de excreção urinária de K^+ e H^+ , ocasionando alcalose. A hipopotassemia pode estar associado à diminuição da atividade insulínica no sangue, gerado pela inibição da conversão de pró-insulina à insulina. O aumento de excreção Mg^{+2} e Ca^{+2} resulta em hipomagnesemia, que conseqüentemente, pode provocar arritmia cardíaca. (GORDEN e col. 1972, JACKSON 1996).

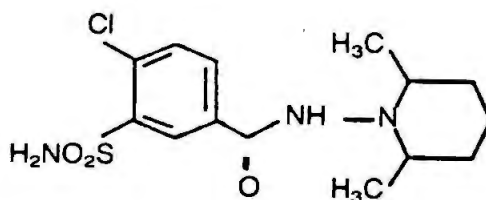
Esta classe de diuréticos pode causar ototoxicidade, mais freqüentemente pela administração intravenosa, levando à surdez e à vertigem, sintomas geralmente reversíveis. Também aumentam os níveis plasmáticos do colesterol LDL e dos triglicerídeos, enquanto que diminuem os níveis do colesterol HDL.

Outras reações adversas incluem: irritações cutâneas, fotossensibilidade, parestesia, depressão da medula óssea e distúrbios gastrintestinais (JACKSON 1996).

2.5. Diuréticos Tiazídicos

O cotransporte de Na^+/Cl^- representa o maior alvo para ação clínica dos benzotiazídicos ou tiazídicos. Os benzotiazídicos, como a clopamida, a clortalidona e a hidroclorotiazida, foram sintetizados na tentativa de aumentar a potência diurética comparados aos inibidores de anidrase carbônica. No entanto, diferentemente destes últimos, que aumentam a excreção de NaHCO_3 , os tiazídicos aumentam predominantemente a excreção de NaCl , efeito independente da inibição da enzima anidrase carbônica. A era dos diuréticos sulfonamidícos ou tiazídicos trouxe um novo conceito no âmbito da terapia da insuficiência cardíaca congestiva, edema e hipertensão (LANG e HROPOT 1995, JACKSON 1996, FRIEDMAN e HEBERT 1997, BRATER 2000).

Fórmula estrutural:



Nome genérico: Clopamida

Nomes químicos: cis-3-(aminosulfonil)-4-cloro-N-(2,6-dimetil-1-piperidinil) benzamida;

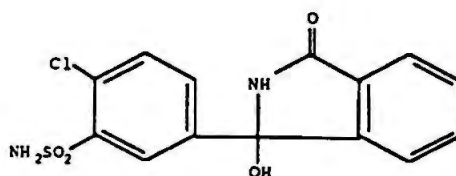
1-(4-cloro-3-sulfamoil-benzamido)-2,6-dimetilpiperidina;

N-(2',6'-dimetil-1'-piperidil)-3-sulfamoil-4-cloro benzamida; 4-cloro-N-(2',6'-dimetil-1'-piperidil)-3-sulfamoilbenzamida (MOFFAT 1986, MERCK 1996)

Especialidades Farmacêuticas: Viskaldix (DEF 1999/2000, SILVA 1999)

Aspectos físico-químicos: Ponto de fusão em 246°C . Solubilidade 1/250 de água, 1/100 de álcool hidratado, 1/250 de clorofórmio, 1/35 de metanol (MOFFAT 1986).

Fórmula estrutural:



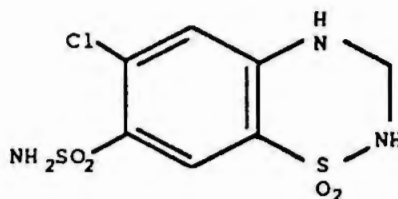
Nome genérico: Clortalidona

Nomes químicos: 2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-1-isoindolinila)benzenosulfonamida;
2-cloro-5-(2,3-diidro-1-hidroxi-3-oxo-1-H-isoindol-1-ila)benzenosulfonamida (MOFFAT 1986, MERCK1996).

Especialidades Farmacêuticas: Clortalidona, Clortalil, Higroton, Atenoretic, Diurpress, Tenoretic, Higroton -Reserpina (DEF 1999/2000, SILVA 1999).

Aspectos físico-químicos: O massa molecular é de 338,78 e o ponto de fusão é à 220°C. É solúvel em metanol aquecido e levemente solúvel em éter (MOFFAT 1996, MERCK 1996). Pó cristalino branco amarelado, quase insolúvel em água. Apesar de ser derivado ftalimídico, contendo porção sulfamídica e não tiazídica, suas ações, usos e efeitos adversos são similares aos da clortiazida (KOROKOLVAS 1996).

Fórmula estrutural:



Nome genérico: Hidroclorotiazida

Nomes químicos: 1,1–dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida;

dióxido aminodihidrobentotiadiazina (MOFFAT 1986, MERCK 1996).

Especialidades Farmacêuticas: Clorana, Diurepina, Diurin, Diurix, Drenol, Hidroclorotiazida (DEF 1999/2000, SILVA 1999).

Aspectos físico-químicos: Ponto de fusão à 268°C e massa molecular de 297,72. É solúvel em amônia diluída ou hidróxido de sódio; também solúvel em metanol, etanol, acetona. Praticamente insolúvel em água (MOFFAT 1986, MERCK 1996). Normalmente se apresenta como pó cristalino branco (KOROKOLVAS 1996). É um composto análogo ao 1,2,4- benzotiadiazina-1,1–dioxido (JACKSON 1996).

2.5.1. Farmacocinética

- Clopamida

A absorção é rápida através do sistema digestivo. A ação diurética ocorre após 2 horas da administração oral com atividade máxima entre 3 a 6 horas. A ligação a proteínas plasmáticas é menor que 50%.

Na biotransformação hepática, ocorre reação de hidroxilação, seguida da conjugação com ácido glicurônico ou a formação de conjugados sulfônicos. A excreção é por via renal; 30 a 40% na forma inalterada (BIAM 2001).

- Clortalidona

A clortalidona apresenta a propriedade de se ligar à anidrase carbônica dos eritrócitos, sendo este o principal fator responsável pela longa meia-vida, de 35 a 50 horas (BEERMAN e col. 1974, KOROKOLVAS 1996).

Berman e col. (1974), citam que alguns autores identificaram somente um metabólito na urina, o ácido 4-cloro-3-sulfamilbenzofenona-2-carboxil. Embora a clortalidona seja uma mistura racêmica, sua estereofarmacocinética ainda não foi estudada.

- Hidroclorotiazida

O início da ação diurética da hidroclorotiazida ocorre após 2 horas da administração, atingindo o efeito diurético máximo em 4 horas (KOROKOLVAS 1996). O mecanismo de acúmulo no interior dos eritrócitos ainda não foi esclarecido, mas é pelo menos três vezes maior do que o observado no plasma.

Este diurético é excretado na forma inalterada na urina e fezes. Após administração intravenosa, mais de 90% do fármaco é excretado na urina e aproximadamente 4% nas fezes. (BEERMAN e col. 1976).

2.5.2. Farmacodinâmica

Essa classe de substâncias age diminuindo a reabsorção de Na^+ , em locais próximo ao túbulo distal e túbulo coletor, enquanto que o túbulo proximal representa um local secundário (Figura 2) (JACKSON 1996).

Os diuréticos tiazídicos são considerados fármacos natriuréticos moderadamente potentes, capazes de inibir a reabsorção de até 5% da carga filtrada total de sódio. Os locais de ação são proximais aos segmentos do néfron responsáveis pela secreção de potássio. A liberação aumentada de sódio no túbulo coletor resulta em aumento da troca de sódio/potássio e excreção de Ca^+ .

As benzotiazidas, quando administradas em doses elevadas, diminuem a excreção urinária de cálcio. De forma crônica, reduz ainda mais o cálcio urinário, devido à reabsorção aumentada de líquido e de solutos na porção proximal. No entanto, o cálcio sérico torna-se elevado. Foi também implicada uma ação das tiazidas sobre o osso, relacionada ao paratormônio. Este efeito não é importante clinicamente, a não ser que o indivíduo tenha tendência hipercalcêmica (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991).

2.5.3. Efeitos Adversos e Toxicidade

Os diuréticos tiazídicos raramente causam danos, porém, já houveram relatos de ações sobre o SNC como vertigem, dor de cabeça, parestesia, fraqueza; problemas gastrintestinais como anorexia, náusea, vômitos, diarreia, constipação, colecistite, pancreatite; sexuais, tais como impotência e redução da libido; hematológicos como discrasia sangüínea; dermatológico como fotossensibilidade e irritações cutâneas (JACKSON 1996).

Os efeitos adversos mais sérios estão relacionados às disfunções do equilíbrio hidro-salino, da mesma maneira que os diuréticos de alça. Também, podem produzir depleção aguda e crônica do volume intravascular, bem como hipopotassemia relacionada à dose, alcalose metabólica, hiperuricemia, hipocloremia, hipomagnesemia, hiponatremia. A trombocitopenia e a granulocitose são fenômenos tóxicos raros (VIDT 1976, MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, JACKSON 1996).

Os diuréticos tiazídicos também estão envolvidos na diminuição da tolerância à glicose, pela interferência na síntese de insulina, como também exercem influência no metabolismo de lipídeos, através da diminuição dos níveis de LDL e triglicérides total (JACKSON 1996).

2.6. Diuréticos Pouparadores de Potássio

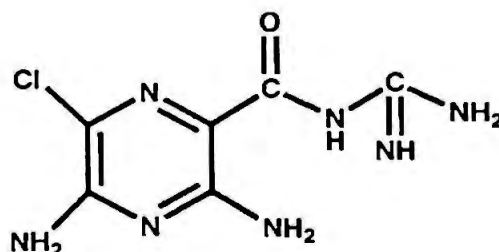
Esses compostos agem sobre o túbulo coletor. Devido ao seu efeito poupador de potássio, geralmente, são associados aos diuréticos de alça ou tiazídicos para reduzir ou evitar a perda de potássio e, conseqüentemente, a hipopotassemia (FRIEDMAN e HEBERT 1997).

Essa classe é dividida em dois grupos, de acordo com o mecanismo de ação sobre o sistema renal:

- Inibidores de canais de sódio de células epiteliais (ex. amilorida e triantereno);
- Antagonistas de receptores mineralocorticóides ou antagonistas de aldosterona (ex. espironolactona).

2.6.1. Inibidores de Canais Epiteliais de Sódio

Fórmula Estrutural



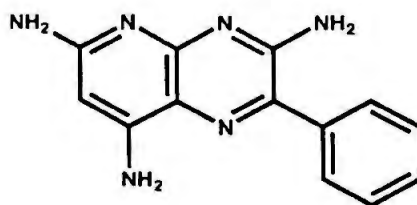
Nome genérico: Amilorida

Nomes químicos: N-amidino-3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamida;
3,5-diamino-N-(aminoiminometil)-6-cloropirazinacarboxamida
(MOFFAT 1986, MERCK 1996).

Especialidades Farmacêuticas: Diupress, Diurisa, Moduretic, Amiloride, Amiretic, Diurezina-A. (DEF 1999/2000, SILVA 1999).

Aspectos físico-químicos: Pó cristalino branco, com ponto de fusão entre 285 a 288°C. Solúvel em água, pouco solúvel em metanol, insolúvel em clorofórmio e éter. É um derivado pirazinoilguanidina (JACKSON, 1996). A forma neutra da amilorida presente na solução alcalina, degrada aproximadamente três vezes mais rápido do que a forma catiônica (LI e col. 1999).

Fórmula estrutural:



Nome genérico: Triantereno

Nomes químicos: 6-fenil-2,4,7-pteridina triamina;
2,4,7-triamina-6-fenilpteridina. (MOFFAT 1986, MERCK 1996).

Especialidades Farmacêuticas: Diurana, Iguassina (DEF 1999/2000, SILVA 1999).

Aspectos físico-químicos: Pó cristalino amarelado. As soluções acidificadas possui coloração azul fluorescente. Pouco solúvel em água, em etanol, em ácido fórmico, em ácido acético e ácidos minerais. É praticamente insolúvel em éter (MOFFAT 1986).

2.6.1.1. Farmacocinética

- Amilorida

A afinidade por proteínas plasmáticas é em torno de 40%. Estudos em voluntários revelaram que 24 horas após a administração, um pico adicional foi observado e experimentalmente identificado como ácido 3,5-diamino-6-cloropirazinacarboxílico. Este produto de biotransformação pode ser formado a partir de uma clivagem da ligação amida (REUTER 1984). A amilorida é excretada, em maior parte, na forma inalterada, pela via renal. (MÖRKE e ULLRICH 1995, JACKSON 1996).

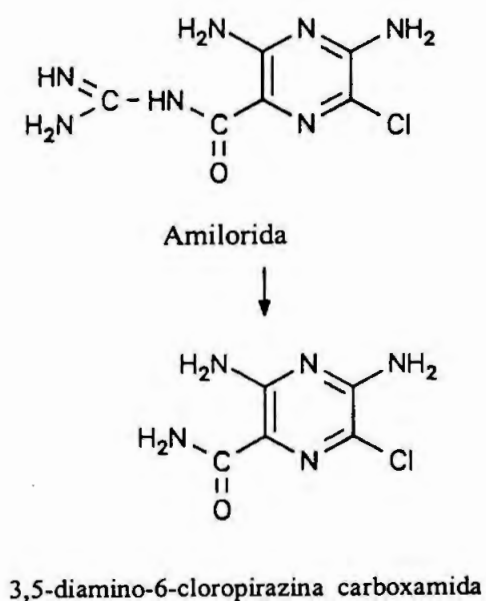


FIGURA 7. Biotransformação da amilorida.

- Triantereno

O triantereno sofre absorção quase completa no TGI. O início do efeito diurético ocorre em 2 horas após a administração e a duração do efeito é de aproximadamente 7 a 9 horas (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991).

A principal via de biotransformação é a sua hidroxilação transformando-se em p-hidroxitriantereno. Este último é rapidamente conjugado com sulfato para formar, numa segunda fase, o produto ativo éster de ácido sulfúrico p-hidroxitriantereno, excretado, então, na urina (MÖRHKE e ULLRICH 1995, JACKSON 1996).

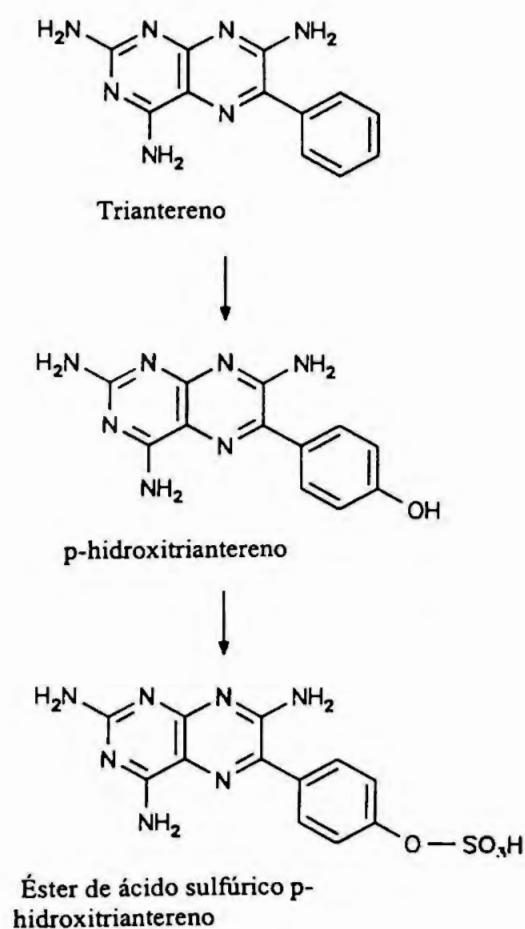


FIGURA 8. Biotransformação do triantereno.

2.6.1.2. Farmacodinâmica

O triantereno e a amilorida inibem as trocas de Na^+ e Cl^- por K^+ e H^+ nos segmentos do néfron após o túbulo contorcido distal. (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, BRATER 2000). A amilorida interfere no transporte nos segmentos finais do néfron onde bloqueia a reabsorção de sódio. Conseqüentemente, há a acidificação por causa da inibição da troca de sódio por hidrogênio, aumento da excreção de sódio e cloro e redução da excreção de potássio (JACKSON 1996).

Segundo Friedman e Hebert (1997), o principal efeito da inibição de entrada de Na^+ dentro das células epiteliais é a despolarização da voltagem na membrana aumentando a entrada de K^+ , resultando na diminuição da secreção deste íon. Como estas trocas nos túbulos e ductos coletores são responsáveis por apenas 2 a 3 % da reabsorção total de sódio, esta classe de diuréticos produz natriurese moderada e pequena excreção de potássio (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991).

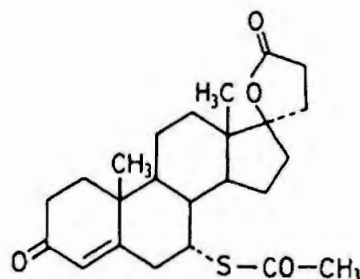
2.6.1.3. Efeitos Adversos e Toxicidade

O efeito adverso mais prejudicial decorrente do bloqueio dos canais de Na^+ é a hiperpotassemia. Por isso, o triantereno e a amilorida não são indicados para pacientes com este distúrbio.

Pacientes cirróticos com tendência a megaloblastose ocasionada por deficiência de ácido fólico, não podem ser tratados com triantereno, por ser um antagonista fraco de ácido fólico. O triantereno pode reduzir a tolerância à glicose, induzir a fotossensibilização e também tem sido associado com nefrite e cálculo renal. Ambos os fármacos podem causar distúrbios gastrintestinais, músculo-esqueléticos, dermatológicos e hematológicos (JACKSON 1996).

2.6.2. Antagonistas de Receptores Mineralocorticóides

Fórmula estrutural:



Nome genérico: Espironolactona

Nomes químicos: ácido (7 α -17 α)-7-(acetiltio)-17-hidroxi-3-oxopregn-4-eno-21-carboxílico- γ -lactona;

ácido 17hidroxi-7 α -mercaptop-3oxo-17 α -pregn-4eno-21- carboxílico γ -lactona (MOFFAT 1986, MERCK 1996).

Especialidades Farmacêuticas: Aldactone, Aldazida 50, Lasilactona 100 mg (DEF 199/2000, SILVA 1999).

Aspectos físico-químicos: Ponto de fusão entre 198 e 207°C (MOFFAT 1986). Apresenta-se como um pó cristalino amarelado, estável ao ar e quase insolúvel em água (KOROKOLVAS 1996). Solúvel na maioria dos solventes orgânicos (MERCK 1996).

2.6.2.1. Farmacocinética

A espironolactona é parcialmente absorvida (60 a 70%) no TGI; a presença de alimento intensifica a absorção. Sofre biotransformação hepática extensa e rápida, produzindo 25 a 30% de canrenona, o seu principal metabólito ativo (JACKSON 1996, KOROKOLVAS 1996). O metabolismo é dividido em duas rotas: uma independente de canrenona e outra dependente.

