

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Al(III) E Fe(III)  
EM FLUIDOS PÓS-HEMODIÁLISE EMPREGANDO  
ESPECTROFOTOMETRIA E MÉTODOS DE  
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CRISTIANE LUISA JOST**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Al(III) E Fe(III) EM  
FLUIDOS PÓS-HEMODIÁLISE EMPREGANDO  
ESPECTROFOTOMETRIA E MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO  
MULTIVARIADA.**

**por**

**Cristiane Luisa Jost**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Al(III) E Fe(III) EM FLUIDOS  
PÓS-HEMODIÁLISE EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA E  
MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.**

elaborada por  
**Cristiane Luisa Jost**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Paulo Cícero do Nascimento, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)**

---

**Solange Garcia Pomblum, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 16 de Dezembro de 2005.

Dedico

À minha família

*Aos meus pais Nestor e Larea Jost,  
pela vida, pelo apoio incondicional,  
pelo exemplo, pelo carinho e por  
acreditarem nos meus sonhos.*

Aos meus irmãos André, Luiz,  
Eliana e Rui, pelo exemplo, pela  
força, amizade, carinho e apoio em  
todas as horas.

Aos meus sobrinhos Patrícia, Fernanda, Carlos Arthur, Rodrigo e Matheus, por compreenderem a ausência e proporcionarem muitos momentos de alegria à minha vida.

Ao meu namorado Pedro Konzen, por me ensinar que amor deveria ser,  
primeiro, a banalidade de qualquer momento.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, pela orientação neste curso de Mestrado e por todas as contribuições à minha formação como pessoa e como profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Bohrer do Nascimento, pela co-orientação e pelo esclarecimento de dúvidas pertinentes ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, pela contribuição a este trabalho.

Um agradecimento especial aos amigos Marcos Guterres e Marieli Marques, pela participação essencial no meu crescimento como aluna de Iniciação Científica, assim como na aprendizagem dos métodos multivariados de calibração.

Também, um agradecimento especial à Denise Bertagnolli e Luciana Del Fabro, que colaboraram direta e incondicionalmente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Adrian Ramirez, Maurício Hilgemann, Jean Karlo Mendonça, Regina Binotto, Vanessa Mörschbacher, Sabrina Schirmer, Simone Noremborg, Marení Pauletto, Michele Sauer, Sandra Ribeiro, Emilene Becker e Eduardo Pilau, pelas risadas, pelos conselhos e pela força.

Às enfermeiras do centro de nefrologia, pela atenção e prontidão.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar os cursos de Graduação e Mestrado.

À Metrohm AG (Herisau, Suíça) pelo financiamento deste projeto através da doação de equipamentos e acessórios.

Além de polivalente, o Químico  
precisa ser multivariado.

*Roy Edward Bruns*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Al(III) E Fe(III) EM FLUIDOS PÓS-HEMODIÁLISE EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA E MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.**

AUTORA: CRISTIANE LUISA JOST  
ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de Dezembro de 2005.

No presente trabalho, investigou-se a associação de métodos de espectrometria de absorção molecular (EAM) com métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) em fluidos pós-hemodiálise, a partir da formação dos complexos dos metais com o reagente Violeta de Pirocatecol em tampão hexametilenotetramina (pH 6,1). O método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi usado para a quantificação simultânea dos analitos, em amostras com alta concentração salina, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, uso de agentes mascarantes ou etapas de separação. A presente técnica consiste em um procedimento simples, rápido e de baixo custo.

Empregaram-se misturas binárias dos analitos em solução pré-hemodiálise como grupo de calibração, utilizando-se dados de absorvância em 580 comprimentos de onda por amostra. Valores de concentração na faixa de 0,2 a 0,6 mg L<sup>-1</sup> foram preditos para amostras de fluido pós-hemodiálise com o uso de 3 componentes principais.

Dados de predição para amostras de fluido pós-hemodiálise adicionadas dos analitos foram comparados a medidas por voltametria adsortiva de redissolução (AdSV). Ambos os métodos apresentaram resultados similares para a determinação dos analitos em fluidos pós-hemodiálise.

Palavras-chave: Violeta de Pirocatecol, determinações simultâneas, métodos de calibração multivariada.

## ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry  
Post-Graduate in Chemistry  
Universidade Federal de Santa Maria

### **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF Al(III) AND Fe(III) IN POST-DIALYSIS FLUIDS BY SPECTROPHOTOMETRY AND MULTIVARIATE CALIBRATION METHODS.**

AUTHOR: CRISTIANE LUISA JOST  
ADVISOR: PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO  
Santa Maria, December 16, 2005.

This work aimed to explore the association of molecular absorption spectrometry with multivariate calibration techniques to the simultaneous determination of Al(III) and Fe(III) in post-dialysis fluids, from the complexes built between the analytes and the chromogenic reagent Pyrocatechol Violet in hexamethylenetetramine buffered medium (pH 6.1). The Partial Least Squares Regression (PLS) method was used to the simultaneous determination of the analytes, in high salt samples, without the use of sample pre-treatment, masking agents or separation steps. The present technique consists in a simple, fast and low cost procedure.

Binary mixtures of the analytes in high salt samples were used as calibration set, by using absorbance values of 580 wavelengths per sample. Concentrations values for Al(III) and Fe(III) in the ranging from 0.2 to 0.6 mg L<sup>-1</sup> were obtained by the PLS method in post-dialysis fluids samples by using 3 PLS components.

Predicted values obtained by PLS method were compared with voltammetric measurements by adsorptive stripping voltammetry for post-dialysis fluids samples spiked with the analytes. Both methods showed similar results to the determination of the analytes in post-dialysis fluids samples.

Keywords: Pyrocatechol Violet, simultaneous determination, multivariate calibration methods.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Violeta de Pirocatecol ( $H_3L^-$ , $pK_a = 7,8$ ).....	12
FIGURA 2 – Curva de calibração univariada para Al(III)-VPC ( $\lambda_{max}$ 570 nm) e Fe(III)-VPC ( $\lambda_{max}$ 607 nm) ( $n=3$ ).....	28
FIGURA 3 – Escolha da concentração ideal de VPC em tampão HMTA (pH 6,1)..	30
FIGURA 4 – Espectro de absorção molecular: (a) Reagente VPC 10 mM. (b) Fluido pós-hemodiálise. (c) Complexos Al(III)/Fe(III)-VPC (tampão HMTA, pH 6,1) para 1 mg L <sup>-1</sup> Al(III) e 1,0 mg L <sup>-1</sup> Fe(III).....	33
FIGURA 5 – Espectro de absorção molecular dos complexos Al(III)/Fe(III)-VPC (tampão HMTA, pH 6,1). As concentrações de Al(III) e Fe(III) variam de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> nas misturas binárias dos analitos.....	34
FIGURA 6 – PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PCA para os dados espectrais não centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções aquosas.....	36
FIGURA 7 – PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PCA para os dados espectrais não centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções pré-hemodiálise.....	37
FIGURA 8 – PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PCA para os dados espectrais centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções aquosas.....	38
FIGURA 9 – PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PCA para os dados espectrais centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções pré-hemodiálise.....	39
FIGURA 10 – Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções aquosas.....	41
FIGURA 11 – Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais em soluções aquosas.....	41
FIGURA 12 – Regressão para Al(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.....	42

FIGURA 13 – Regressão para Fe(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.....	43
FIGURA 14 – Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1 .....	44
FIGURA 15 – Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções aquosas determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).....	45
FIGURA 16 – Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções pré-hemodiálise.....	46
FIGURA 17 – Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais em soluções pré-hemodiálise.....	46
FIGURA 18 – Regressão para Al(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.....	47
FIGURA 19 – Regressão para Fe(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.....	47
FIGURA 20 – Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1 .....	48
FIGURA 21 – Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções pré-hemodiálise determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).....	49
FIGURA 22 – Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções aquosas.....	50
FIGURA 23 – Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais em soluções aquosas.....	50
FIGURA 24 – Regressão para Al(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.....	51
FIGURA 25 – Regressão para Fe(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.....	51
FIGURA 26 – Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1 .....	52
FIGURA 27 – Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções aquosas determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).....	53