Tanto em animais como em homens o primeiro passo da via independente de canrenona é a metilação da 7α -tio-espironolactona, formando o composto tiometil e em seguida, a hidroxilação do anel, formando de 6β -hidroxi- 7α -tiometilespironolactona. Este mesmo grupamento sofre uma oxidação, produzindo derivados sulfóxido e sulfona (KARIM e col. 1977).

A canrenona possui alta afinidade por proteínas, tendo, por isso, meia-vida de eliminação de cerca de 16-18 horas. Sua excreção ocorre através dos rins e do TGI (JACKSON 1996). Estudo *in vitro* em células hepáticas de rato, mostrou que ^3H -canrenona é biotransformada tanto em metabólitos hidrofílicos como lipofílicos, havendo a formação de um intermediário epóxido (BOREHAM e col. 1981). Estudos efetuados por Operman e col., em 1988, utilizando células hepáticas S-9 de ratos, constatou que a canrenoato de potássio, outro diurético desse grupo, e não a espironolactona, era convertida, em um primeiro passo, em $6,7\beta$ -epoxi-canrenona e, posteriormente, em 3α - e 3β -hidroxi- $6,7\beta$ -epoxi-canrenona (Figura 9).

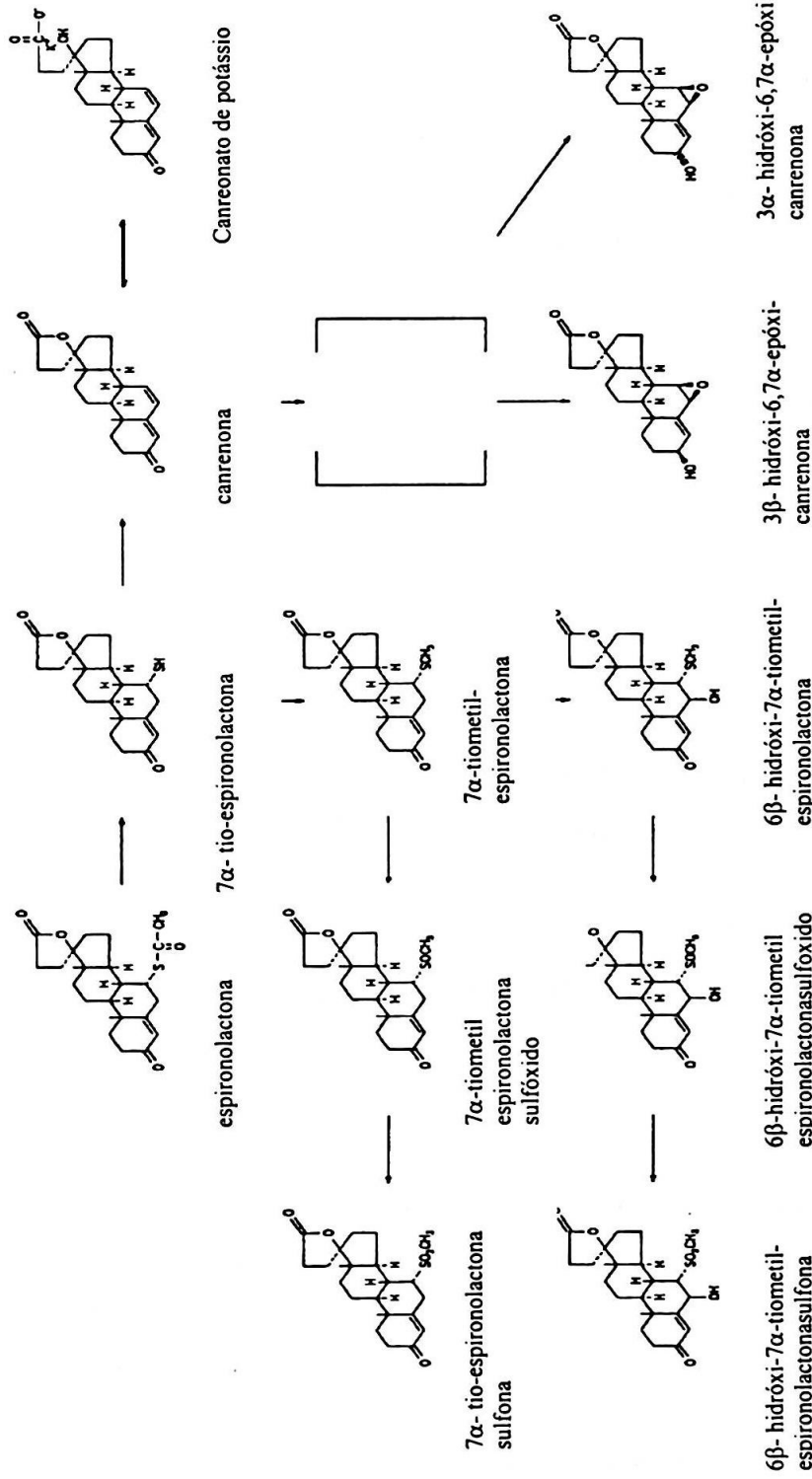


FIGURA 9. Biotransformação da espironolactona

2.6.2.2. *Farmacodinâmica*

A espironolactona e o seu principal produto de biotransformação, a canrenona, são competidores antagonistas de receptores do hormônio mineralocorticoide, a aldosterona. Este hormônio, em condições normais, provoca a retenção de sais e água no túbulo coletor, além de aumentar a excreção de K^+ e H^+ (LANG e HROPOT 1995, JACKSON 1996).

A ação da espironolactona resulta de sua estrutura química semelhante à aldosterona, capacitando-a, de forma competitiva, de se ligar em receptores celulares do hormônio mineralocorticoide, inibindo, o estímulo para o bombeamento e reabsorção de Na^+ no túbulo distal (VIDT 1976, BRATER 2000).

2.6.2.3. *Efeitos Adversos e Toxicidade*

O principal efeito adverso da espironolactona é a hiperpotassemia (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, JACKSON 1996). Clinicamente, segundo Cadwell (1987), a hiperpotassemia é menos perigosa do que a hipopotassemia provocada pelos diuréticos tiazídicos. Porém, é contra indicada para pacientes com hiperpotassemia e pacientes com risco de desenvolvê-la, juntamente com suplementação de potássio e/ou pacientes com insuficiência renal moderada a grave.

A espironolactona, devido a sua estrutura esteroideal, pode causar ginecomastia, impotência, diminuição da libido, hirsutismo, engrossamento de voz e irregularidades no ciclo menstrual (MARQUEZ-JULIO e WHITESIDE 1991, JACKSON 1996).

Efeitos no SNC incluem sonolência, letargia, ataxia, confusão e cefaléia. Também pode causa irritações cutâneas e, raramente, discrasia sangüínea. Já

foram relatados casos de câncer de mama, em pacientes que faziam uso crônico de espironolactona, embora os mecanismos e causas ainda não tenham sido estabelecidos. Dados experimentais indicaram que altas doses desse diurético, provocaram tumor maligno em ratos, mas ainda é questionável se doses terapêuticas, pode ou não, provocar tumor em seres humanos (JACKSON 1996).

2.7. Aspectos analíticos

A análise dos diuréticos geralmente apresenta dificuldades acarretada pela presença de diferentes grupos funcionais em suas moléculas, como aminas primárias, secundárias e terciárias, sulfonamidas e ácidos carboxílicos. Devido a esta diversidade química, os diuréticos são classificados em quatro sub-grupos, de acordo com o comportamento ácido/básico (Tabela 2).

Segundo as recomendações da IOC (2000), a análise de triagem, para o controle das substâncias proibidas nos esportes, é realizada, utilizando-se técnicas sensíveis e abrangentes, para impossibilitar resultados duvidosos, como os resultados "falso-negativos". Para os diuréticos, recomenda-se: extração em pH adequado, derivatização e análise por cromatografia à gás (CG) acoplado ao detector de espectrômetro de massa (EM). Alternativamente, extração e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Embora as técnicas de CG e CLAE sejam as indicadas pelo IOC, outras técnicas também podem ser utilizadas. Estas técnicas são: cromatografia em camada delgada (CCD) e eletroforese capilar (EC).

TABELA 2. Classificação dos diuréticos de acordo com o comportamento ácido-básico.

Comportamento ácido/básico	Composto	pKa	Referência
1. Diuréticos Básicos	Amilorida	8.7	Moffat 1986
	Triantereno	6.2	Moffat 1986
2. Diuréticos neutros	Espironolactona		
3. Diuréticos ácidos fracos	Acetazolamida	7.2, 9.0	Moffat 1986
	Clortalidona	9.4	Moffat 1986
	Clopamida		
	Hidroclorotiazida	7.0, 9.2	Moffat 1986
4. Diuréticos ácidos fortes	Bumetanida	3.6 , 7.7	Ventura e Segura 1996
	Furosemida	3.9 (20°C)	Moffat 1986
	Piretanida	4.1	Ventura e Segura 1996

2.7.1. Técnicas Cromatográficas

2.7.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

2.7.1.1.1. Preparação das amostras

A extração líquido-líquido é a técnica mais empregada para isolar diuréticos inalterados da urina. Devido às diferentes características químicas desta classe, foram propostos procedimentos de extração em meios ácidos, básicos e neutros (VENTURA e SEGURA 1996).

Os estudos de Tisdall e col. (1980), Fullinfaw e col. (1987) e Guchelaar e col. (1999), recomendam, primeiramente, a acidificação da urina (pH 5,0, pH 4,1 e pH 5,0 respectivamente), e a extração com acetato de etila. Antes da evaporação do solvente extrator, até a secura, foi realizada uma fase de lavagem com tampão fosfato (pH 8,0, pH 7,5 e pH 6,0 respectivamente). Os valores de recuperação variaram entre 19 e 90%. As menores recuperações foram dos compostos mais ácidos. No trabalho de Guchelaar e col. (1999), não foi possível recuperar a amilorida, devido a etapa de lavagem. Este último autor obteve os seguintes limites de detecção, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, através do método de extração estudado: acetazolamida, 1,21; bumetanida, 0,08; clopamida, 0,55; clortalidona, 1,93; espironolactona, 2,42; furosemida, 0,03; hidroclorotiazida, 0,03; piretanida, 0,35; triantereno, 0,002.

Ventura e col. (1993) analisaram qual seria o melhor solvente orgânico, entre o éter dietílico e o acetato de etila, para a extração em meio ácido e básico (pH 2,5 e pH 9,0). Os melhores resultados foram obtidos em condições alcalinas com o solvente acetato de etila. Neste solvente foi acrescentado cloreto de sódio, para promover o efeito "salting out", o qual permite a recuperação de compostos fortemente ácidos. Por meio desta técnica de extração, Ventura e col. (1993),

obtiveram os seguintes limites de detecção em $\mu\text{g}/\text{mL}$: acetazolamida, 2,0; amilorida, 0,02; bumetanida, 0,02; clortalidona, 0,2; espironolactona, 0,1; furosemida, 0,05; hidroclorotiazida, 0,1; piretanida, 0,1; triantereno, 0,01.

Cooper e col. (1989) descreveram um procedimento consistindo de duas extrações simultâneas, uma em pH 5,5, com lavagem da fase orgânica com solução de acetato de chumbo a 5%, e a outra em pH 9,5, sem a lavagem da fase orgânica. O solvente orgânico utilizado foi o acetato de etila. Os compostos básicos foram bem recuperados no extrato básico, porém, somente a amilorida apresentou baixa recuperação, em torno de 25%. Os diuréticos ácidos fracos também foram recuperados em pH alcalino, exceto a acetazolamida. No entanto, os compostos ácidos foram melhor recuperados em condições ácidas. Através desta técnica de extração, Cooper e col. (1989), obtiveram os seguintes limites de detecção em $\mu\text{g}/\text{mL}$: acetazolamida, 1,0 (extração ácida); amilorida, 5,0 (extração básica); bumetanida, 1,0 (em ambas extrações); clortalidona, 1,0 (em ambas extrações); espironolactona, 1,0 (em ambas extrações); furosemida, 0,5 (em ambas extrações); hidroclorotiazida, 0,5 (em ambas extrações); triantereno, 1,0 (extração básica).

Park e col. (1990) compararam as extrações líquido-líquido em diferentes pH (5,0; 7,0; 9,0; 11,0), utilizando o éter dietílico como solvente extrator e o sulfato de sódio anidro, para promover efeito "salting out". A amilorida não foi recuperada em nenhum dos pH analisados. A extração de triantereno foi maior em pH alcalino, ao contrário dos compostos ácidos, melhor extraídos em pH ácido. Nesse mesmo trabalho, também foi realizada a extração em fase sólida. A coluna utilizada, Sep-Pak C₁₈, demonstrou ser eficiente, pela boa recuperação dos diuréticos e pela baixa extração de interferentes urinários.

Campíns-Falcó e col. (1993) testaram a extração em fase sólida, em colunas Bond-Elut dos tipos: octadecil, ciclohexil e fenil, para extração de

amilorida, triantereno, clortalidona e furosemida. Somente para análise de acetazolamida, foi executada uma extração líquido-líquido em pH ácido.

2.7.1.1.2. Parâmetros para análise em CLAE

Na maioria das análises de diuréticos por CLAE, foram utilizadas colunas do tipo octadecil-sílica (C₁₈), com partículas de 5 µm. Ventura e col. (1993), no entanto, demonstraram que as colunas C₁₈, com partículas de 3 µm, são mais eficientes, em termos de separação e diminuição do tempo de análise. A relação entre o comportamento cromatográfico dos diuréticos e o tamanho da cadeia alquila na fase estacionária, foi estudada por De Croo e col. (1985).

O gradiente de eluição foi o mais empregado pelos autores (TISDALL e col. 1980, FULLINFAW e col. 1987, COOPER e col. 1989, PARK e col. 1989, TSAI e col. 1991, CAMPÍNS-FALCÓ e col. 1993, VENTURA e col. 1993), para a determinação de vários diuréticos em uma mesma análise. A fase móvel consistiu, geralmente, de tampão fosfato ou tampão acetato de amônio, tamponados em pH ácido e acetonitrila como modificador orgânico (Tabela 3). Estudos analíticos que utilizaram eluição isocrática (De CROO e col. 1985, SMITH e col. 1987, GUCHELAAR e col. 1999), demonstraram ser menos seletivos, além de proporcionarem maior tempo de análise.

A técnica de cromatografia líquida micelar (CLM), descrita por Domingo e col. (1992) e por Rosado-Maria e col. (2000), permite a injeção de urina diretamente no sistema. Nesta análise a fase móvel contém dodecil sulfato de sódio (SDS). A aplicação principal do CLM é a possibilidade da injeção direta da amostra biológica, no caso, urina, devido a habilidade dos agregados micelares dissolverem proteínas e outros compostos interferentes da urina. Através da técnica de CLM, Rosado-Maria e col (2000), obtiveram os seguintes limites de detecção, em µg/ mL: acetazolamida, 0,016; amilorida, 0,001; bumetanida, 0,021;

clopamida, 0,020; clortalidona, 0,001; espironolactona, 0,026; furosemida, 0,015; piretanida, 0,021; triantereno, 0,039.

O detector de escolha, para análise de diuréticos é o detector de absorvância no ultravioleta (UV) e no visível. Eles medem as variações na absorvância da luz na região de 190 a 360 nm, durante a passagem do efluente na célula de fluxo. Detectores deste tipo com rede de fotodiodos (cerca de 250), cada qual com seletividade a determinados comprimentos de onda, permitem a varredura do espectro da substância durante a eluição. Este detector é chamado de detector de rede de diodos (*diodo array detector* - DAD) (VENTURA e SEGURA 1996, CIOLA 1998).

Nos detectores de fluorescência, os comprimentos de onda são selecionados de acordo com os respectivos picos de excitação e emissão do analito. Deste modo, variações na fluorescência, são medidas após a passagem do efluente pela célula de fluxo (CIOLA 1998). Gradeen e col. (1990) utilizaram este tipo de detector, para análise da baixa concentração urinária de bumetanida inalterada, após uma dose terapêutica de 0,5 mg, pois, neste caso, a detecção por fluorescência é mais sensível e seletiva quando comparada ao UV.

Algumas técnicas de análise permitem que a amostra seja injetada diretamente no sistema sem prévia separação e/ou purificação dos analitos, como por exemplo, a descrita por Campíns-Falcó e col. (1994). Este autores utilizaram pré-coluna "switching" Hipersil ODS, que foi lavada com água, durante 1 minuto, para eliminação de interferentes polares presentes na urina e, em seguida, os analitos retidos foram lançados para a coluna analítica principal, através de uma válvula que interliga esses dois sistemas. A recuperação foi de 47 a 100%, entre os 12 diuréticos analisados. Os limites de detecção obtidos, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, foram: acetazolamida, 0,040; amilorida, 0,020; bumetanida, 0,004; clortalidona, 0,004; espironolactona, 0,020; furosemida, 0,002; hidroclorotiazida, 0,007; triantereno, 0,007.

2.7.1.2. Cromatografia a gás

2.7.1.2.1. Preparação das amostras

A análise em CG, da maioria dos diuréticos, apresenta dificuldades devido a natureza polar e baixa volatilidade destas substâncias, sendo por isso, necessária, uma etapa de derivatização, a qual permite que a molécula se torne volátil, com exceção da espironolactona e canrenona, que podem ser injetadas no CG, sem sofrerem esse processo (PARK e col. 1990).

Entre as várias reações de derivatização existentes, a metilação é reação de escolha por muitos autores (Tabela 4). Os dois principais processos de metilação descritos são: metilação extrativa e metilação com iodeto de metila em acetona (SEGURA e VENTURA 1996).

A metilação extrativa, descrita por Fagerlung e col. (1979), Gradeen e col. (1990), Lisi e col. (1991, 1992), Ehrhardt (1992), envolve a extração dos diuréticos

ácidos, através da formação de um par iônico, entre o analito ácido e um agente transferidor básico. Um exemplo deste tipo de agente, é o sal de amônio quaternário sulfato de tetrabutílamônio. Neste processo o agente transferidor é adicionado a urina contendo o analito ácido, formando o par iônico, um complexo agente-analito de características apolares. Em seguida, o solvente orgânico contendo o reagente de metilação (iodeto de metila) é adicionado a urina contendo o complexo. Desta forma o analito é transferido da fase aquosa, para a fase orgânica, entrando em contato com o reagente de metilação, já presente neste meio (LISI e col. 1991 e 1992).

A metilação com iodeto de metila em acetona (PARK e col. 1990, YOON e col. 1990, SAUGY e col. 1991, TSAI e col. 1991) consiste da ressuspensão do analito, após extração com solvente orgânico e evaporação até a secura, com solução de iodeto de metila em acetona e carbonato de potássio anidro. Além de grupamentos ácidos carboxílicos e sulfonamidas, esse procedimento permite a metilação de substâncias contendo aminas primárias (como o triantereno). Seu principal inconveniente é o longo tempo de incubação para alguns compostos (foram descritas incubação à 60°C por 2 a 8 horas).

Um outro tipo de derivatização de diuréticos, descrita por Bi e col. (1992), é o processo de silanização. Esta reação é indicada para diuréticos poupadores de potássio, como a amilorida. O processo se baseia na metanólise seguida pela silanização, com N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA).

2.7.1.2.2. Detecção por Espectrometria de Massa (EM)

A espectrometria de massa (EM) é utilizada como um sistema de identificação, após separação dos analitos, em cromatografia a gás ou líquida. CG-EM é também empregado na análise de diuréticos e seus metil derivados, apresentando alto grau de sensibilidade e seletividade. Sua utilização foi relatada

por alguns autores (CARRERAS e col. 1994, FAGERLUND, e col. 1979, LISI e col. 1991, 1992, YOON e col. 1990).

Através da utilização desta técnica, LISI e col (1992) obtiveram os seguintes limites de detecção em $\mu\text{g}/\text{mL}$: acetazolamida, 0,050; bumetanida, 0,010; clortalidona, 0,010; furosemida, 0,010; hidroclorotiazida, 0,010.

A EM consiste da determinação da massa e da abundância relativa dos íons produzidos após a fragmentação das moléculas na câmara de ionização do detector.

Existem diferentes tipos de detectores por espectrometria de massa, que utilizam diferentes sistemas de fragmentação do analito. Entre estes tipos temos a fragmentação por impacto de elétrons e ionização química, que são empregadas para análise de diuréticos.

O método por impacto de elétrons (IE) é o mais utilizado para a fragmentação e ionização dos diuréticos. Quando a amostra atinge o detector de EM, é bombardeada por uma corrente de 70 eV, embora 10 eV seja suficiente para causar a fragmentação. O excesso de energia é absorvido pela molécula, provocando a fragmentação e produção de íons negativos e positivos (ARDREY 1986).

Na ionização química (IQ), a amostra é misturada ao gás isobutano ou metano e, em seguida, bombardeado por uma corrente de elétrons, altamente energética. Os íons originados da fragmentação das moléculas das amostras e dos gases, como o CH_5^+ e o C_2H_5^+ , do metano, e C_4H^+ , no caso do isobutano, reagem, produzindo íons de maior massa, comparada ao método descrito anteriormente (ARDREY 1986).

COMPOSTOS	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECTOR	REFERÊNCIA
Furosemida	Shim-Pack GLC-CN 5 µm, 15 x 0.6 cm	Acetato de amônio 20 mM (pH 7,0): acetonitrila (eluição isocrática)	EM (IE)	Abdel-Hamid, e col. (2000)
11 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	Hypersil ODS 5 µm, 25 x 0.4 cm	Fosfato de sódio ou acetato de amônio 0.05M; propilamina 0.016 pH 3.0; acetonitrila. (gradiente de eluição)	DAD ^a : 230, 254, 275 nm	Campins-Falcó, e col. (1993)
12 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	Pré coluna- Hypersil ODS 5 µm, 20 x 2.1 mm; Coluna Hypersil ODS 5 µm, 25 x 0.4 cm	Tampão fosfato (pH 3) e acetonitrila (gradiente de eluição)	DAD: 230 nm	Campins-Falcó, e col. (1994)
23 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	Lichrosorb RP-18 5µm, 20x0.46 cm	Tampão fosfato de sódio 0.05M, propilamina 0.016M pH 3.0 acetonitrila (gradiente de eluição)	DAD: 230, 275 nm	Cooper, e col. (1989)

COMPOSTOS	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECTOR	REFERÊNCIA
20 diuréticos				
(ácidos, básico e neutros)	Li Chrosorb RP C ₁₈ 5µm, 15x0.46 cm	Diferentes fases móveis (eluição isocrática)	UV ^b : 238 ou 275 nm	De Croo, e col. (1985)
9 diuréticos				
(ácidos, básico e neutros)	Spherisorb ODS-2 5µm, 12.5 x 4 mm	Dodecil sulfato de sódio (SDS) 5%e metanol pH 6.9	UV- VIS 254 nm	Domingo, e col. (1992)
		12 % acetonitrila, ácido acético		
Amilorida	Waters C ₁₈ 10µm, 16x 0.5 cm	glacial, propilamina pH 4.5 (eluição isocrática)	UV: 365 nm	Forrest e Mc Innes. (1988)
12 diuréticos				
ácidos	LiChrosorb RP-18 5µm, 12.5x0.44 cm	Tampão fosfato 0.05 M pH 3.0 Acetonitrila	DAD: 271 nm	Fullinfaw, e col. (1987)
(tiazídicos e diuréticos de alça)		(gradiente de eluição)		
17 diuréticos	Lichrospher 100 RP-18 5 µm	Água, trietilamina, e ácido fosfórico pH 3.3 e 6.0 (eluição isocrática)	DAD: 273 nm	
(ácidos, básico e neutros)			Fluorescência: excitação 370 nm e emissão 435 nm	Guchelaar, e col. (1999)

COMPOSTOS	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECTOR	REFERÊNCIA
			DAD: 230, 240, 270, e 290 nm	
Bumetanida	Hypersil ODS 5 μ m, 10 x 0.21 cm	Acetato de amônio 0.05 M Acetonitrila (gradiente de eluição) Metanol e acetato de sódio	Fluorescência: excitação 230 nm emissão 415 nm	Gradeen, e col. (1990)
Furosemida	μ Bondapak C ₁₈ 10 μ m 30 x 3.9 cm	0.01 M pH 5.0 (eluição isocrática)	UV: 254 ou 280 nm	Lin, e col. (1979)
Amilorida e hidroclorotiazida	Spherisorb ODSII 5 μ m, 12.5 x 0.46 cm	Acetonitrila, metanol tampão fosfato tetraetilamônio pH 2.8 (eluição isocrática)	UV: 271 nm Fluorescência: excitação 368 nm e emissão 415 nm	van Der-Meer, e col. (1987)
13 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	Hypersil ODS 5 μ m, 10 x 0.46cm	Tampão fosfato de potássio 0.05M pH 6.8 acetonitrila (gradiente de eluição)	DAD: 220,273 328 nm	Park, e col. (1989)
18 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	Hypersil ODS 5 μ m, 15 x 0.3cm	Dodecil sulfato de sódio (SDS) pH 3.2: Propranolol; butanol ; pentanol; acetonitrila; THF	DAD: 220; 245, 275 nm	Rosado-Maria, e col. (2000)

COMPOSTOS	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECTOR	REFERÊNCIA
Furosemida	C ₁₈ 15 x 3.9 cm 4µm	Ácido fosfórico 0.08M acetonitrila (gradiente de eluição)	Fluorescência: excitação 233 nm emissão 389 nm	Saugy, e col. (1991)
10 diuréticos (tiazídicos)	Várias colunas ODS	Acetonitrila, ácido acético 1% (eluição isocrática)	UV: 254 nm	Smith, e col., (1987)
9 diuréticos (tiazídicos)	µBondapak C ₁₈ 10µm, 30 x 0.39 cm	Tampão fosfato 0.05 M pH 3.0 Acetonitrila (gradiente de eluição)	DAD: 271 nm	Tisdall e col. (1980)
13 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	Bondclone ODS 10µm, 30 x 0.39 cm	Tampão fosfato de sódio 0.16 M Propilamina pH 3.0 acetonitrila (gradiente de eluição)	DAD: 230, 275 nm	Tsai, e col. (1991)
12 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	SGE 100 GL-4 C ₁₈ P 5µm, 10 x 0.4 cm	Várias fases móvel (eluição isocrática)	EM TSP/PSP	Ventura e col. (1991)
20 diuréticos (ác, bás., neutros)	Ultrasphere ODS 3µm, 7.5 x 0.46 cm		DAD: 240, 270, 290, 300, 318, 350 nm	Ventura e col. (1993)

DAD^a: detector de rede de diodos (*diode array detector*); UV^b: detector por absorvância no ultravioleta.

TABELA 4. Procedimentos de derivatização e sistemas de detecção utilizados para análise de diuréticos em cromatografia à gás.

COMPOSTOS	AMOSTRA	DERIVATIZAÇÃO	DETECÇÃO	REFERÊNCIA
Amilorida	urina	Silanização	EM (IE)	Bi e col. (1992)
20 diuréticos (ácido, básicos e neutros)	urina	Comparação de derivatizações	EM (IE)	Carrera e col. (1994)
16 diuréticos (ácidos, básicos e neutros)	urina	Metilação extrativa	EM (IE)	Ehrhardt e col. (1992)
11 diuréticos (sulfonamídicos)	soluções padrão	Metilação extrativa	EM (IE)	Fargelung e col. (1979)
Bumetanida	urina	Metilação extrativa	EM	Gradeen e col. (1990)
15 diuréticos (ác., bás. e neutros)	urina	Metilação extrativa	EM (IE)	Lisi e col. (1991)
15 diuréticos (ácido, básico e neutros)	urina	Metilação extrativa	EM (IE)	Lisi e col. (1992)

Continuação da TABELA 4.

COMPOSTOS	AMOSTRA	DERIVATIZAÇÃO	DETECÇÃO	REFERÊNCIA
9 diuréticos (ácidos, básicos e neutros)	urina	Metilação com ICH ₃ , em acetona	EM (IE)	Park, e col. (1990)
Furosemida	urina, soro	Metilação com ICH ₃ , em acetona	EM (IE, IQ))	Saugy, e col. (1991)
Hidroclorotiazida	urina	Metilação com ICH ₃ , em acetona	EM (IE)	Tsai, e col. (1991)
10 diuréticos (ácidos, básico e neutros)	soluções padrão	Metilação com ICH ₃ , em acetona	EM (IE)	Yoon, e col. (1990)

DCE: detector por captura de elétron; EM: espectro de massa; IE: ionização por impacto de elétrons; IQ: ionização química.

2.7.1.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Olmos e col. (2000) descreveram uma técnica de CCD para a análise de triagem em urina de nove diuréticos com diferentes características ácido-básicas. Nesta técnica foi realizada uma extração em fase sólida e as amostras aplicadas em placas contendo silicagel 60 GF 254 (20 x 10 cm). A fase móvel foi acetato de etila. A detecção foi realizada através de lâmpada UV, emitindo comprimentos de onda de 254 e 366 nm após aplicação de solução de N-naftilendiamina a 0,5% como revelador. Esta técnica permitiu a obtenção dos

seguintes limites de detecção em $\mu\text{g}/\text{mL}$: acetazolamida, 5,0; amilorida, 0,1; bumetanida, 5,0; espironolactona, 2,0; furosemida, 0,1; triantereno 0,1.

2.7.1.4. Eletroforese Capilar (EC)

A eficiência da eletroforese capilar depende da mobilidade eletroforética e da baixa interação dos analitos com os grupamentos silanol, presentes na parede da coluna cromatográfica. Esses grupamentos atuam como trocadores catiônicos. Todos os analitos são arrastados do ânodo ao cátodo, por um fluxo eletro-osmótico, cuja magnitude é normalmente maior do que a mobilidade eletroforética dos analitos.

A técnica de eletroforese capilar (EC) acoplada à detecção UV foi empregada por vários autores (JUMPANNEN e col. 1993, RIEKKOLA e col. 1996, GONZÁLEZ e LASERNA. 1996). Jumpannen e col. (1993) analisaram os compostos contendo grupamentos sulfanamida e grupos carboxílicos, em meio básico, através da utilização do tampão ácido 3-(ciclohexilamina)-1-propanicosulfônico, pH 10,6. Diuréticos com o grupamento amina foram separados em meio ácido com tampão acetato de betaina em pH 4,5. Jumpannen e col. (1993), obtiveram os seguintes limites de detecção em $\mu\text{g}/\text{mL}$: acetazolamida, 0,042; amilorida, 0,016; bumetanida, 0,019; clopamida, 0,026; clortalidona, 0,027; furosemida, 0,013; hidroclorotiazida, 0,031; triantereno, 0,057. González e col. (1996) relataram os parâmetros da migração eletroforética dos diuréticos, utilizando tampão fosfato em pH 8,0.

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O presente trabalho tem por objetivo otimizar e validar um método analítico que possa ser aplicado como triagem, para detectar os seguintes diuréticos: acetazolamida, amilorida, bumetanida, clopamida, clortalidona, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida e triantereno em amostras de urina, com a finalidade de controle da dopagem, utilizando-se a extração líquido-líquido e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodos (DAD).

Para atingir tal objetivo, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Pesquisa bibliográfica com o intuito de selecionar métodos de extração e detecção para análise de diuréticos em urina;
 - Otimização e validação de um método para a detecção de diuréticos em amostras de urina, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência;
 - Aplicação do método otimizado e validado em amostras de urina de atletas.
-

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Padrões

Diuréticos

Acetazolamida (WYETH-WHITEHALL)

Amilorida (PRODOME)

Bumetanida (SINTOFARMA)

Clopamida (NOVARTIS)

Clortalidona (NOVARTIS)

Espironolactona (SEARLE)

Furosemida (PRODOTTI)

Hidroclorotiazida (PRODOTTI)

Piretanida (HOESCHT MARION ROUSSEL)

Triantereno (SANOFI-WINTROP)

Padrão Interno

Cafeína (NOVARTIS)

4.1.2. Soluções-padrão

4.1.2.1. Soluções-estoque

Soluções metanólicas de cada diurético e de padrão interno a 2 mg/ mL, com exceção da solução de triantereno, que foi preparada em uma concentração de 0,4 mg/ mL. As soluções foram armazenadas em freezer à -20°C.

4.1.2.2. Soluções de trabalho

Soluções metanólicas de cada diurético e de padrão interno foram preparadas a partir das soluções-estoque, na concentração de 100 µg/ mL. As soluções de 10 µg/ mL, por sua vez, foram preparadas a partir de diluições das soluções de 100 µg/ mL. Todas as soluções foram armazenadas à -4°C.

4.1.3. Solventes e reagentes

Acetato de amônio (Backer Chemical)

Acetato de chumbo (Backer Chemical)

Acetato de etila Ohminisolv® (EM Science)

Acetonitrila Ohminisolv® (EM Science)

Ácido orto-fosfórico p.a. (Merck)

Água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q® (Millipore)

Bicarbonato de sódio p.a. (Merck)

Carbonato de potássio p. a. (Merck)

Cloreto de amônio p.a. (Merck)

Fosfato de potássio dibásico p.a. (Merck)

Fosfato de sódio dibásico p.a. (Merck)

Metanol Ohminisolv® (EM Science)

4.1.4. Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1100 (Hewlett - Packard), equipado com:

Desgaseificador a vácuo G 1322A

Bomba Binária G 1312 A

Injetor Automático G 1313 A

Compartimento da Coluna Termostatizada G 1316 A

Detector de arranjo de diodos (DAD) G 1315 A;

- Coluna Spherisorb ODS 2 (125 x 4 mm I.D.), partículas de 5 µm (Hewlett – Packard);
- Frascos âmbar de 1,5 mL, septos de silicone e tampas de rosca (Hewlett – Packard);
- Agitador de tubos (Fanem, mod. 25);
- Balança eletrônica semi analítica e balança analítica (Sartorius);
- Homogeneizador (Tecnal);
- Centrífuga (Universal 16 A);
- Bloco térmico (Pierce: Reacti-therm Heatin, Modelo 18870) com fluxo de nitrogênio (Reacti-Va, Modelo 18780);
- Ultrassom (Thornton);
- Medidor de pH DMPH-2 (Digimed);
- Compressor aspirador Dia-pump® (Fanem);
- Pipetas automáticas com volume reguláveis (Finnpipette®, Labsystems; Pipetman®, Glison);
- Filtros Millex em polietileno com membrana Durapore® 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro, não estéril (Millipore);

- Vidraria para filtração da fase móvel em geral;
- Tubos de vidro de centrifuga com capacidade para 10 mL com tampa esmerilhada;
- Tubos de vidro para evaporação com capacidade para 10 mL;
- Seringa de Polipropileno 28 x 8 10 mL (Plastipak);
- Membrana GS em éster de celulose, 0,22 μ m de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore).

4.1.5 Amostra de urina

4.1.5.1. Amostras de referência negativa

Utilizou-se um *pool* de urina referência negativa, preparado a partir de cinco amostras de urinas fornecidas por voluntários que não fizeram uso de cafeína e nem de diuréticos. A cafeína, por sua vez, não foi ingerida durante os últimos cinco dias que antecederam a coleta. Estas amostras foram utilizadas para a análise de interferentes normais que podem ser extraídos durante o processo.

4.1.5.2. Amostras de referência positiva

Para os estudos de extração e validação, foi utilizado como referência positiva o *pool* urinário descrito do item 3.1.5.1., adicionado dos dez padrões de diuréticos selecionados para o presente estudo.

4.1.5.3. Amostras selecionadas para o estudo da especificidade do método

Foram empregadas 20 amostras de urina de pacientes de ambulatório e internados do Instituto do Coração (INCOR), que recebiam tratamento com diuréticos e outros fármacos.

4.1.5.4. Amostras de urina de atletas para análise de triagem de diuréticos

Foram analisadas 4 amostras de urina de atletas que decalram uso de diuréticos e 12 amostras de urina de atletas, fornecidas pelo Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2. Métodos

4.2.1. Otimização das condições cromatográficas

Soluções padrão de 100 µg/ mL contendo: acetazolamida, amilorida, bumetanida, clopamida, clortalidona, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida, triantereno e padrão interno, cafeína, foram utilizadas para a otimização da análise, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodos (DAD). A coluna cromatográfica selecionada foi a Spherisorb ODS2 com partículas de 5 µm e dimensões de 125 x 4,0 mm.

A fase móvel foi constituída de solução tampão acetato de amônio 0,05M (pH 3,0) e acetonitrila (VENTURA e col. 1993). Esta solução foi filtrada através de uma membrana GS em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 47 mm de

diâmetro e desgaseificada por um sistema constituído de ultra-som e compressor-aspirador.

Os comprimentos de onda mais adequados de cada diurético, para a melhor detecção pelo DAD, foram selecionados por meio de análises dos espectros de varredura de absorção, de cada diurético, na região do UV-visível (200 a 400 nm).

Para a separação cromatográfica das substâncias contidas na solução-trabalho de 100 µg/ ml, foram realizadas análises por CLAE com proporções variadas do gradiente de eluição, para a seleção do melhor resultado, tendo como base o gradiente de eluição proposto por Ventura e col. (1993), a qual consiste de: 10% de acetonitrila inicialmente, aumentando para 15% em 2 min, 45% em 5min, 60% em 8 min, mantendo-se nesta proporção por 1 min e então, diminuindo até as condições iniciais. Foi determinado o tempo de retenção relativo (TRR) de cada diurético, que é a relação do tempo de retenção (TR) do diurético pelo padrão interno (PI). O cálculo foi feito pela média do TR obtido de ensaios realizados durante três dias intercalados, estabelecendo-se coeficientes de variação menores que 20%.