FIGURA 28 – Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> em soluções pré-hemodiálise.....	54
FIGURA 29 – Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos <i>scores</i> obtido por PLS-1 para os dados espectrais em soluções pré-hemodiálise.....	54
FIGURA 30 – Regressão para Al(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.....	55
FIGURA 31 – Regressão para Fe(III). Gráfico de <i>loadings</i> para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.....	55
FIGURA 32 – Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1 .....	56
FIGURA 33 – Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções pré-hemodiálise determinada por PLS-1 ( <i>n</i> =3).....	57
FIGURA 34 – Correlação linear para Al(III) e Fe(III) determinada com o método proposto e AdSV em amostras de fluido pós-hemodiálise ( <i>n</i> =3).....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Contaminantes e seus níveis máximos de concentração em água de diálise .....	05
TABELA 2 – Misturas binárias dos analitos Al(III) e Fe(III) empregadas na construção do modelo de calibração para soluções aquosas e soluções pré-hemodiálise .....	25
TABELA 3 – Dados utilizados para o cálculo de $\epsilon$ em amostras de fluido pós-hemodiálise .....	28
TABELA 4 – Escolha do tempo ideal de complexação para Al(III)/Fe(III)-VPC (pH 6,1). $\lambda_{\max}$ 584 nm.....	31
TABELA 5 – Valores preditos pelo método PLS-1 e recuperações obtidas a partir de adições de Al(III) e Fe(III) em amostras de soluções pré-hemodiálise ( $n=3$ ) .....	59
TABELA 6 – Dados de predição obtidos através do modelo PLS-1 ( $n=3$ ) para amostras de solução pré-hemodiálise e fluido pós-hemodiálise de pacientes distintos .....	61
TABELA 7 – Valores de concentração de Al(III) e Fe(III) obtidos através dos métodos EAM/PLS-1 e AdSV em amostras de fluido pós-hemodiálise ( $n=3$ ).....	63

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

<b>EAA-FG</b>	Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite
<b>EAM</b>	Espectrometria de absorção molecular
<b>VPC</b>	Violeta de Pirocatecol
<b>IRA</b>	Insuficiência Renal Aguda
<b>IRC</b>	Insuficiência Renal Crônica
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>DFO</b>	Desferrioxamina B
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>DNA</b>	<i>Desoxi Ribonucleic Acid</i>
<b>ECR</b>	Eriocromo Cianina R
<b>CAS</b>	Cromazurol S
<b>FIA</b>	<i>Flow Injection Analysis</i> – Análise por injeção em fluxo
<b>VSRs</b>	Violeta de Solocromo RS
<b>PCA</b>	<i>Principal Components Analysis</i> - Análise de Componentes Principais
<b>PC</b>	<i>Principal Component</i> - Componente principal
<b>MLR</b>	<i>Multi Linear Regression</i> - Regressão Linear Múltipla
<b>PCR</b>	<i>Principal Components Regression</i> - Regressão por Componentes Principais
<b>PLS</b>	<i>Partial Least Squares Regression</i> - Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais
<b>RMSEC</b>	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> - Erro quadrático padrão de calibração

<b>RMSEP</b>	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> - Erro quadrático padrão de predição
<b>AX</b>	Alaranjado de Xilenol
<b>PAR</b>	Piridilazo Resorcinol
<b>HMTA</b>	Hexametilenotetramina
<b>AdSV</b>	<i>Adsorptive Stripping Voltammetry</i> - Voltametria adsortiva de redissolução
<b>HMDE</b>	<i>Hanging Mercury Drop Electrode</i> - Eletrodo de trabalho de mercúrio operando no modo estacionário
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda máximo
$\epsilon$	Absortividade molar

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>EPÍGRAFE.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>03</b>
2.1 Insuficiência renal.....	03
2.2 Hemodiálise.....	03
2.3 Alumínio e Ferro no organismo.....	06
2.4 Determinações simultâneas através do uso de agentes complexantes.....	09
2.5 Reações de coordenação.....	10
2.6 Calibração multivariada em medidas espectrofotométricas.....	12
2.7 Planejamento experimental.....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Instrumentação.....	20
3.2 Reagentes e soluções.....	20
3.3 Controle da contaminação.....	21
3.4 Coleta de dados por EAM.....	21

3.5 Formação dos complexos de Al(III)-VPC e Fe(III)-VPC.....	22
3.5.1 Ensaios para a formação do complexo Al(III)-VPC.....	22
3.5.2 Ensaios para a formação do complexo Fe(III)-VPC.....	22
3.6 Ensaios para a escolha das condições experimentais ideais.....	23
3.6.1 Concentração do complexante VPC.....	23
3.6.2 Tempo de repouso para complexação.....	23
3.7 Calibração Multivariada aplicada à determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) com VPC.....	24
3.7.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	24
3.7.2 Métodos de Regressão.....	24
3.7.3 Aplicação a amostras de fluido pós-hemodiálise.....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
4.1 Formação dos complexos dos analitos com VPC.....	27
4.2 Ensaios para a escolha das condições experimentais ideais.....	29
4.2.1 Concentração do complexante VPC.....	29
4.2.2 Tempo de repouso para complexação.....	30
4.2.3 Análise espectral.....	31
4.3 Calibração Multivariada aplicada à determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) com VPC.....	35
4.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	35
4.3.1.1 Dados não centrados na média.....	35
4.3.1.2 Dados centrados na média.....	37
4.3.2 Métodos de Regressão.....	39
4.3.2.1 MLR.....	39
4.3.2.2 PLS.....	40