4.2.2. Otimização do procedimento de extração líquido-líquido

De acordo com a natureza química dos grupos funcionais, os diuréticos podem apresentar, segundo a Tabela 2, características ácido-básicas diferentes. Dessa maneira, o método de extração de escolha foi o proposto por Cooper e col., por empregar duas extrações: uma em pH ácido e a outra, em pH alcalino.

A extração ácida é feita com tampão sólido KH_2PO_4 e NaH_2PO_4 (99:1 p/p), pH 5,0 a 5,5. Com o objetivo de remover interferentes urinários, que podem ser extraídos nesta condição de pH, utiliza-se solução de acetato de chumbo a 5% o que caracteriza um processo de lavagem. Para a extração

alcalina, a urina é tratada com NaHCO_3 e K_2CO_3 (3:2 p/p), obtendo-se pH 9,0 a 9,5. Nas duas extrações, o solvente extrator empregado é o acetato de etila.

Após a homogeneização e a separação das fases aquosa e orgânica, é realizada a evaporação desta última, até a secura. Os resíduos são reconstituídos em 200 μL de acetonitrila e água (15:85 v/v) e subseqüentemente, filtrados. Em seguida, os filtrados são injetados no cromatógrafo.

No presente trabalho, foi feita uma modificação na etapa final deste método de extração. Ao invés de juntar os resíduos, obtidos ao final de cada extração, como fez Cooper e col (1989), os resíduos foram injetados e analisados separadamente, no cromatógrafo. A extração foi realizada em amostras de urina referência positiva, conforme descrita no item 4.1.5.2., com as seguintes concentrações: 40,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acetazolamida; 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de amilorida; 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bumetanida; 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de clopamida; 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clortalidona; 8,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espironolactona; 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de furosemida; 4,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hidroclorotiazida; 2,88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de piretanida e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triantereno.

Os fluxogramas dos procedimentos de extração estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

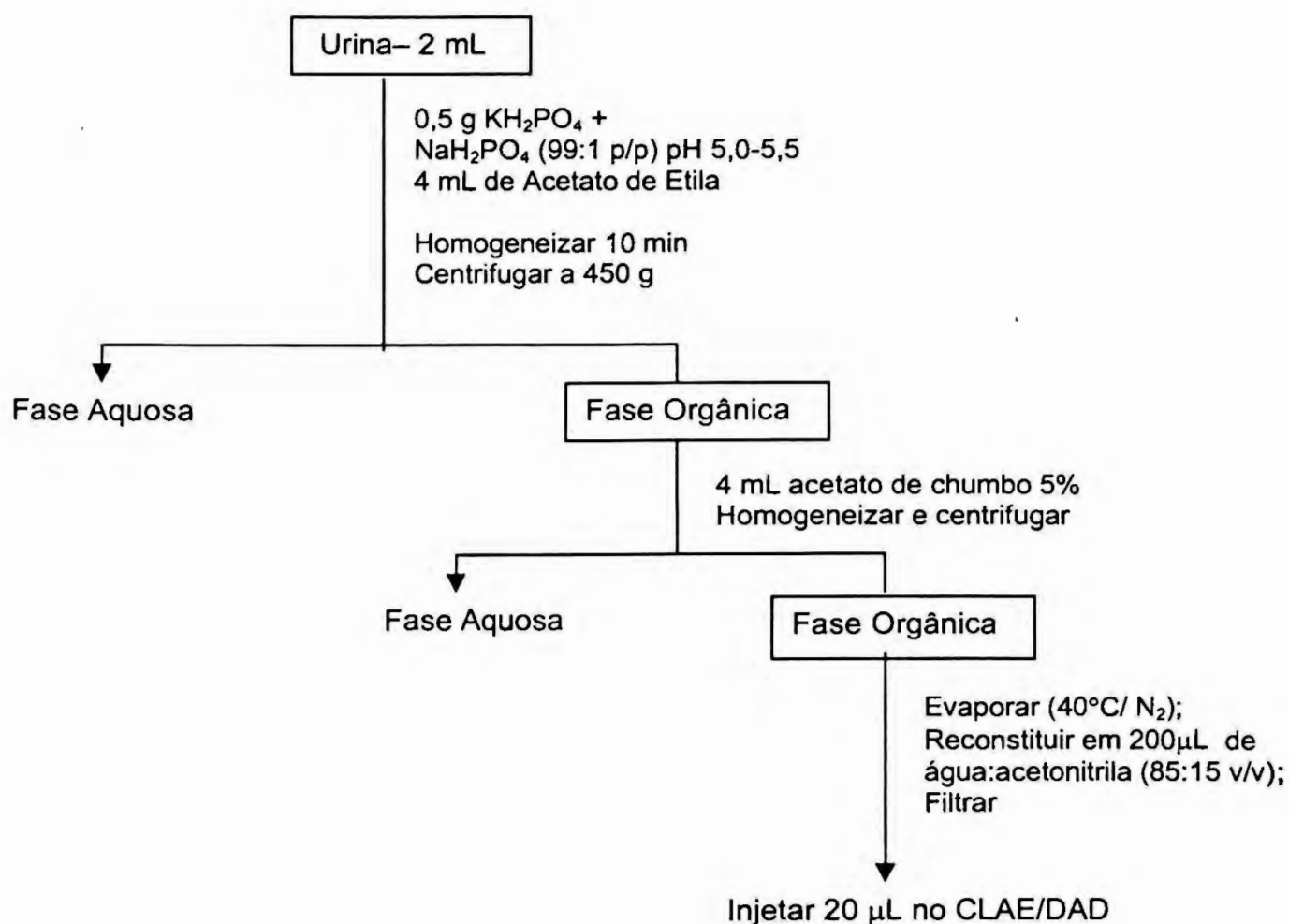


FIGURA 10. Fluxograma representando o procedimento analítico para a extração de diuréticos em pH 5,0 – 5,5, baseada em Cooper e col. (1989).

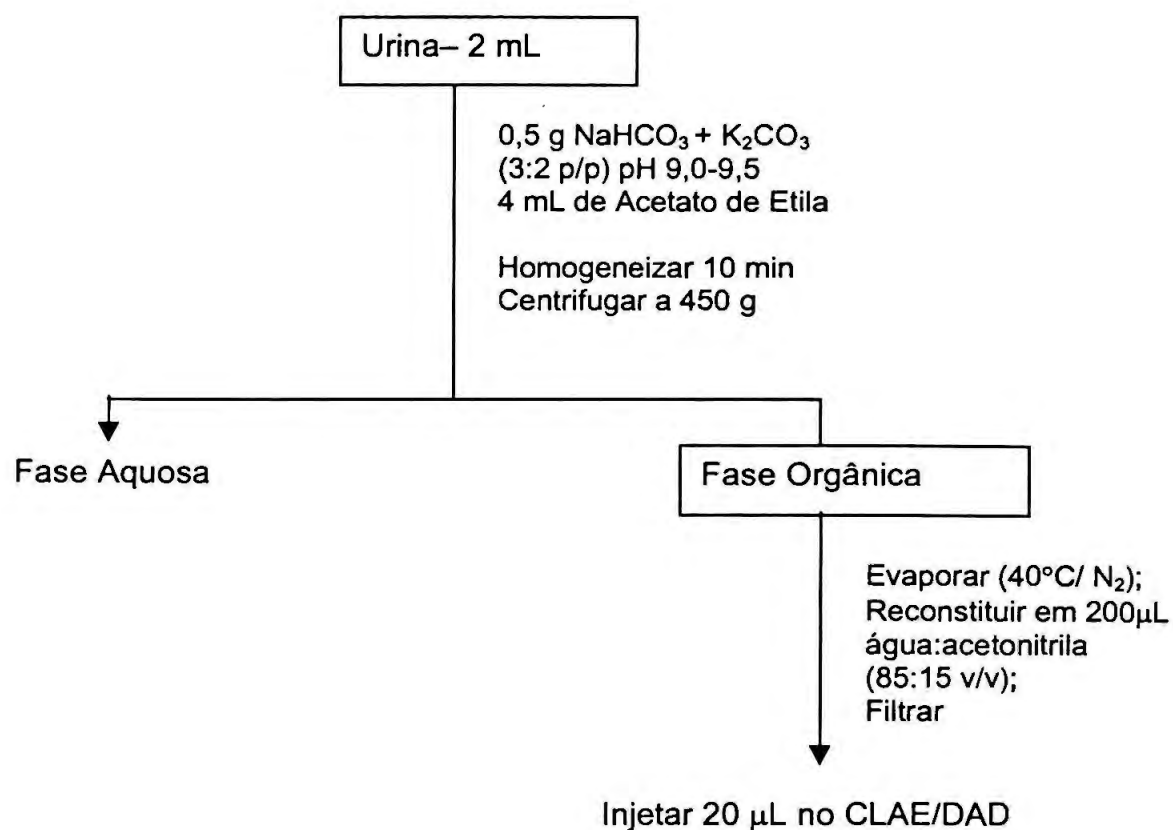


FIGURA 11. Fluxograma representando o procedimento analítico da extração de diuréticos em pH 9,0 - 9,5, baseada em Cooper e col. (1989).

Aplicando-se o método de extração, ilustrados nas Figuras 10 e 11, em amostras de urina referência negativa, descritas em 4.1.5.1., e em amostras referência positivas, descritas em 4.1.5.2., realizou-se, respectivamente análises dos possíveis interferentes urinários normais e a determinação do perfil cromatográfico dos dez diuréticos selecionados neste estudo. Após análise deste último, foi possível determinar as condições de extração (pH) mais adequados para cada um dos dez diuréticos para, proceder em seguida, a validação do método.

4.2.3. Validação do método proposto

4.2.3.1. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) de cada diurético foi determinado a partir de sucessivas diluições das amostras de referência positiva (conforme descrito em 3.1.5.2.) e análise, segundo o método ilustrado nas Figuras 10 e 11. Os menores valores foram determinados através da menor área, com coeficiente de variação (CV) menor que 20%, entre 10 replicatas.

4.2.3.2. Estabelecimento da faixa de concentração dos diuréticos utilizada na validação do método proposto

Para a realização das análises de recuperação, precisão intra e interensaio e estabilidade, empregou-se a seguinte faixa de concentração: uma baixa, sendo 2 vezes o valor da concentração correspondente ao limite de detecção (LD) e uma concentração alta, sendo 2 vezes o valor da concentração urinária, 24 horas após a administração de uma única dose, em condições terapêuticas. Estes últimos valores foram estabelecidos de acordo com a

revisão da literatura, onde foram analisadas a farmacocinética de cada diurético, cujos valores estão descritos na Tabela 5.

Os métodos de extração empregados nestas análises, foram aqueles que estão ilustrados nas Figuras 10 e 11.

TABELA 5. Valores encontrados na literatura referentes às concentrações urinárias dos diuréticos após 24 h da administração de uma única dose terapêutica.

Diurético	Apresentação (mg)	Concentração urinária após 24 h da administração ($\mu\text{g/mL}$)	Referências
Acetazolamida	250	20	Cooper e col. (1989)
Amilorida	5	1,25	Guchelaar e col. (1999)
Bumetanida	5	0,5	Cooper e col. (1989)
Clopamida	5	0,75	Guchelaar e col. (1999)
Clortalidona	5	1,0	Guchelaar e col. (1999)
Espironolactona	25	0,3	Cooper e col. (1989)
Furosemida	25	3,0	Cooper e col. (1989)
Hidroclorotiazida	25	2,0	Cooper e col. (1989)
Piretanida	6	1,44	Guchelaar e col. (1999)
Triantereno	50	1,25	Guchelaar e col. (1999)

4.2.3.3. Recuperação

A recuperação de cada diurético foi determinada em amostras de urina de referência positiva, descrita em 4.1.5.2., com faixas de concentração e extração conforme o item 4.2.3.2.

A recuperação foi calculada, em porcentagem, por meio da comparação dos valores das áreas dos diuréticos extraídos com as áreas dos diuréticos não extraídos.

4.2.3.4. Precisão intra-ensaio e interensaio

A precisão, intra-ensaio (em um mesmo dia) e interensaio (em três dias intercalados), foi determinada em amostras de urina de referência positiva, descrita em 3.1.5.2., com faixas de concentração e extração conforme o item 3.2.3.2. em seis replicatas. A imprecisão foi calculada pelo valor do coeficiente de variação das áreas obtidas, considerando-se valores menores que 20%.

4.2.3.5. Especificidade

Este estudo teve como objetivo analisar se os método de extração e a análise em CLAE são específicos para os diuréticos envolvidos, quando é avaliada a presença de outros fármacos na urina.

Para a verificação de possíveis interferentes, foram analisadas 20 amostras de urina de voluntários com problemas cardíacos, que além do uso de diuréticos, eram submetidos o tratamento com outros fármacos, conforme descrito em 3.1.5.3. Os cromatogramas foram monitorados por meio cálculos de tempo de retenção relativo (TRR) e análise do espectro na região do UV-visível.

4.2.3.6. Estabilidade

4.2.3.6.1. Após 24 horas da extração

Este estudo teve como finalidade determinar a estabilidade dos analitos durante o processo normal de análise, ou seja, durante o tempo em que permanecem na bandeja de injeção do cromatógrafo.

A determinação foi realizada em amostras de urina de referência positiva, descrita em 3.1.5.2., com faixas de concentração e extração conforme o item 4.2.3.2., em seis replicatas. As amostras foram injetadas imediatamente após

as extrações e permaneceram na bandeja de injeção do cromatógrafo por 24 horas, à temperatura ambiente entre 24 a 22,5°C, quando foram novamente injetadas e analisadas.

A estabilidade foi determinada pela comparação entre os valores de área da primeira injeção com as da segunda injeção e por cálculos de coeficiente de variação (CV < 20%).

4.2.3.6.2. Após 52 dias de armazenamento

O estudo de estabilidade de armazenamento da amostra em um período tempo, tem como o objetivo a análise do analito frente a eventuais perdas ou degradações que poderiam prejudicar a fidelidade da análise. A determinação foi realizada em amostras de urina de referência positiva, descrita em 4.1.5.2., com faixas de concentração e extração conforme o item 4.2.3.3., em 6 replicatas

As amostras foram armazenadas no freezer à -20°C e permaneceram por 52 dias, quando foram extraídas e analisadas em CLAE.

Para os cálculos foram determinados os coeficientes de variação e a porcentagem de variação das concentrações, entre as amostras não armazenadas e as armazenadas.

3.2.4. Aplicação do método otimizado e validado

Para a aplicação do método otimizado e validado, foram realizadas análises de triagem em quatro amostras de urina de atletas, que declararam o uso de diuréticos alguns dias, ou horas, que antecederam a coleta. Também, foram realizadas análises de triagem em doze amostras de urina de atletas, fornecidas pelo Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

5. RESULTADOS

5.1. Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas que apresentaram os melhores resultados para a detecção do 10 diuréticos, utilizando a cafeína como o padrão interno (PI), estão apresentados abaixo.

- Fase móvel: solução tampão de acetato de amônio 50 mM, pH 3,0 e acetonitrila. Gradiente de eluição: inicialmente 10% de acetonitrila, 15% em 2 minutos, 30% em 4 minutos e 60% em 8 minutos, e a partir deste tempo, diminuir a quantidade de acetonitrila até as condições iniciais;
 - Temperatura do forno da coluna: 35 °C
 - Fluxo da fase móvel 1,5 mL/min;
 - Pressão: 120-122 bar
 - Volume de injeção: 20 µL;
 - Tempo de análise 10 min;
 - Tempo entre análises: 2 min;
 - Comprimentos de onda selecionados: 260, 270, 360 nm.
 - Eventos de integração:
 - Parâmetros:
 - Altura rejeitada: 4
 - Área rejeitada: 10
 - Sensibilidade de inclinação: 15
 - Largura do pico: 0,1
 - Linha de Bases: em 2,10 e 6,00 min
-

Pela avaliação dos espectros de absorvância dos diuréticos e da cafeína (PI), apresentados na Figura 12, selecionou-se os comprimentos de onda a 260, 270, 360 nm para serem aplicados ao método deste estudo.

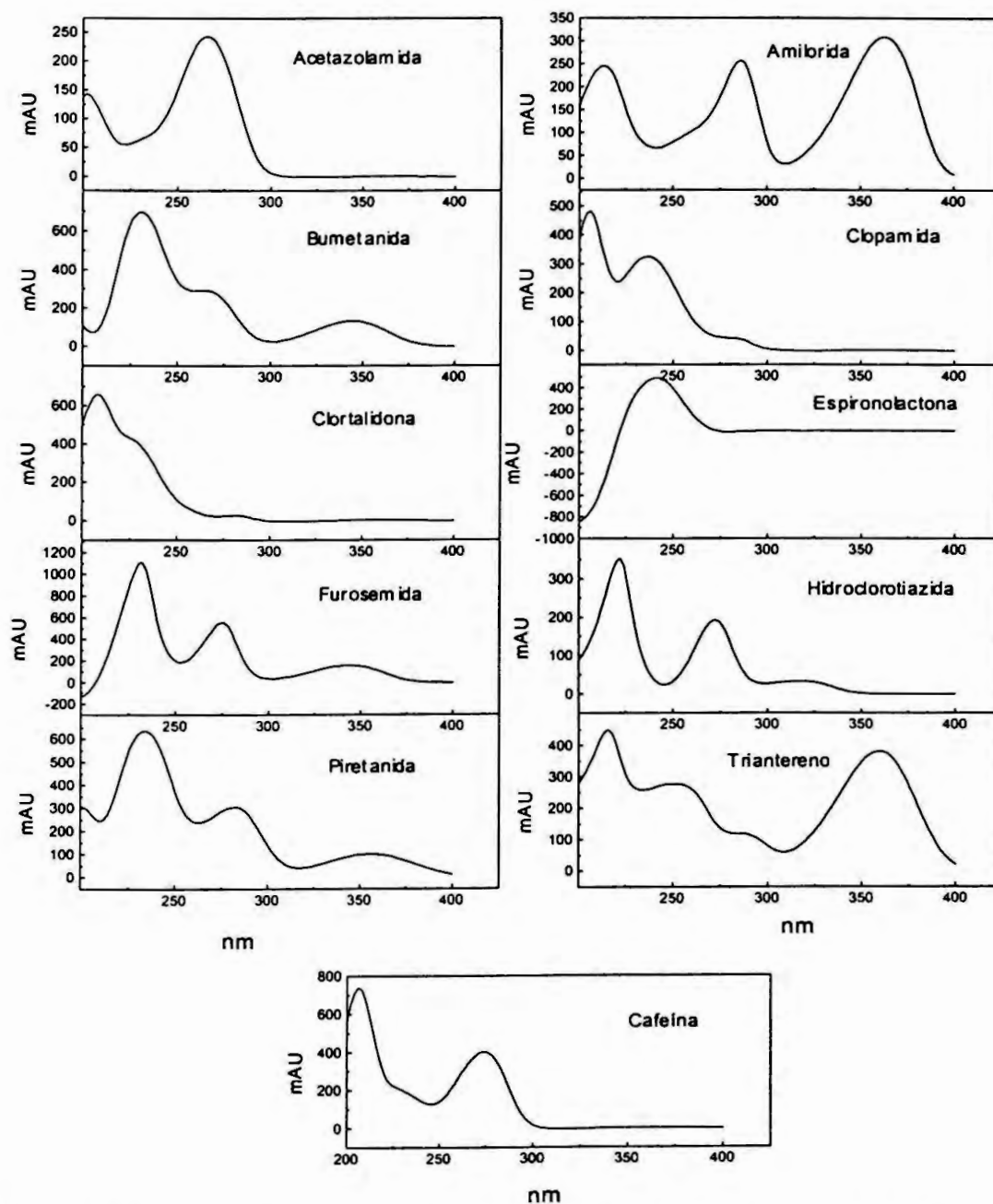


FIGURA 12. Espectros de absorvância no UV-visível (varredura de 200 a 400 nm) dos dez diuréticos e da cafeína (PI).