4.3.2.3 PCR.....	60
4.3.3 Aplicação a amostras de fluido pós-hemodiálise.....	60
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A hemodiálise é um método de depuração extra-renal do sangue que permite manter vivos pacientes com insuficiência renal aguda ou crônica avançada, seja como método definitivo de tratamento ou temporário. Antes de uma sessão de hemodiálise, a água de diálise e duas soluções de concentrados salinos são misturadas para obter-se a solução pré-hemodiálise, utilizada para a manutenção do equilíbrio iônico do sangue dos pacientes durante a sessão [1].

A contaminação das soluções pré-hemodiálise por metais pode se dar através da água de diálise e dos concentrados salinos. A fim de evitar ou minimizar riscos, um acompanhamento contínuo da qualidade da água de diálise é realizado. No entanto, o monitoramento de soluções de concentrados salinos, com relação a traços metálicos, ainda não é regulamentado por órgãos de controle.

Os efeitos toxicológicos dos contaminantes variam de uma espécie para outra e Al(III) é considerada a espécie mais tóxica para a hemodiálise. Estudos relacionam o acúmulo de Al(III) no organismo a doenças neurológicas e ao comprometimento da estrutura óssea dos pacientes [2-3]. Assim, a concentração de Al(III) deve ser monitorada em amostras de sangue dos pacientes. Uma alternativa não invasiva, ou seja, sem a coleta de amostras de sangue dos pacientes, é o monitoramento dos níveis de Al(III) diretamente em amostras de fluido pós-hemodiálise.

A espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (EAA-FG) tem sido usada como técnica analítica corrente para a determinação de traços de metais no que diz respeito à hemodiálise [4-8]. No entanto, para fluidos pós-hemodiálise, há uma carência de métodos analíticos, uma vez que as determinações não podem ser executadas, diretamente, por EAA-FG.

Problemas de metodologia ainda existem devido à variabilidade das amostras, o que depende de diversas variáveis associadas ao progresso da hemodiálise apresentado por cada paciente. O meio salino apresentado pelas amostras causa sérias interferências de matriz, mesmo com o uso de sistemas de correção de *background* Zeeman [9-11]. Algumas alternativas associadas a medidas

por EAA-FG incluem a pré-concentração seletiva dos analitos e a eliminação do meio salino [12-14].

Considerando que o método de EAA-FG apresenta-se inadequado para a determinação direta de Al(III) e Fe(III) e que etapas de pré-tratamento da amostra necessitam de tempo, o presente trabalho tem como objetivo explorar a associação de métodos de espectrometria de absorção molecular (EAM) a métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea dos analitos em fluidos pós-hemodiálise.

O reagente Violeta de Pirocatecol (VPC) foi utilizado como complexante para Al(III) e Fe(III) no desenvolvimento de um método fácil, rápido, não-invasivo e de baixo custo para o controle da razão Al(III)/Fe(III) durante a hemodiálise.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Insuficiência renal**

A insuficiência renal está dividida em insuficiência renal aguda (IRA) e insuficiência renal crônica (IRC). A falta abrupta e intensa de água (desidratação severa), a perda de sangue (hemorragias) ou a perda do plasma (queimaduras) faz com que não ocorra a formação de urina levando à IRA. Doenças cardíacas, a ingestão de medicamentos para o controle da pressão sanguínea e a obstrução das vias urinárias também podem gerar IRA.

IRC gera um quadro de deterioração progressiva e irreversível da função renal, o que causa diversos distúrbios no organismo humano. As manifestações clínicas da IRC refletem a incapacidade dos rins em excretar resíduos nitrogenados, assim como regular o equilíbrio hidroeletrólítico e secretar ou metabolizar hormônios. Uma alteração do equilíbrio hidroeletrólítico provoca a redução da excreção de fosfatos, sulfatos e ácidos inorgânicos, os quais se acumulam e causam acidose metabólica e diminuição dos níveis de bicarbonato, associada a menor capacidade de excretar íons  $H^+$  e  $NH_4^+$  [15].