A Figura 13 ilustra os cromatogramas do *pool* de padrões dos dez diuréticos e do padrão interno, cafeína, analisados nos três comprimentos de onda selecionados, segundo a otimização descrita. A Tabela 6. resume os rcomprimentos de onda mais adequados para cada fármaco.

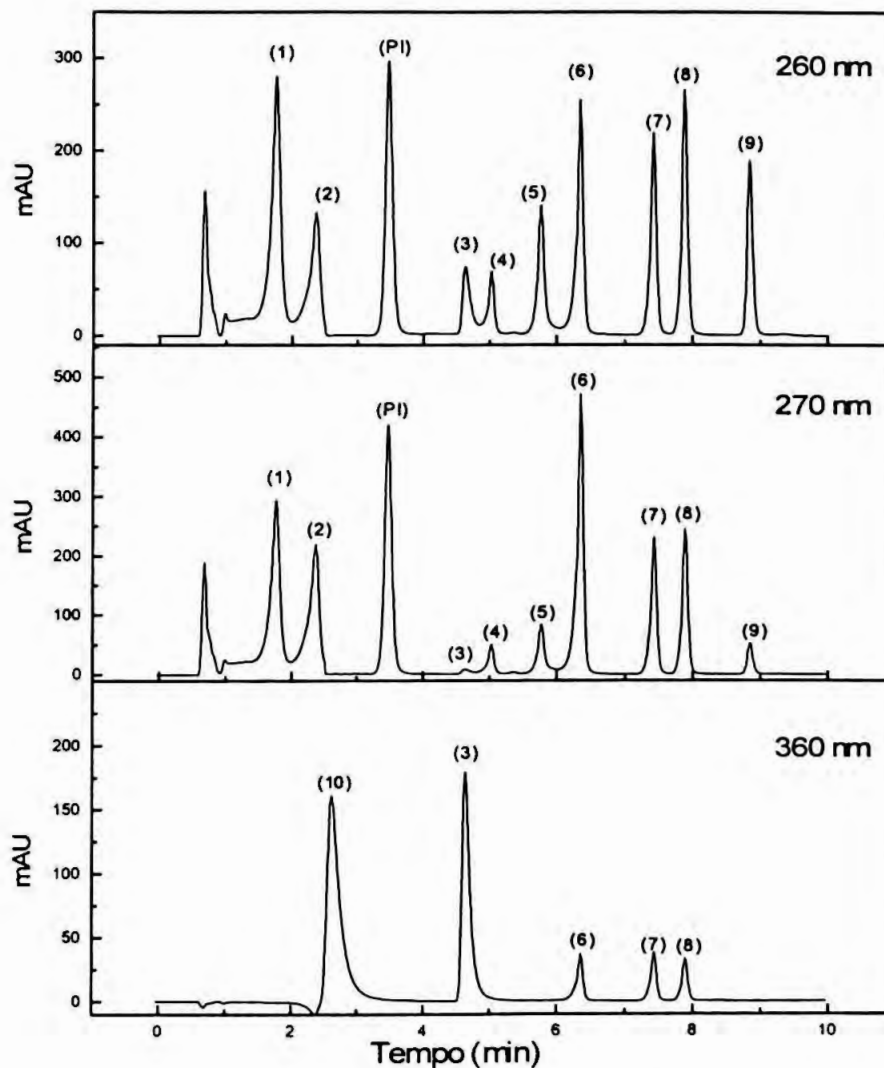


FIGURA 13. Cromatogramas do *pool* de soluções de padrões de diuréticos a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm e gradiente de eluição com inicialmente 10% de acetonitrila, 15% em 2 min, 30% em 4 min e 60% em 8 min, totalizando 10 min de tempo de análise. (1) acetazolamida; (2) hidroclorotiazida; (3) triantereno; (4) clortalidona; (5) clopamida; (6) furosemida; (7) piretanida; (8) bumetanida; (9) espironolactona; (10) amilorida; (PI) cafeína.

TABELA 6. Valores de comprimentos de onda mais adequados para análise de cada diurético e cafeína nas condições cromatográficas otimizadas.

Fármaco	Comprimento de onda (nm)
Acetazolamida	260
Amilorida	360
Bumetanida	260
Cafeína	260 e 270
Clopamida	260
Clortalidona	260
Espironolactona	260
Furosemida	270
Hidroclorotiazida	270
Piretanida	260
Triantereno	360

Os tempos de retenção relativo (TRR) de cada diurético, estão descritos na Tabela 7.

TABELA 7. Tempo de retenção (TR) e respectivos desvios padrão, coeficiente de variação (CV) e tempo de retenção relativo (TRR) dos dez diuréticos e cafeína (PI) nas condições cromatográficas otimizadas. Análise realizada em sextuplicata.

Fármaco	Média dos TR obtidos em análises de interensaios (min)			Média	DP	CV (%)	TRR ^a
	1.º dia	2.º dia	3.º dia				
Acetazolamida	1,78	1,81	1,79	1,79	± 0,015	0,838	0,52
Amilorida	2,77	2,75	2,74	2,75	± 0,015	0,545	0,80
Bumetanida	7,90	7,90	7,91	7,90	± 0,006	0,076	2,30
Cafeína	3,42	3,46	3,43	3,44	± 0,021	0,610	1,00
Clopamida	5,75	5,77	5,76	5,76	± 0,010	0,174	1,66
Clortalidona	5,06	5,06	5,04	5,05	± 0,016	0,317	1,47
Furosemida	6,37	6,40	6,39	6,39	± 0,015	0,235	1,86
Espironolactona	8,81	8,84	8,84	8,83	± 0,017	0,193	2,57
Hidroclorotiazida	2,39	2,42	2,41	2,41	± 0,015	0,622	0,70
Piretanida	7,44	7,47	7,46	7,46	± 0,015	0,201	2,18
Triantereno	4,70	4,71	4,69	4,70	± 0,010	0,213	1,37

^a Tempo de Retenção Relativo à Cafeína

5.2 Otimização do procedimento de extração líquido-líquido

As extrações em meio ácido (pH 5,0-5,5) e básico (pH 9,0-9,5) baseadas no método de Cooper e col. (1989), descrita em 4.2.2., foram adequadas para o presente estudo, já que não se verificou a presença de interferentes urinários, que poderiam prejudicar a análise dos cromatogramas. Os cromatogramas de amostras de urina de referência negativa são apresentados nas Figuras 14 e 15. As Figuras 16 e 17 ilustram os cromatogramas das extrações de amostras de urina de referência positiva contendo os dez diuréticos selecionados no presente trabalho e a cafeína. A Tabela 8 aponta as condições de pH mais adequadas, para análise de cada um dos dez diuréticos.

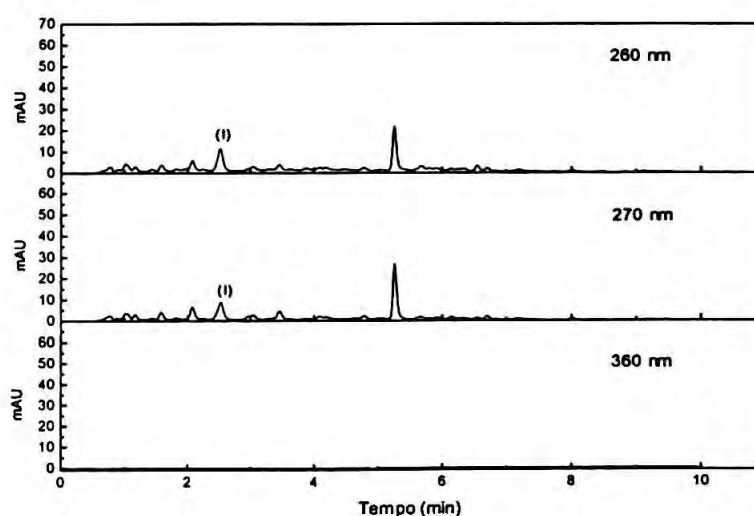


FIGURA 14. Cromatogramas obtidos nos presente estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração ácida (pH 5,0-5,5), sugerido por Cooper e col (1989), do *pool* (n=5) de urina referência negativa para diuréticos e cafeína. (I) Intereferente.

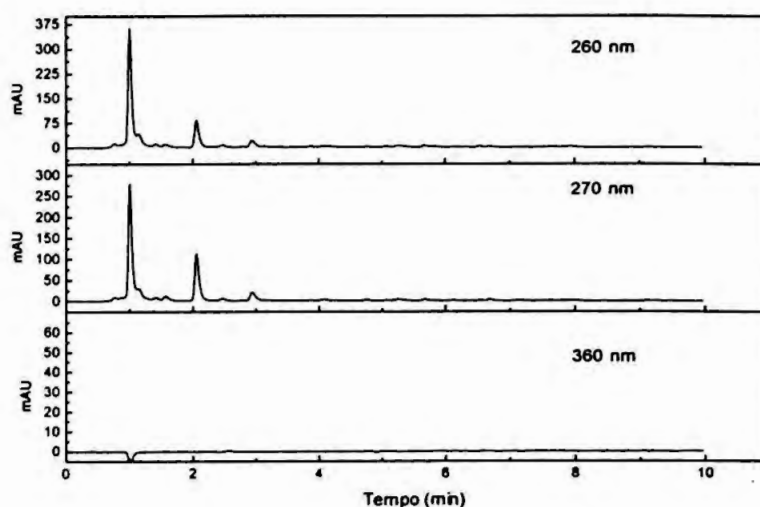


FIGURA 15. Cromatogramas obtidos no presente estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração básica (pH 9,0-9,5), sugerido por Cooper e col (1989), do *pool* (n=5) de urina referência negativa para diuréticos e cafeína

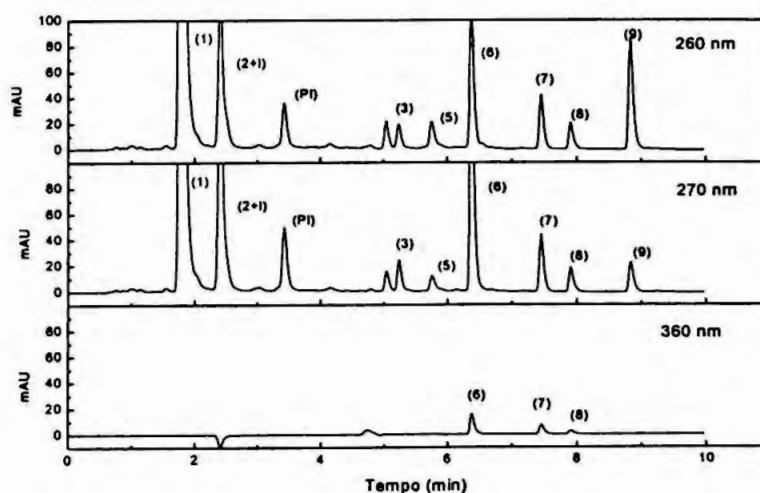


FIGURA 16. Cromatogramas obtidos no presente estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração ácida (pH 5,0 -5,5), sugerido por Cooper e col. (1989), do *pool* (n=5) de urina com adição dos seguintes padrões (1) acetazolamida (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (2+1) hidroclorotiazida coeluído com interferente; (3) triantereno (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (4) clortalidona (2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (5) clopamida (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (6) furosemida (6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (7) piretanida (2,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (8) bumetanida (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (9) espironolactona (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (10) amilorida (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (PI) cafeína (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

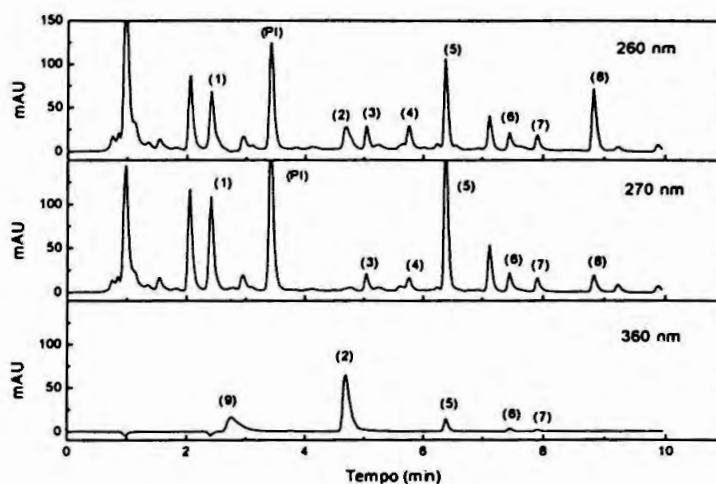


FIGURA 17. Cromatogramas obtidos no presentes estudo em comprimentos de onda de 260, 270 e 360 nm, referentes à extração básica (pH 9,0-9,5), sugerido por Cooper e col. (1989), do *pool* (n=5) de urina com adição dos seguintes padrões (1) hidroclorotiazida (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (2) triantereno (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (3) clortalidona (2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (4) clopamida (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (5) furosemida (6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (6) piretanida (2,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (7) bumetanida (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (8) espironolactona (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (9) amilorida (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (PI) cafeína (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

TABELA 8. Condições de pH de extração mais adequadas para análise de cada diurético.

Diuréticos	Extração
Acetazolamida	ácida
Amilorida	básica
Bumetanida	ácida
Clopamida	ácida
Clortalidona	ácida
Espironolactona	ácida
Furosemida	ácida
Hidroclorotiazida	básica
Piretanida	ácida
Triantereno	básica

5.3. Validação do método proposto

5.3.1. Limite de detecção

Os valores de limite de detecção (LD) dos dez diuréticos estão apresentados na Tabela 9

TABELA 9. Valores dos limites de detecção dos dez diuréticos.

Diuréticos	LD ($\mu\text{g/ mL}$)
Acetazolamida	0,09
Amilorida	0,75
Bumetanida	0,35
Clopamida	0,25
Clortalidona	0,25
Espironolactona	0,25
Furosemida	0,125
Hidroclorotiazida	0,09
Piretanida	0,50
Triantereno	0,09

5.3.2. Recuperação

A porcentagem de recuperação média de cada diurético, estão descritas na Tabela 10

TABELA 10. Valores das recuperações obtidas para concentrações altas e baixas de cada um dos dez diuréticos estudados, após extrações ácida e básica.

Diuréticos	Concentrações ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% recuperação em extração ácida	% recuperação em extração básica
	40	62,48	-
Acetazolamida	0,18	51,74	-
	2,5	-	43,44
Amilorida	1,5	-	55,26
	1,0	88,12	50,22
Bumetanida	0,7	85,63	75,12
	1,0	83,83	91,28
Clopamida	0,5	80,24	88,04
	2,0	94,82	79,72
Clortalidona	0,5	72,63	81,43
	8,80	87,19	50,22
Espironolactona	0,5	39,16	75,12
	6,0	62,54	33,25
Furosemida	0,25	66,34	31,24
	4,0	-	82,56
Hidroclorotiazida	0,18	-	69,30
	2,88	66,32	23,72
Piretanida	1,0	44,59	18,54
	2,5	5,76	72,05
Triantereno	0,18	-	41,41

5.3.3. Precisão intra e interensaio

Os resultados de precisão intra e interensaio, estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11. Resultados obtidos na avaliação da precisão intra-ensaio realizada em sextuplicata em amostras de urina adicionadas de diuréticos.

Diurético	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Média da área	DP	CV %	Extração	Comprimento de onda (nm)
	40,00	5567,20	437,20	7,85		
Acetazolamida	0,18	31,37	2,60	8,30	Ácida	260
	2,5	293,22	17,27	5,89		
Amilorida	1,5	85,39	15,80	18,50	Básica	360
	1,00	92,76	6,03	6,50		
Bumetanida	0,70	44,59	6,59	14,77	Ácida	260
	1,5	111,86	6,90	6,17		
Cloпамida	0,5	42,34	7,42	17,52	Ácida	260
	2,00	73,01	4,06	5,56		
Clortalidona	0,50	17,58	1,80	10,23	Ácida	260
	8,80	143,27	16,35	11,41		
Espironolactona	0,50	25,91	1,79	6,92	Ácida	260
	6,0	816,46	35,31	4,32		
Furosemida	0,25	20,86	2,50	11,98	Ácida	270
	4,0	1147,32	85,55	7,46		
Hidroclorotiazida	0,18	49,79	3,01	6,04	Básica	270

Continuação TABELA 11

Diurético	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Média da área	DP	CV %	Extração	Comprimento de onda (nm)
	2,88	179,49	6,63	3,69		
Piretanida	1,0	40,54	6,30	15,54	Ácida	260
	2,5	378,44	66,79	17,65		
Triantereno	0,18	56,08	5,11	9,12	Básica	360

TABELA 12. Resultados obtidos na avaliação da precisão interensaio, realizada em sextuplicata (de concentrações altas e baixas dos diuréticos) durante três dias alternados.

Diurético	Média das áreas de concentrações maiores e menores obtidas em análises de interensaios			Média \pm DP	CV (%)
	1.º dia	2.º dia	3.º dia		
	6268,96	6636,52	5567,29	6157,59 \pm 543,3	8,82
Acetazolamida	33,99	31,69	31,37	32,35 \pm 1,43	4,42
	317,89	221,63	293,22	277,58 \pm 50,00	18,01
Amilorida	173,29	79,43	85,39	89,37 \pm 12,42	13,90
	94,02	81,72	92,76	89,50 \pm 6,77	7,56
Bumetanida	56,86	50,04	44,59	50,33 \pm 5,89	11,70
	123,36	121,08	111,86	118,88 \pm 6,09	5,11
Clopamida	48,65	48,80	42,34	46,60 \pm 3,69	7,92
	76,69	76,92	73,01	75,54 \pm 2,19	2,90
Clortalidona	20,9	17,4	17,58	18,62 \pm 1,97	10,58

Continuação TABELA 12

Diurético	Média das áreas de concentrações maiores e menores obtidas em análises de interensaios			Média ± DP	CV (%)
	1.º dia	2.º dia	3.º dia		
	880,28	929,35	729,06	846,23±104,40	12,34
Furosemida	28,00	30,24	20,86	26,37±4,90	18,58
	189,77	168,25	143,27	167,10±23,27	13,93
Espironolactona	28,12	26,17	25,91	26,73±1,21	4,53
	1160,80	1147,32	1113,41	1140,51±24,41	2,14
Hidroclorotiazida	61,09	60,88	49,79	52,25±6,46	12,36
	206,69	179,49	196,46	194,21±13,74	7,07
Piretanida	54,26	40,54	42,97	45,92±7,32	15,94
	440,82	564,61	378,44	461,29±94,76	20,00
Triantereno	62,84	55,22	56,08	58,05±4,17	7,18

5.3.4. Especificidade

O método de análise proposto pelo presente trabalho, mostrou-se específico para 4 diuréticos tais como; clortalidona, espironolactona, furosemida e hidroclorotiazida, frente aos fármacos descritos na Tabela 13. Os cromatogramas estão ilustrados nas figuras 18, 19, 20.