### **2.2 Hemodiálise**

A saúde de pessoas que sofrem de IRC está diretamente ligada à possibilidade de purificação do sangue em sessões de diálise onde, por processos de difusão através de membranas, devem ser eliminados metabólitos que o organismo produz e não é capaz de eliminar através dos rins.

Independentemente do tipo de processo – hemodiálise, diálise peritoneal ou hemofiltração [16] – há necessidade do uso de soluções dialisadoras, que são preparadas pela dissolução de sais e outras substâncias em grandes volumes de água, que podem constituir uma grande fonte de contaminação se não forem adequadamente tratadas.

Na hemodiálise, o sangue do paciente entra em contato com a solução pré-diálise, no dialisador, por meio de uma circulação extracorpórea. O sangue fica separado da solução pré-hemodiálise por uma membrana semipermeável, através da qual passam os solutos tóxicos que deveriam ter sido eliminados pelos rins. A solução pré-hemodiálise deve conter aqueles solutos que o sangue deve manter ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), para que estes não sejam dialisados.

A solução pré-hemodiálise é obtida a partir da mistura de água e concentrados salinos ácidos e básicos. Faz-se a mistura de 1 parte de solução ácida com 1,22 parte de solução básica e 32,78 partes de água para diálise. Um paciente renal crônico entra em contato com esta solução em uma frequência de 3 vezes por semana, em sessões de hemodiálise, com duração de 4 horas cada. Em cada sessão, o fluxo de solução pré-hemodiálise é de 500 mL por minuto, perfazendo um total de 120 L nas 4 horas de tratamento. Desta forma, o paciente tem contato direto com 360 L de solução pré-hemodiálise por semana.

Na diálise peritoneal, a solução pré-diálise é introduzida na cavidade peritoneal do paciente, de tal modo que, dentro do abdômen, o sangue é purificado por meio de trocas que ocorrem por difusão através da membrana peritoneal. A solução para diálise deve conter a mesma concentração salina que a solução pré-hemodiálise. No entanto, ela deve ser estéril.

Na hemofiltração, é utilizada uma solução de re-injeção estéril, de composição semelhante à pré-hemodiálise. Também neste caso, há circulação extracorpórea do sangue que, submetido a uma forte pressão hidrostática, perde tanto soluto quanto água através da membrana. O mesmo volume de água perdido pelo paciente é repostado pela solução de re-injeção, mas sem os solutos tóxicos.

É importante observar que as soluções pré-diálise entram em contato muito próximo com o sangue dos pacientes, sendo separados apenas pela membrana semipermeável, que permite facilmente a transferência de íons [17].

A segurança do tratamento dialítico tem como um de seus determinantes a qualidade das soluções empregadas no processo de diálise. A contaminação das soluções pré-diálise pode ocorrer através da água utilizada no preparo das mesmas, através dos concentrados salinos ou ainda dos resíduos de agentes químicos usados na desinfecção dos equipamentos de diálise.

Como o paciente renal entra em contato com 360 L de solução pré-hemodiálise por semana, convém que a água receba certos cuidados para que

contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos não sejam transferidos para os pacientes.

Devido à necessidade de redução dos riscos aos quais ficam expostos os pacientes que se submetem à diálise, a água tratada utilizada no preparo da solução pré-hemodiálise deve ser processada de modo que apresente um padrão [18], de acordo com a Tabela 1, ou seja, uma mínima contaminação bacteriana possível e reduzida presença de qualquer substância ou elemento contaminante.

Tabela 1 – Contaminantes e seus níveis máximos de concentração em água de diálise.

<b>Componentes</b>	<b>Valor máximo permitido</b>	<b>Freqüência de análise</b>
Coliformes totais	Ausência em 100 mL	Mensal
Bactérias heterotróficas	200 UFC mL <sup>-1</sup>	Mensal
Endotoxinas	1 ng mL <sup>-1</sup>	Mensal
Nitrato, Cálcio	2 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Alumínio	0,01 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Cloramina	0,1 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Cloro	0,5 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Fluoreto	0,2 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Sódio	70 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Magnésio	4 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Potássio	8 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Bário, Zinco e Cobre	0,1 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Sulfato	100 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Arsênio, Chumbo e Prata	0,005 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Cádmio	0,001 mg L <sup>-1</sup>	Semestral

Cromo	0,014 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Selênio	0,09 mg L <sup>-1</sup>	Semestral
Mercúrio	0,0002 mg L <sup>-1</sup>	Semestral

---

Fonte: Resolução RDC (ANVISA) n.º. 154, de 15 de Junho de 2004. Diário Oficial da União: Poder Executivo, de 17 de Junho de 2004.