TABELA 13. Fármacos que não interferem nas análises cromatográficas de Clortalidona, Espironolactona, Furosemida e Hidroclorotiazida, segundo o método proposto.

Ácido Acetilsalicílico	Amiodarona	Atenolol
Atorvastatina	Captopril	Carbamazepina
Carvedilol	Cinarizina	Cloridrato de mexiletina
Cloridrato de tramadol	Digoxina	Diltiazem
Dipirona	Enalapril	Fluoxetina
Glibenclamida	Glimepirida	Levotiroxina
Losartan	Maleato de rosiglitazona	Mononitrato de isossorbida
Omeprazol	Pentoxifilina	Sulfato de salbutamol
Ranitidina	Sinvastatina	Warfarina
Valsartan	Verapamil	

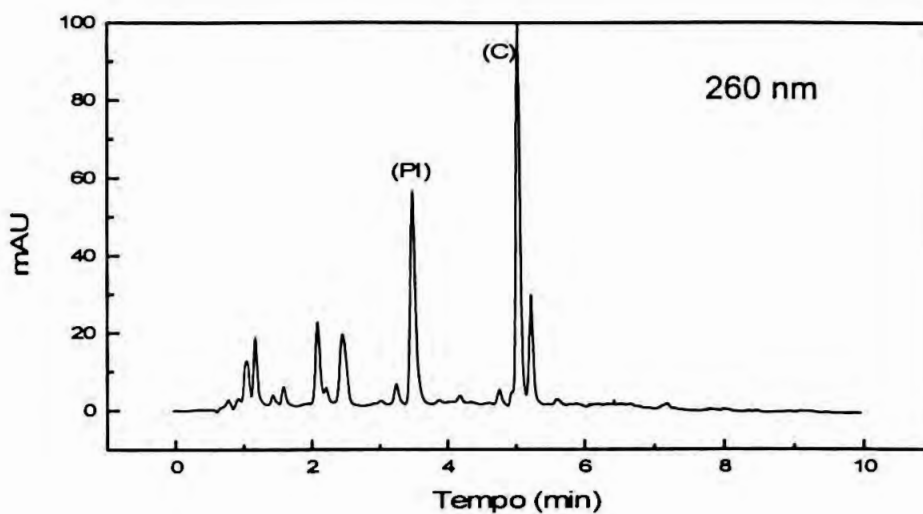


FIGURA 18. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0- 5,5, a 260 nm, referente ao teste de especificidade para clortalidona (C), obtido de amostra de paciente do INCOR, que além do diurético era submetido ao tratamento com captopril, ácido acetil salicílico e mononitrato de isossorbida. (PI) cafeína.

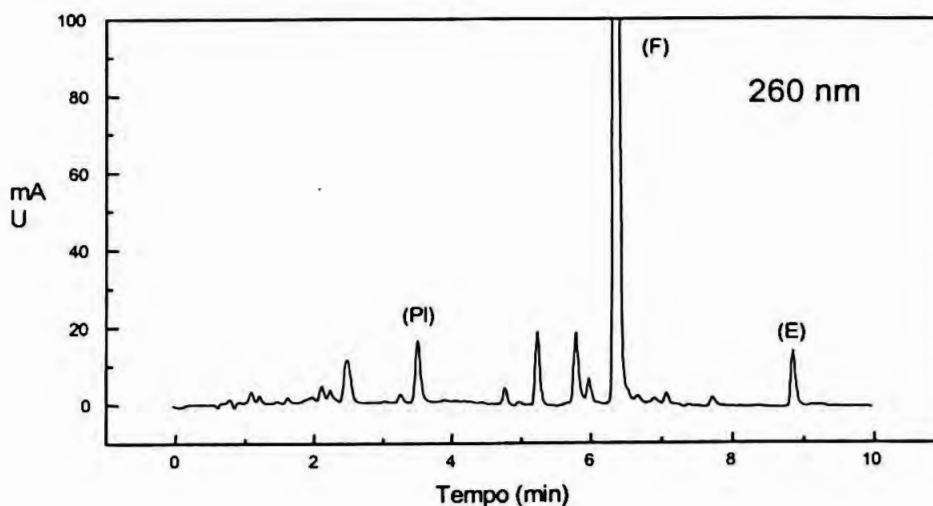


FIGURA 19. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0-5,5, a 260 nm, referente ao teste de especificidade para Espironolactona (E) e furosemida (F) obtido de amostra de paciente do INCOR, que além dos diuréticos era submetido ao tratamento com digoxina e warfarina. (PI) cafeína

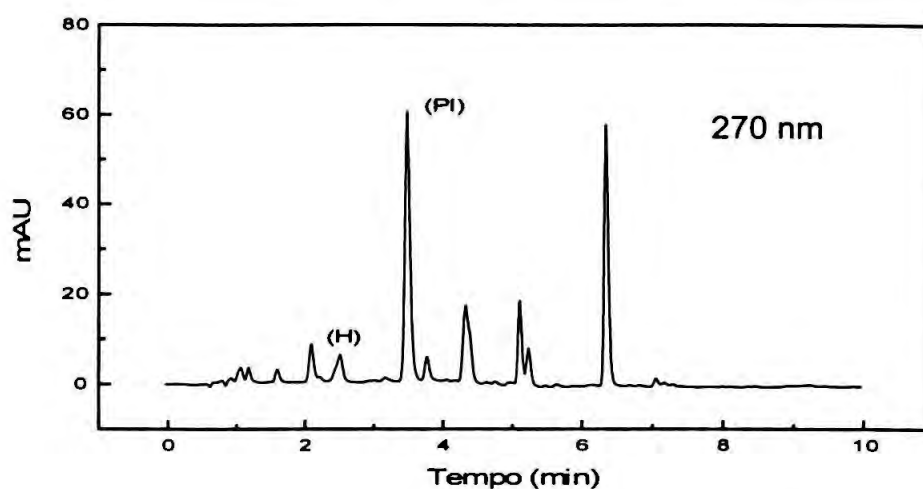


FIGURA 20. Cromatograma de extração básica em pH 9,0-9,5, a 270 nm, referente ao teste de especificidade para Hidroclorotiazida (H) obtido de amostra de paciente do INCOR, que além do diurético era submetido ao tratamento com verapamil, captopril, carbamazepina e ranitidina. (PI) cafeína.

5.3.5. Estabilidade

5.3.5.1. Após 24 h da extração

Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstram a estabilidade dos diuréticos 24 h após a extração.

TABELA 14. Valores médios das áreas imediatamente e após 24 h da extração de amostras referência positiva.

Diurético	Áreas de concentrações altas e baixas obtidas em análises imediatamente e após 24h da extração		Média ± DP	CV (%)
	Após extração	24 h após extração		
Acetazolamida	2052,56	2189,83	2121,20 ± 97,06	4,02
	24,66	27,03	25,85 ± 1,68	6,48
Amilorida	314,47	315,00	314,74 ± 0,37	0,12
	159,71	145,4	152,56 ± 10,12	6,63
Bumetanida	40,50	43,62	42,06 ± 2,21	5,25
	37,41	40,48	38,95 ± 2,17	5,57
Clopamida	99,43	111,01	105,22 ± 8,19	7,78
	38,68	44,72	41,70 ± 4,27	10,24
Clortalidona	64,78	68,80	66,79 ± 2,84	4,26
	15,11	13,71	14,41 ± 0,99	6,87
Furosemida	649,70	694,07	671,89 ± 31,37	4,67
	21,65	22,42	22,04 ± 0,54	2,47
Espironolactona	327,53	331,84	329,69 ± 3,05	0,92
	20,71	21,30	21,01 ± 0,42	1,99
Hidroclorotiazida	922,09	947,43	922,76 ± 34,89	3,78
	37,72	32,45	35,09 ± 23,97	4,04
Piretanida	160,41	169,43	164,92 ± 6,38	3,87
	40,69	34,64	37,67 ± 4,28	11,36
Triantereno	623,31	688,88	623,60 ± 92,33	14,81
	52,55	57,70	55,13 ± 3,64	6,61

5.3.5.2. Após 52 dias de armazenamento

Os resultados apresentados na Tabela 15, demonstra a estabilidade dos diuréticos 52 dias após armazenamento em freezer à -20°C .

TABELA 15. Valores das áreas de amostras analisadas imediatamente a extração de urina referência positiva e de amostras extraídas, após armazenamento de 52 dias em freezer à -20°C .

Diurético	Áreas das concentrações altas e baixas		Média \pm DP	CV (%)
	Imediatamente após a extração	Após 52 dias		
	5587,09	5601,1	5594,1 \pm 9,91	0,18
Acetazolamida	25,79	26,66	26,23 \pm 0,62	2,35
	332,65	329,59	331,12 \pm 2,16	0,65
Amilorida	199,78	179,09	189,44 \pm 14,63	7,72
	78,65	85,39	82,02 \pm 4,77	5,81
Bumetanida	44,54	46,16	45,35 \pm 1,15	2,53
	102,08	122,20	112,14 \pm 14,23	12,69
Clopamida	37,58	49,00	43,29 \pm 8,08	18,67
	105,36	97,76	101,56 \pm 5,37	5,29
Clortalidona	22,67	24,53	23,60 \pm 1,32	5,57
	710,25	917,74	814,00 \pm 146,72	18,02
Furosemida	29,69	25,03	27,36 \pm 3,30	12,04

TABELA 15 (continuação)

Diurético	Áreas das concentrações altas e baixas		Média ± DP	CV (%)
	Imediatamente após a extração	Após 52 dias		
Espironolactona	390,70	406,92	398,81 ± 11,47	2,88
	41,69	34,88	38,29 ± 4,82	12,58
Hidroclorotiazida	1074,65	1056,39	1065,52 ± 12,91	1,21
	37,72	32,45	35,09 ± 23,97	4,04
Piretanida	191,32	193,91	192,62 ± 1,83	0,95
	62,79	51,07	42,94 ± 38,76	5,15
Triantereno	526,82	580,89	553,86 ± 38,23	6,90
	42,27	39,68	40,98 ± 1,83	4,47

5.4. Triagem de diuréticos em amostras de urina de atletas

Das dezesseis amostras de urina submetidas ao método otimizado e validado, cinco apresentaram resultado positivo: quatro amostras dos atletas que revelaram a utilização de diuréticos e uma, entre as que foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Os resultados são apresentados na Tabela 16 e nas Figuras 21, 22 e 23.

TABELA 16. Triagem positiva para alguns diuréticos em CLAE, para atletas e modalidades esportivas correspondentes.

Modalidades esportivas	Diurético	Amostras positivas
	Clortalidona	1
Fisiculturismo	Hidroclorotiazida	1
Jiu-jitsu	Furosemida	1
Judô	Hidroclorotiazida	1
Taekwondo	Hidroclorotiazida	1

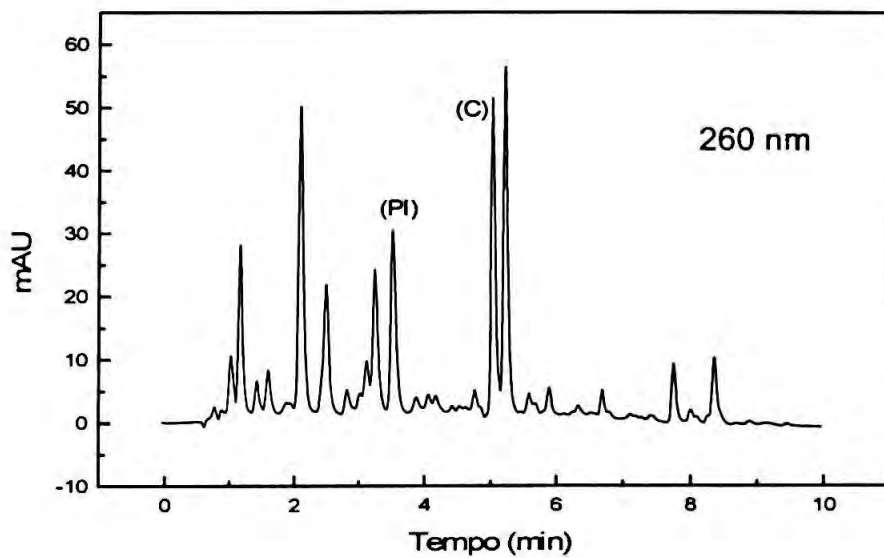


FIGURA 21. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0- 5,5, a 260 nm, referente ao teste de triagem positivo para Clortalidona (C) obtido de amostra de urina de atleta que praticava fisiculturismo. (PI) cafeína.

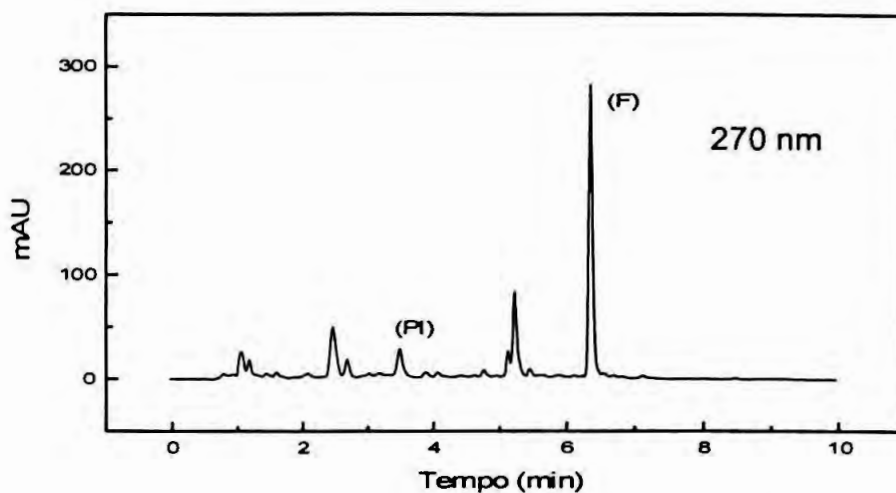


FIGURA 22. Cromatograma de extração ácida em pH 5,0- 5,5, a 270 nm, referente ao teste de triagem positivo para Furosemda (F) obtido de amostra de urina de atleta que praticava Jiu-jitsu. (PI) cafeína.

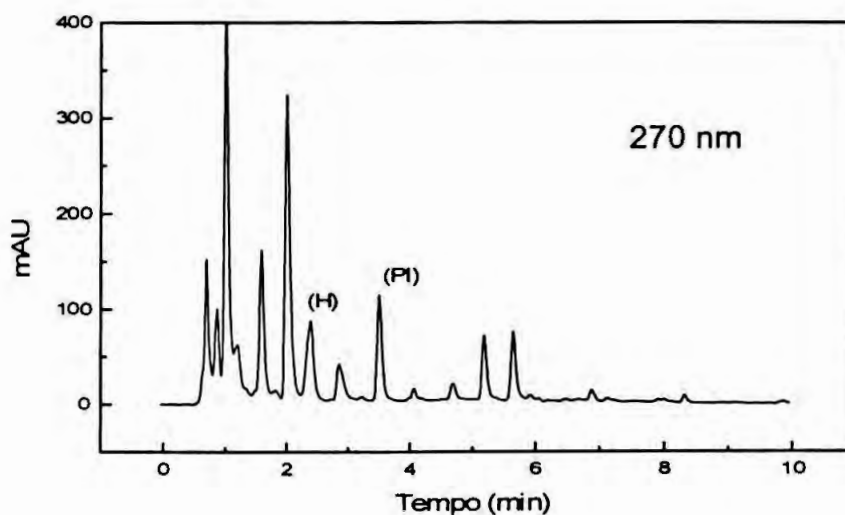


FIGURA 23. Cromatograma de extração básica em pH 9,0-9,5 a 270 nm, referente ao teste de triagem positivo para Hidroclorotiazida (H) obtido de amostra de urina de atleta que praticava Taekwondo. (PI) cafeína.

6. DISCUSSÃO

Visando alcançar os objetivos do trabalho, foi otimizado um método para a extração e detecção de dez diuréticos comercializados no Brasil, em cromatografia de alta eficiência (CLAE), acoplada ao detector de arranjos de diodos (DAD). A utilização desta técnica, cumpre uma das recomendações do Código do Movimento Olímpico Anti-Dopagem (2000), no que diz respeito à análise de triagem de diuréticos, com finalidade de controle da dopagem no esporte.

A escolha do sistema de eluição por gradiente de solventes é a mais adequada, devido às diferentes propriedades físico-químicas, referentes ao comportamento ácido-básico (Tabela 2) e lipossolubilidade dos diuréticos. Este sistema envolve a alteração da polaridade da fase móvel, no decorrer do processo analítico, pela progressiva adição de um modificador orgânico. Com isso, o tempo de análise e a separação de várias substâncias, simultaneamente analisadas, torna-se rápido e eficiente. A escolha da coluna cromatográfica, também é um ponto muito importante para a melhor separação e resolução dos picos cromatográficos. De acordo com a Tabela 3, a coluna mais utilizada, dentre os trabalhos citados, é aquela que contém a fase estacionária de sílica ligada ao grupamento alquílico, octadecil (C_{18}). Este tipo de coluna é denominada de fase reversa, pois a fase estacionária (a sílica) é apolar enquanto que os analitos possuem, geralmente, natureza polar (CIOLA 1998). Deste modo, a coluna cromatográfica de escolha para o presente trabalho analítico, foi a Spherisorb ODS2, com partículas de dimensões de 5 μm .

Geralmente, a análise por cromatografia líquida em fase reversa de diuréticos com caráter ácido, requer fase móvel em pH ácido, com o intuito de aumentar as interações lipofílicas entre os compostos e a fase estacionária apolar. Isto é, em meio ácido, os compostos também com caráter ácido, tendem

a deslocar o equilíbrio da reação de dissociação iônica, para o lado em que não há dissociação, conferindo então, menor polaridade à molécula e maior capacidade de ser retida por mais tempo na fase estacionária de fase reversa. Já os compostos básicos são altamente retidos quando é empregada fase móvel, contendo solução tampão pH 3,00, havendo formação de picos assimétricos no cromatograma. Esta retenção pode ser explicada pelas interações entre o grupo silanol (Si-OH) da fase estacionária, que não contém grupamento octadecil ligado e o grupo amina do analito. Por isso, quando se pretende analisar diuréticos básicos em conjunto aos ácidos, além da necessidade da fase móvel ácida, é necessário um modificador de caráter básico, como a propilamina, trietilamina, ou sais de amônio para minimizar interações dos diuréticos básicos ao grupo silanol. Assim, há a redução do tempo de retenção e a melhora na resolução do pico cromatográfico dos compostos básicos (VENTURA e SEGURA 1996).