De acordo com a Comissão de Toxicologia da IUPAC [19], soluções pré-hemodiálise não devem conter mais do que 15 µg Al L<sup>-1</sup>. Um limite de 10 µg Al L<sup>-1</sup> é estabelecido para a água usada no preparo da solução pré-hemodiálise [20].

Osrose reversa é o método de tratamento para obtenção da água de diálise, uma vez que fornece água com baixa concentração de Al(III), assim como uma baixa concentração de outros cátions e elimina contaminantes orgânicos que podem contribuir com problemas relacionados à hemodiálise. A deionização da água é outro método de tratamento escolhido, mas sabe-se que ele requer um monitoramento mais cuidadoso, pois a troca de Al(III) pela resina pode ser seguida de uma imprevisível eluição deste analito.

Quando a água usada no dialisador é fluoretada, Al(III) pode atravessar facilmente a membrana. A presença de fluoreto em concentração equivalente à de Al(III) pode formar o mineral criolita (Na<sub>3</sub>AlF<sub>6</sub>), de difícil remoção do sistema de tratamento [21].

### 2.3 Alumínio e Ferro no organismo

No organismo dos seres humanos, os elementos traço podem ser divididos em essenciais e não-essenciais. Os primeiros são fundamentais para o desenvolvimento e a manutenção da vida, devido à sua participação em diversos processos bioquímicos. Sua deficiência ou ausência na dieta ocasiona patologias carenciais. Por outro lado, o excesso destes elementos pode causar efeitos tóxicos ao organismo.

Os elementos não-essenciais são aqueles que não participam do metabolismo humano e podem gerar sérios danos à saúde.

O Al(III) é um elemento não essencial. Porém, está presente no organismo humano. A exposição a este elemento se dá oralmente, através de alimentos e medicamentos ou, ainda, através de soluções de nutrição parenteral [22]. O Al(III) é um elemento onipresente no ambiente. Também, é o metal mais abundante na crosta terrestre, perfazendo cerca de 8% de sua massa [23]. O homem tem contato com o Al(III) ou seus compostos diariamente, ingerindo de 10 a 100 mg, tanto por via oral, como por inalação, através de alimentos, utensílios domésticos, medicamentos, partículas de pó, assim como através da água potável, uma vez que sulfato de Al(III) é usado como floculante em seu processo de purificação.

A exposição geral dos seres humanos ao Al(III) é grande, mas devido à sua baixa absorção intestinal em indivíduos saudáveis, os problemas são minimizados. Uma pequena parte é absorvida, passando para a corrente circulatória e sendo eliminada por via renal. Os efeitos tóxicos do elemento são mais evidentes em indivíduos com a função renal comprometida, pois Al(III) é absorvido pelos rins e deposita-se no organismo, principalmente no tecido ósseo, onde faz trocas com cálcio, o que causa Osteodistrofia e Encefalopatia [22]. O tratamento da doença óssea causada por acúmulo de Al(III) é feito através da administração do agente quelante Desferrioxamina B (Desferal<sup>®</sup>) (DFO). Em um paciente com Encefalopatia, mesmo que 500 µg de Al(III) sejam transferidos do plasma sanguíneo para o dialisador durante as 4 h da sessão de hemodiálise, ainda permanecem resquícios de Al(III) em diversos tecidos de seu organismo, pois apenas 1% do Al(III) total está presente no plasma [23].

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é recomendado que o Al(III) sérico dos pacientes em tratamento hemodialítico regular seja determinado anualmente. A quantificação do Al(III) sérico é um indicador útil do grau de contaminação do paciente, quando determinado em intervalos regulares.

O nível do Al(III) sérico em pacientes renais deve ficar abaixo de 30 µg L<sup>-1</sup>. Para pacientes cujo nível exceder este valor, é recomendado o tratamento com o agente quelante DFO [23-24]. DFO é a única droga amplamente aceita e usada para a remoção da sobrecarga de Al(III) no organismo. Pacientes renais crônicos, intoxicados por Fe(III), também são tratados com DFO, através de infusões subcutâneas aplicadas durante o período de 12 a 24 h/dia, por até uma semana.