Campíns-Falcó e col. (1991) realizaram um estudo comparativo entre as soluções tampões de fosfato e acetato de amônio e concluíram que este último melhora a qualidade de detecção dos diuréticos. Portanto, a fase móvel de escolha, no presente trabalho, consistiu de uma solução tampão de acetato de amônio, 0,05 M, pH 3,00 e acetonitrila, como modificador orgânico. Neste caso, não foi necessário adicionar um modificador básico, pois o sal de acetato de amônio cumpre esta função.

Os trabalhos de Ventura e col. (1993) e de Cooper e col (1989) foram tomados como base para a otimização do método proposto neste trabalho, no sentido de possibilitar a melhor separação dos dez diuréticos selecionados. Para tanto, foram estudadas a eficiência de diferentes sistemas gradientes de eluição da fase móvel, de padrões internos, além da seleção dos comprimentos de onda e o procedimento de extração mais adequados para todos os dez diuréticos.

O sistema gradiente de eluição da fase móvel escolhido conferiu vantagem ao de Ventura e col. (1993), permitiu que o tempo de análise fosse 10 minutos. Este tempo foi considerado ótimo, visto que o trabalho tem como objetivo, detectar dez substâncias, simultaneamente, em um único método, além de atribuir eficiência à separação dos picos cromatográficos. O cromatograma da separação com a descrição do gradiente foi ilustrado na Figura 13.

Para a escolha do padrão interno foram testados quatro compostos: a β -hidroxietilteofilina, a 7- β -hidroxipropilteofilina, a pentoxifilina e a cafeína. Verificou-se que a β -hidroxietilteofilina, empregada no estudo de Cooper e col. (1989), não era adequada, pois coeluiu com o diurético hidroclorotiazida, assim como a pentoxifilina, que apresentava o mesmo tempo de retenção da clortalidona. A 7- β -hidroxipropilteofilina também não pôde ser empregada como padrão interno, pois eluía em um tempo de retenção muito próximo ao da cafeína, que, apesar de não fazer parte das substâncias em investigação, provavelmente estaria presente como interferente urinário. Foram realizadas várias tentativas para reverter todas essas coeluições, por meio de modificações no sistema gradiente, porém não foi obtido nenhum êxito.

Frente aos problemas obtidos na separação dos diuréticos com os padrões internos usualmente empregados, a cafeína foi escolhida, porque, além de não apresentar coeluição com nenhum diurético, é uma substância de caráter neutro, podendo ser extraída em qualquer condição de pH. Embora exista a possibilidade da cafeína ser um interferente urinário natural e como a análise é qualitativa, esta interferência é irrelevante, pois a função do padrão interno nestas circunstâncias, é servir de base na determinação do tempo de retenção relativo.

O detector DAD permite uma análise simultânea de compostos em até cinco comprimentos de onda diferentes. Para aproveitar esta propriedade e avaliar quais seriam os comprimentos de onda mais adequados para a detecção simultânea dos dez diuréticos selecionados e da cafeína, foram obtidos espectros de varredura de absorção no UV-visível (200-400 nm) para cada fármaco em questão, conforme ilustra a Figura 12. Desta maneira, verificou-se que o principal comprimento de onda a ser escolhido foi o de 270 nm, uma vez que a maioria dos diuréticos testados, segundo Campíns-Falcó e col. (1993) e Tsai e col. (1991), apresenta melhor absorbância na região inferior do espectro, além de compostos urinários endógenos e a fase móvel empregada absorverem em valores menores de 275 e 250 nm, respectivamente. Os outros valores escolhidos foram os de 260 nm e 360 nm, para os diuréticos que não foram tão bem detectados em 270 nm.

A técnica de extração empregada foi a líquido-líquido por ser a mais utilizada (Tabela 2) e também por apresentar um custo menor que a utilização de colunas de extração em fase sólida.

Para o processo extrativo é necessário a remoção de interferentes na matriz urinária, o que pode ser feito com solventes aceptores de prótons como acetato de etila, éter dietílico ou metil isobutil cetona (TSAI e col. 1991). Segundo Ventura e col. (1993), a extração com acetato de etila proporcionou melhor recuperação dos diuréticos alcalinos quando comparada com a extração com éter dietílico, devido à maior polaridade do primeiro solvente. Por estes motivos, o solvente de extração de eleição foi o acetato de etila, além do fato dele não ser inflamável (MERCK 1996)

Para a escolha do processo extrativo, estudou-se quatro sistemas diferentes. O primeiro deles foi baseado na técnica de Ventura e col. (1993), que foi empregada para o controle da dopagem de diuréticos durante as Olimpíadas de Barcelona, em 1992. A técnica consiste da alcalinização da urina

com cloreto de amônio em pH 9,5 e adição de cloreto de sódio para o efeito "salting-out". Esta metodologia foi descartada devido à grande quantidade de interferentes urinários extraídos, além da utilização de grandes volumes de amostra (5mL) e de solvente extrator (7 mL).

Com a finalidade de diminuir os interferentes urinários, foram encontradas, na literatura, duas outras alternativas de procedimentos de extração, às quais aplicam uma fase de lavagem da fase orgânica com solução de tampão fosfato: a técnica de Fullinfaw e col. (1987) e a proposta por Gucheelar e col (1999).

A técnica de Fullinfaw e col. (1987) consiste na acidificação da amostra com NaH_2PO_4 1 M em pH 4,1, extração com acetato de etila e a utilização do tampão NaH_2PO_4 , 0,1 M, pH 7,5, para a fase de lavagem. Apesar da pouca quantidade de interferentes urinários, esta técnica também foi descartada porque a extração não foi eficiente para diuréticos básicos: a amilorida não foi extraída e a recuperação do triantereno foi apenas 7%. As recuperações obtidas para os diuréticos ácidos foram satisfatórias: clortalidona (87,91%), clopamida (72,69%), bumetanida (81,53%) e hidroclorotiazidas (100%).

Com relação à técnica proposta por Guchelaar e col. (1999), a urina é acidificada com tampão NaH_2PO_4 1 M, pH 5 e o tampão fosfato 0,1 M, pH 6, para a fase de lavagem. Analogamente à técnica de Fullinfaw e col. (1993) os resultados das recuperações foram eficientes também para os diuréticos ácidos, mas não para os básicos: triantereno e amilorida não foram extraídos. Além do mais, o cromatograma da extração da urina referência negativa apresentou um interferente com o tempo de retenção próximo ao da hidroclorotiazida. Na tentativa de extrair os diuréticos básicos, foi feita uma modificação deste método, alcalinizando a urina com tampão fosfato em pH 9,

sem a etapa de lavagem. No entanto, novamente não houve recuperação de nenhum destes fármacos.

Como a presente pesquisa propõe um método para triagem de dez diuréticos, que possuem caráter ácido-básico variável, é importante que o processo de extração possa abranger todos eles. A metodologia de extração de Cooper e col. (1989) mostrou ser a melhor opção, por utilizar duas etapas de extração em condições de pH diferentes, ou seja, em pH ácido e em pH alcalino. Consiste de uma extração ácida com tampão sólido de KH_2PO_4 e de Na_2HPO_4 (99:1 p/p), pH 5,0-5,5. Com o objetivo de remover os interferentes urinários, o processo de lavagem é realizado com solução de acetato de chumbo a 5%. A extração básica é realizada com tampão sólido de NaHCO_3 e de KCO_3 pH 9,0-9,5. Assim, o processo extrativo baseado no método de Cooper foi escolhido e otimizado com uma pequena alteração. Ao final dos dois procedimentos de extração, os autores misturaram os dois resíduos, ácidos e básicos e em seguida prosseguiram com a análise cromatográfica. No presente trabalho, esta mistura não foi realizada, pois este procedimento iria prejudicar a análise de hidroclorotiazida, devido ao interferente presente na extração ácida e além disso, os diuréticos acetazolamida e amilorida sofreriam uma diluição, visto que o primeiro não é extraído em extração alcalina, enquanto que o segundo não é extraído em condições ácidas.

Como esperado, os diuréticos ácidos, como a acetazolamida, a clopamida e a clortalidona, foram bem recuperadas na extração ácida (Tabela 10). Ao contrário do observado por outros autores (FULLINFAW e col. 1987 e GUCHELLAR e col 1999) o triantereno teve uma melhor recuperação (70%) e a amilorida pôde ser extraído, com recuperação de 50%. Um dado interessante que foi observado é a impossibilidade de recuperação da amilorida, na extração ácida, porque além do pH, a fase de lavagem, ausente na extração básica,

retira este diurético do extrato orgânico, por ser uma substância muito hidrossolúvel.

Os picos referentes aos interferentes urinários presentes extraídos neste sistema extrativo, não prejudicaram a análise dos diuréticos, apesar de haver um interferente com o mesmo TR da hidroclorotiazida na extração ácida (Figura 14). Este diurético, porém, pôde ser analisado em cromatogramas de extração básica, em que o interferente não estava presente (Figuras 15 e 17).

Uma vez otimizado o método, na etapa seguinte foi realizada a validação, utilizando-se os seguintes parâmetros: limite de detecção, precisão, especificidade e estabilidade.

Observando-se a Tabela 9, verifica-se o método de extração otimizado proporcionou valores baixos de limite de detecção (LD) quando comparados aos apresentados por Guchelaar e col. (1999) relatados no item 2.7.1.1.1., principalmente para os diuréticos clopamida, clortalidona e espironolactona. Comparando, os valores de LD deste com aqueles obtidos por Cooper e col. (1989), descritos no item 2.7.1.1.1., verificou-se que os valores do presente método foram menores, ainda que os métodos de extração sejam similares, demonstrando assim, que os procedimentos de extração realizados neste trabalho foram mais eficientes. No entanto, o método de extração proposto por Ventura e col. (1993), relatados no item 2.7.1.1.1., permitiu a obtenção de valores menores de LD que os apresentados por este trabalho.

O critério estabelecido para a escolha da concentração baixa, foi assegurar resultados precisos nesta faixa de concentração. Já no caso da concentração alta, considerou-se o fato, de que os atletas costumam auto-administrarem diuréticos. Sendo assim, a concentração urinária estabelecida, foi duas vezes o valor daquela eliminada após 24 h, pois, geralmente, os atletas auto-administram mais de um comprimido. Importante notar que as

apresentações farmacêuticas que foram baseadas na literatura, são as mesmas que as comercializadas no Brasil (Tabela 1).

O método possui boa precisão intra e interensaio, tanto para concentrações menores e maiores dos diuréticos, os quais, apresentaram valores de coeficientes de variação menores que 20% (Tabela 11 e 12).

A especificidade do método é um parâmetro que proporciona confiabilidade nos resultados de detecção dos diuréticos na presença de outras substâncias. Segundo Chasin e col. (1998), a especificidade é muitas vezes sinônimo de seletividade uma vez que ambos mostram a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz.

Para a avaliação da especificidade do método, frente a outros fármacos, que podem estar presentes, foram coletadas amostras de urina de pacientes de ambulatório e internados do Instituto do Coração (INCOR), que apresentavam problemas cardiovasculares. Estas pessoas foram escolhidas porque, além de diuréticos, geralmente, também são tratadas com outros tipos de fármacos.

Cada voluntário recebeu informações sobre a coleta e o tipo de trabalho que iria ser feito, assinou um termo de consentimento e respondeu a um questionário (Anexo I e II), que continha informações sobre o paciente, principalmente em relação aos medicamentos que estavam sendo administrados, bem como o horário da ingestão do medicamento.

Por meio dos valores de tempo de retenção relativo (TRR), do espectro característico (UV-visível) destes fármacos e dos questionários de cada voluntário, foi possível avaliar a especificidade deste método para quatro diuréticos: clortalidona, espironolactona, furosemida e hidroclorotiazida (Figuras 18, 19 e 20). A Tabela 13 mostrou a relação de fármacos que não interferem na análise cromatográfica destes quatro diuréticos. Entre os fármacos presentes

nesta tabela temos: antihipertensivos, antiglicêmicos, analgésicos, analgésicos narcóticos, antiarrítmicos, antiepiléticos, broncodilatadores, hipolipemiantes, antianginosos, anticoagulantes. Fullinfaw e col. (1987) realizaram um estudo semelhante a este para os diuréticos furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona, entre outros. As classes de fármacos que não interferiram na análise eram similares às classes de fármacos apresentados neste estudo, apesar do procedimento de análise proposta por estes autores, como demonstra a Tabela 3, ser diferente dos procedimentos otimizados neste estudo.

Os testes para a verificação da estabilidade dos padrões de diuréticos na matriz urinária, foram realizados com o intuito de avaliar o comportamento dos analitos em situações de rotina laboratorial, como as etapas do processo analítico e condições de armazenamento, que poderiam interferir na confiabilidade dos resultados.

Os diuréticos são estáveis após 24 h da extração e permanência na bandeja de injeção do aparelho de CLAE, à temperatura entre 24 a 22,5° C (Tabela 14). Esta temperatura é adequada para o bom funcionamento do cromatógrafo e demonstrou ser suficiente para a conservação das amostras nesse período de tempo. A análise da estabilidade nesse tipo de processo analítico é necessária, pois a bandeja onde se deposita os frascos que contém as amostras a serem injetadas e posteriormente analisadas pelo CLAE, comporta cem frascos. Supondo-se que a bandeja esteja completa e considerando que o tempo de análise proposta pelo presente estudo é de dez minutos, com dois minutos de intervalo entre uma análise e outra, o último frasco irá ser analisado após 19,8 h. Além disso, se o processo for interrompido por algumas horas, as amostras não serão perdidas.

O estudo de estabilidade de armazenamento em freezer à -20 °C, mostrou que amostras de urina, contendo qualquer um dos dez diuréticos

estudados, podem ser estáveis por até, praticamente, dois meses (Tabela 15). Este período de estabilidade está além do que a rotina de um laboratório de controle de dopagem necessita. Normalmente, as amostras de urina, para este tipo de análise, são coletadas em dois frascos: uma denominada prova e a outra, contra-prova. A amostra referente à prova, quando chega ao laboratório é imediatamente analisada, enquanto que a contra-prova é mantida em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta última pode permanecer armazenada num período um pouco maior que quinze dias, tempo este indicado para emissão dos resultados, caso haja resultado positivo da amostra de prova e necessidade de nova análise.

Uma vez otimizado e validado, o método foi aplicado para análise de triagem de diuréticos, em amostras de atletas, com a finalidade de controle da dopagem, cumprindo então a finalidade primordial do presente estudo.

Da mesma forma que os voluntários do INCOR, os quatro atletas voluntários, entre eles, fisiculturistas, lutadores de jiu-jitsu e taekowdo, também assinaram um termo de consentimento e um questionário que continha informações sobre a modalidade esportiva que praticavam e sobre os medicamentos, que estavam administrando, além do diurético. Um outro grupo de amostras, foi fornecido pelo Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As análises cromatográficas das quatro amostras dos atletas voluntários, indicaram resultados de triagem positivas para os diuréticos furosemida, hidroclorotiazida (Figuras 22 e 23). Estes resultados estavam de acordo com o questionário respondido por estes atletas, os quais indicaram o uso destes diuréticos. Das doze amostras fornecidas pelo LAT, apenas em uma amostra foi constatado um resultado de triagem positiva, que foi para o diurético clortalidona (Figura 21). A análise do cromatograma foi realizada através dos

valores de TRR e através da varredura do espectro de cada diurético presente no cromatograma.

A principal dificuldade no presente trabalho, foi justamente a obtenção de uma quantidade significativa de amostras de urina de atletas, devido ao receio, por parte destes últimos, que esta análise pudesse prejudicá-los.

Um aspecto importante, ao longo deste estudo, foi a coleta de informações pessoais e observações de situações que envolviam competições e atletas, principalmente, no que diz respeito ao padrão de uso dos diuréticos dentro deste universo. A informação mais relevante foi que, geralmente, esse grupo de fármacos são utilizados um ou dois dias antes das competições.

Segundo a informação de um fisiculturista, os atletas que praticam esportes com categorias de peso, auto-administram, no mínimo, cinco comprimidos no penúltimo dia antes da competição. A posologia neste caso, é de um comprimido a cada duas horas. Os atletas que fazem restrição de água, auto-administram dois a três comprimidos (um a cada hora), durante as 12 h que antecede a competição. Um outro atleta relatou, que tomara 15 comprimidos do diurético hidroclorotiazida em menos de 24 h até o momento da pesagem que antecedia uma competição de jiu-jitsu. Outros ainda, bebem água destilada, pois esta não contém sais que poderiam promover retenção de água.

Estes relatos demonstram que, na verdade, não existe um padrão de uso de diuréticos regular entre os atletas e que administração é feita em qualquer dosagem, sem noção dos perigos que o excesso desses fármacos podem causar a sua saúde.

Em um dia de pesagem, que antecedia uma competição de jiu-jitsu, foi observado que os atletas, também utilizavam outros recursos para perda de

peso além de diuréticos, entre eles o uso de laxantes e bebidas alcoólicas, como a cerveja.

Diante destes fatos, é importante ressaltar a importância do toxicologista frente a esta situação, seja junto aos atletas e treinadores, para promover programas informativos do perigo do uso de fármacos no esporte, seja no laboratório, pesquisando métodos eficazes de detecção das substâncias que podem prejudicar a saúde e o desempenho do atleta durante uma competição.

A aplicação de uma boa técnica de triagem é um dos fatores que colaboram para que a análise de controle de dopagem seja bem sucedida. Assim, o método otimizado e validado, em CLAE acoplado ao detector de DAD, apresentado neste estudo, provou ser uma técnica adequada na detecção de diuréticos em urina, com o objetivo de controlar a dopagem desta classe de fármacos nos esportes.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Nas condições cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de rede de diodos permite a separação e detecção dos seguintes diuréticos: acetazolamida, amilorida, bumetanida, clopamida, clortalidona, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida, triantereno.
- O procedimento de extração escolhido é adequado por não extrair compostos urinários naturais que poderiam interferir nos resultados das análises.
- O procedimento de extração otimizado é eficaz na recuperação dos dez diuréticos selecionados, levando em consideração diferentes propriedades físico-químicas desta classe de substâncias.
- Os diuréticos são estáveis após 24 h de extração na faixa de temperatura ambiente de 22,5 e 24°C e após 52 dias de armazenamento, das amostras de urina, à -20°C.
- O método validado é preciso e permite a detecção de baixas concentrações de todos os dez diuréticos selecionados e apresenta especificidade para a clortalidona, furosemida, espironolactona e hidroclorotiazida.
- A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de rede de diodos é adequada para a análise de triagem destes dez diuréticos em urina, com finalidade de controle de dopagem no esporte.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID, M.E. High-performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of furosemide in plasma and its use in pharmacokinetic studies. // *Farmaco*, Lausanne, v.55, p.448-454, 2000.
- ARDREY, R.E. Mass Spectrometry. In: MOFFAT, A.C. *Clarck's isolation and identification of drugs*. 2. Ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986, parte 1, p. 251-263.
- ARMSTRONG, L.A., COSTILL, D.L., FINK, W.J. Influence of diuretic-induced dehydration on competitive running performance. *Med. Sci. Sport. Exer.*, Philadelphia, v.17, n.4 p.456-461, 1985.
- BEERMAN, B., HELLSTRÖM, M.D., LINDSTRÖM, B., ROSÉN, A.. Binding-site interaction of chlortalidone and acetazolamide, two drugs transported by red blood cells. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.17, n.4, p.425-432, 1974.
- BEERMAN, B., GROSCHINSKY-GRIND, M., ROSÉN, A. Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.19, p.531-537, 1976.
- BENZI, G. Pharmacoepidemiology of the drugs used in sports as doping agents. *Pharmacol. Res.*, London, n.1, v.29, p.13-26, 1994.
- BI, H., COOPER, S.F., CÔTÉ, M.G. Determination and identification of amiloride in human urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* Amsterdam, v.582, p.93-101, 1992.

- BIAM. Banque de Donnés Automatisée sur les Médicaments. *Clopamide*. Disponível em: <http://www.biam2.org/www/Sub2331.html>. Acesso em: 15 de maio de 2001.
- BOREHAM, D.R., CHESEMAN, K., PALMER, R.F., SLATER, T.F., VOSE, C.W. Metabolism of canrenona in vitro: evidence for the formation of a glutathione conjugate in normal subjects. *Br. J. Pharmacol.*, v. 73, p. 181, 1981. Apud: *Diuretics*. 1. ed., Heidberg: Press Academy, 1995, cap.7, p.221-274.
- BRATER, D.C. Diuretic pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: SELDIN, D., GERHARD, G. *Diuretics Agents Clinical physiology and pharmacology*. 1. ed. San Diego: Academy Press, 1997, cap.4, p.189-208.
- BRATER, D.C. Pharmacology of diuretics. *Am. J. Med. Sci.*, Philadelphia, v.319, n. 1, p.38-50, 2000.
- CADWELL, J.E. Diuretic therapy and exercise performance. *Sports Med.*, Auckland, v.4, p.290-304, 1987.
- CAMPÍNS-FALCÓ, P., HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R., SEVILLANO-CABEZA, A. Improved detection limits for screening of diuretics by coupled liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry. *J. Chromatogr.* Amsterdam, v.612, p.245-251, 1993.
- CAMPÍNS-FALCÓ, P., HERRÁEZ-HERNANDEZ, R., SEVILLANO-CABEZA, A. Column-Switching techniques for screening of diuretics and probenecid in urine samples. *Anal. Chem.*, Washington, v.66, p.244-248, 1994.
- CARRERAS, D., IMAZ, C., NAVAJAS, R., GARCIA, M.A., RODRIGUEZ, C., RODRIGUEZ, A.F. Comparison of derivatization procedures for the
-

- determination of diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr*, Amsterdam v. 683, p.195-202, 1994.
- CHAN, S.C., TOROKBOYH, G.A., BILLAY, D.M., PRZYBYLSKIPS, P.S., GRADEEN, C.Y. Drug analysis at the 1988 Olympic winter games in Calgary. *Clin. Chem.*, Washington, v.37, n.7, p.1289-1296, 1991.
- CHASIN, A.A.M., NASCIMENTO, E., RIBEIRO-NETO, L.M., SIQUEIRA, M.E.P.B., ANDRAUS, M.H., SALVADORI, M.C., FERNÍCOLA, N.A.G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.* São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.
- CIOLA, R. A execução experimental da HPLC. In: _____ . *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho*. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 1998, cap. 2, p. 8-27.
- CLAREMONT A.D., COSTILL, D.L., FINK, W., VAN HANDEL, P.. Heat tolerance following diuretic induced dehydration. *Med. Sci. Sports*, Madison, n.4, v.8, 239-243, 1976.
- COOPER, F.S., MASSÉ, R., DUGAL, R. Comprehensive screening procedure for diuretics in urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.489, p.65-88, 1989.
- DE CROO, F., VAN DEN BOSSCHE, W., DE MOERLOOSE, P. High-performance liquid chromatographic behavior of some pharmaceutically important thiazide, loop and potassium. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.325, p.395-411, 1985.
-

DEF1999/2000:dicionário de especialidades farmacêuticas, 29 ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2000.

DOMINGO, E.B., HERNÁNDEZ, M.J.M., RAMOS, G.R., GARCÍA, M.C. High-performance liquid chromatographic determination of diuretics in urine by micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.582, p.189-194, 1992.

EHRHART, J.D. Negative-ion mass spectra of methylated diuretics. *Rapid. Commun. Mass. Sp.*, W Sussex, v.6, p.349-351, 1992.

EICHNER, E.R. Ergolytic drugs in medicine and sports. *The American Journal of Medicine*, New York, v.94, p.205-211, 1993.

FAGERLUNG, C., HARTVIG, P., LINDSTRÖM, B. Extrative alkylation of sulphonamide diuretics and their determination by electron-capture gas chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.168, p.107-116, 1979.

FORREST, G., McINNIS, G.T. Simple high-performance liquid chromatographic method for the measurement of amiloride in body fluids. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 428, p.123-130, 1988.

FRENKL, R., JÁKÓ, P. The medical aspects of doping. *Ther. Hung.*, Budapest, v.39, n.1, p.3-10, 1991.

FRIEDMAN, P.A., HEBERT, S.C. Site and mechanism of diuretic action. In: SELDIN, D., GIEBISCH G. *Diuretic agents. Clinical physiology and pharmacology*. 1. ed. San Diego. Academy Press, 1997. cap.3, p.75-111.

- FULLINFAW, R.O., BURY, R.W., MOULDS, R.F.W. Liquid chromatographic screening of diuretics in urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.415, p.347-56, 1987.
- GONZÁLEZ, E., BECERRA, A., LASENA, J.J. Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone eletrophoresis using fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.687, p.145-150, 1996.
- GORDEN, P., SHERMAN, B.M., SIMOPOULOS, A.P. Glucose intolerance with hypokalemia: na increased proportion of circulating proinsulin-like component. *J. Clin. Endocr. Metab.*, Bethesda, v.34, p.235-240, 1972.
- GRADEEN, C.Y., BILLAY, D.M., CHAN, S.C. Analysis of bumetanide in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography/ mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.14, p.123-126, 1990.
- GUCHELAAR, H.J., CHANDI, L., SCHOUTEN, O, A high performance liquid chromatographic method for the screening of 17 diuretics in human urine. *Fresen. J. Anal. Chem.*, New York, v.363, p.700-5, 1999.
- GUYTON, A.C. A função renal e a excreção de urina. In: _____ *Fisiologia Humana*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, cap.7, p.269-312.
- HACKETT, P.H., SCHOENE, R.B., WINSLOW, R.M., PETERS, JR, R.M., WEST, J.B. Acetazoalmide and exercise in sojourners to 6300 meters- preliminary study. *Med. Sci. Sport. Exer.*, Philadelphia, v.17, n.5 p.593-597, 1985.
-

- HALLADAY, S.C., SIPES, I.G., CARTER, D.E. Diuretic effect and metabolism of bumetanide in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.22, p. 179-187, 1978.
- IOC. International Olympic Committee, Medical Commission: Disponível em: http://www.usantidoping.org/files/2000_IOCprohibited_sub.pdf. Acesso 29 de novembro de 2001.
- IOC. International Olympic Committee, Medical Commission. Olympic Movement Anti-Doping Code. Lausanne, 2001, p. 15-18, 44.
- JACKSON, E.K. Diuretics. In: GOODMAN, A.G., RUDDON, R.W., MOLINOFF, P.B., LIMBIRG, L.E., HARDMAN, J.G. eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed, New York: Mc Gram Hill, 1996. cap.29, p.685-731.
- JUPPANEN, J, SIRÉN, H., RIEKKOLA, M.L. Screening for diuretics in urine and blood serum by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.652, p.441-450, 1993.
- KAISSILING, B., DØRUP, J. Functional anatomy of the kidney. In: GREGER, R.F., KNAUF, H., MUTSCHLER, E. *Diuretics* . 1. ed, Heidelberg: Academy Press, 1995, cap.1, p.1-66.
- KARIM, A., HRIBAR, J., DOHERTY, M., AKSAMIT, W, CHAPEPLOW, D., BROWN, E., MARKOS, C., CHINN, L.J., LIANG, D., ZAGARELLA, J. Spironolactone: diversity in metabolic pathways. *Xenobiotica*, v.7, p.585-600, 1977. Apud: *Diuretics* . 1. ed, Heidelberg: Academy Press, 1995, cap.1, p.1-66.

- KOROKOLVAS, A. *Diuréticos*. In:_____. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996, cap.14, p.14.1-14,5.
- LANG, H.J., HROPOT, M., Discovery and development of diuretic agents. In: GREGER, R.F., KNAUF, H., MUTSCHLER, E. *Diuretics* . 1. ed, Heidelberg: Academy Press, 1995, cap.4, p 141-172.
- LANG, F., BUSCH, A. Discovery and development of diuretic agents. In: GREGER, R.F., KNAUF, H., MUTSCHLER, E. *Diuretics* .1. ed. Heidberg: Academy Press, 1995, cap.4, p.141-172.
- LI, Y.N.B., MOORE, D.E., TATTAM, B.N. Photodegradation of amiloride in aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.183, p.109-116, 1999.
- LIN, E.T., SMITH, D.S., BENET, L.Z., HOENER, B.A. High-performance liquid chromatographic assays for furosemide in plasma and urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.163, p.315-321, 1979.
- LISI, A.M., TROUT, G.J., KAZLAUSKAS, R. Screening for diuretics in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with derivatisation by direct alkylation. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.563, p.257-270, 1991.
- LISI, A.M., KAZLAUSKAS, R., TROUT, G.J. Diuretic screening in human urine by gas chromatography-mass spectrometry: use of a macroreticular acrylic copolymer for the efficient removal of the coextracted phase-transfer reagent after derivatization by direct extractive alkylation. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.581, p. 57-63, 1992.
-

- MARQUEZ-JULIO, A., WHITESIDE, C. Diuréticos. In: KALANT, H. *Princípios de farmacologia médica*. 5. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap. 40, p.329-338.
- MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996, p.48, 425, 1508, 2251, 2455, 4329, 4819, 7647, 8917, 9730.
- MEYER, B.H., MÜLLER, F.O., DRAGOSA, E.E. Pharmacodynamics and urine pharmacokinetics of three doses of piretanide. *Eur.J. Clin. Pharmacol.* , v.25, p.783-785, 1983. Apud: *Diuretics* . 1. ed. Heidberg: Academy Press, cap.5, 1995, p.173-200.
- MÖHRKE, W., ULLRICH, F.. Metabolism of diuretics In: GREGER, R.F., KNAUF, H., MUTSCHLER, E. *Diuretics* .1. ed. Heidberg: Academy Press, cap.5, 1995, p.173-200.
- MOFFAT, A.C. Analytical and toxicological data. In:_____. *Clark's isolation and identification of drugs*. 2 ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986, p. 313, 339, 464, 483, 634, 663.
- MORAES, T.T.B.P.P. A piretanida no tratamento da hipertensão arterial. *Rev. Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.50, n.11, np., 1993.
- MOTTRAM, D.R. Banned drugs in sports. *Sports Med.*, Auckland, v17, n.1, 1-10, 1999.
-

- OLMOS, V., COHEN, A., LEPORI, E.C.V., LÓPEX, C.M., ROSES, O.E. Aislamiento e identificación de diuréticos en orina por cromatografía en capa delgada. *Acta Toxicol.Argent.* Buenos Aires, v.8, n.1, p.13-15, 2000.
- OPPERMAN, J.A., PIPER, C., GARDINER, P. Spironolactone and potassium canrenoate. Despite chemical similarities, differing metabolism accounts for different toxicological findings in animals. In: Mutchler E (ed) *Therapie mit Aldosteronantagonisten*. Urban and Schwarzenberg, Munich, p.3, 1988. Apud: *Diuretics* . 1. ed. Heidelberg: Academy Press, cap.5, 1995, p.173-200.
- PARK, S.J., PYO, H.S., KIM, Y.J., KIM, M.S., PARK, J. Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.14, p.84-90, 1990.
- RANG, H.P., DALE, M.M. O rim. In: _____ .*Farmacologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, cap 18, p.259-272.
- REUTER, C. Untersuchungen zur Entstehung der lakton- und Säureform des Hauptmetabolites des Mefrusid. *Drug Res.*, v.23, p. 255-262, 1984. Apud: *Diuretics* . 1. ed. Heidelberg: Academy Press, cap.5, 1995, p.173-200.
- RIEKKOLA, M.I., JUMPPANEN, J.H. Capillary eletrophoresis of diuretics. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.735, p.51-164,1996.
- ROSADO-MARIA, A., LOPEZ-GASCO, A.I., SANTOS-MONTES, A., IZQUIERDO-HORMILLOS, R. High-performance liquid chromatographic separation of a complex mixture of diuretics using a micellar mobile phase of sodium dodecyl sulphate Aplication to human urine samples. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.748, p.415-424, 2000.

- SAUGY, M., MEUWLY, P., MUNAFO, A., RIVIER, L. Rapid high-performance liquid chromatographic determination with fluorescence detection of furosemide in human body fluids and its confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr*, Amsterdam, v.564, p.567-578, 1991.
- SEGURA, J. Doping Control in sports medicine. *Ther. Drug Monit.* Philadelphia, v.18, p.471-476, 1996.
- SILVA, O.A. Diuréticos. In: _____. *Dopagem no esporte: guia de fármacos controlados*. São Paulo: Atheneu, 1999, cap.7, p.89.
- SMITH, R.S., MURILLA, G.A., HURDLEY, T.G., GILL, R., MOFFAT, A.C. Retention reproducibility of thiazide diuretics and related drugs in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.384, p.259-278, 1987.
- STURMI, J. E., RUTECKI, G. W. When competitive bodybuilders collapse: a result of Hyperkalemia. *Physician Sportmed.*, Minneapolis, v.23, n.11, p.49-53, 1995.
- TISDALL, P.A., MOYER, T.P., ANHALT, J.P. Liquid-chromatographic detection of thiazide diuretics in urine. *Clin. Chem.*, Washington, v. 26, p.702-706, 1980.
- TSAI, F.Y., LUI, L., CHANG, B. Analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC-MSD confirmation. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, Oxford, v.9, p.1069-1076, 1991.

- VAN DER MEER, M.J., BROWN, L.W. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.423, p.351-357, 1987.
- VENTURA, R., FRAISSE, D., BECCHI, M., PAISSE, O., SEGURA, J. Approach to the analysis of diuretics and masking agents by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry in doping control. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.562, p.723-736, 1991.
- VENTURA, R., NADAL, T., ALCALDE, P., PASCUAL, J.A., SEGURA, J. Fast screening method for diuretics, probenecid and other compounds of doping interest. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.655, p.233-42, 1993.
- VENTURA, R., SEGURA, J. Detection of diuretics agents in doping control. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.687, p.127-144, 1996.
- VERROKEN, M. Drug use and abuse in sport. *Best Pract. Res. Cl. En.*, London, v.14, n.1, p.1-23, 2000.
- VIDT, D.G. Diuretics use and misuse. *Post. Med.*, Minneapolis, v.59, n.5, p.143-150, 1976.
- WAGNER, J.C. Enhancement of athletic performance with drugs. *Sports Med.*, Auckland, v.12, n.4, p.250-265, 1991.
- YAKATAN, G.J., MANESS, D.D., SCHOLLER, J., NOVICK, W.J., DOLUSIO, T. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of furosemide in dogs and monkeys. *J. Pharm. Sci.*, v, 65, p. 1456-1560, 1976. Apud: *Diuretics* . 1. ed. Heidberg: Academy Press, cap.5, 1995, p.173-200.
-

YOON, C. N., LEE, T. H., PARK, J. Mass spectrometry of methyl and methyl-d₃ derivatives of diuretic agents. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.14, p.96-101, 1990.

**ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS
INFORMAÇÃO**



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome:

.....

Documento de Identidade Nº:..... Sexo: () M () F

Data de nascimento:/...../.....

Endereço:.....Nº

:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

II- DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: "Triagem por cromatografia líquida em alta eficiência, para análise de diuréticos comercializados no Brasil, visando o controle da dopagem"

2. Pesquisadora: Vanessa Moreira

Cargo/Função: Farmacêutica-Bioquímica

Inscrição Conselho Regional Nº: 27.056

Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco ()

Risco Mínimo (X)

Risco Médio ()

Risco Baixo ()

Risco Maior ()

4. Duração da Pesquisa: de curta duração, pois só haverá uma única coleta de urina.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA

A coleta de urina não apresenta nenhum desconforto, por ser realizada pelo próprio voluntário e por consistir de uma única coleta em frascos plásticos, oferecidos pela pesquisadora responsável ou pelo médico. A amostra de urina será submetida a uma técnica chamada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual analisará a presença de diuréticos. Os resultados obtidos serão relacionados com as respostas do questionário, previamente respondidas pelo voluntário, na qual indicará, principalmente, o uso de diuréticos ou outros medicamentos.

A finalidade desta pesquisa é a implantação de uma técnica para análise de diuréticos, em laboratórios que fazem análise desta substância para controlar o seu uso nos esportes.

IV - ESCLARECIMENTO DADO PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, inclusive para elucidar eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

V-INFORMAÇÕES REFERENTES AO RESPONSÁVEL PELA PESQUISA

Pesquisadora: Vanessa Moreira

Endereço: Rua José Alves Cunha Lima, 159; apto. 103 bloco 03
Rio Pequeno - São Paulo - SP - CEP 05360-050

Telefones: (011) 3818- 2197 / 3818-2192 (laboratório)
(011) 3733-4113 (residência)

VI-CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que após, convenientemente esclarecido pela pesquisadora e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 2001.

Assinatura do voluntário

Assinatura da pesquisadora
responsável

ANEXO II. QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO

Identificação da amostra: N°.....

I. Sexo:

() Masculino () Feminino

II. Dados pessoais:

- Idade:..... anos
- Altura:.....m
- Peso:.....kg

III. Esporte:

- Pratica esportes? () Sim () Não

Modalidade esportiva	A quanto tempo?	Frequência

- Participa de competições? () Sim () Não

IV. Medicamentos:

- Toma algum medicamento? () Sim () Não

Medicamento	Dose	Frequência	Última vez que tomou?

Observações:.....
.....

V. Histórico de doenças:

- Passado.....

- Presente.....

Observações:.....

.....

.....

.....

VI. Comentários:

.....

.....

.....

.....

.....

VI. Coleta:

- Data:...../...../2001

- Hora:.....h