DFO forma complexos estáveis com Al(III) e Fe(III), eliminados em sessões de diálise. Por retirar Fe(III) do organismo, pode provocar anemia.

Ferro é um elemento essencial à vida humana. Como um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, gera um campo elétrico que protege a Terra dos raios solares e das radiações cósmicas. Ainda, participa em inúmeras reações bioquímicas, como catálise, síntese do DNA, transporte de oxigênio e transferência de elétrons. Em conjunto com alumínio, é o mais importante elemento metálico no meio-ambiente terrestre [23].

No organismo humano, ferro está disponível como elemento funcional ou reserva (de 3 a 5 g). A maior parte do elemento está envolvida em ciclos, na eritropoese e na homeostase. A segunda maior fração do elemento está na forma de ferritina e hemosiderina. No tecido humano, está presente na hemoglobina e em células enzimáticas. Apenas 4 mg estão ligados à transferrina no plasma sanguíneo, cuja função é o transporte de ferro e sua troca entre os tecidos [23].

A absorção do elemento no organismo humano pode ser explicada, de forma simples, como um processo de transposição do elemento no tecido intestinal. A absorção de ferro envolve a digestão de alimentos, interações entre suas formas livres e componentes de alimentos e a transferência de ferro da mucosa intestinal para o interior do organismo pela circulação sanguínea.

Ferro é excretado pela urina, fezes e pele, de forma lenta, na ordem de 0,5 mg por dia. A deficiência do elemento é mais comum em crianças e mulheres grávidas, que dele necessitam com mais intensidade. Os efeitos da deficiência são decorrentes de anemia e do esgotamento de enzimas essenciais para os tecidos. Doses terapêuticas de Fe(II) são administradas como tratamento até a normalização dos níveis de hemoglobina. Na deficiência de ferro, a absorção de metais pesados pode se intensificar, e a os indivíduos ficam particularmente vulneráveis a cádmio e chumbo.

O acúmulo de ferro se dá em indivíduos com extremamente elevadas taxas de eritropoese (pacientes com talassemia), assim como em portadores da desordem genética hemocromatose. Nestas condições, quantidades elevadas de ferro são acumuladas pelo intestino, de forma anormal. Na hemocromatose, o acúmulo de ferro pode ser tratado com flebotomia, pela qual se pode remover cerca de 20 g de ferro por ano [23].

Acredita-se que uma das maiores razões pela toxicidade do ferro às células é sua capacidade de catalisar a produção de radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), potentes agentes oxidantes [23]. A droga DFO pode ser administrada em casos de intoxicação aguda de ferro por ingestão acidental de medicamentos.

Ferro é um elemento de baixa toxicidade. Concentrações acima de 200 mg por dia são consideradas tóxicas para seres humanos. O nível de ferro aceitável em água potável varia de 100 a 300 mg L<sup>-1</sup> [23].

O nível de Fe(III) em água de diálise e soluções de concentrados salinos ainda não é regulamentado por órgãos de controle.

## **2.4 Determinações simultâneas através do uso de agentes complexantes**

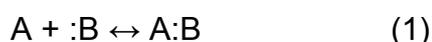
Diversos reagentes cromóforos têm sido relatados para a determinação espectrofotométrica de espécies metálicas em água, como VPC [25-27], eriocromo cianina R (ECR) [28-31] e cromazurol S (CAS) [32-33]. Estes complexantes foram comparados em vários artigos publicados anteriormente [31, 34-36]. Análises por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA) usando detecção espectrofotométrica [35, 37-40] e amperométrica [41] foram aplicadas, também, na determinação de Al(III) em análises de amostras ambientais, como água e solo. A determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) foi investigada em amostras de ligas metálicas em solução [42]. Amostras de plantas foram analisadas por EAM, aplicando-se ECR como complexante para Al(III), enquanto que Fe(III) foi determinado por EAA [43].

A determinação voltamétrica de Al(III) e Fe(III) com em concentrados salinos para hemodiálise foi descrita recentemente [1]. No entanto, o método necessita de aquecimento para acelerar a reação entre Al(III) e o complexante Violeta de Solocromo RS (VSRS).

Para fluidos pós-hemodiálise, a carência de metodologias para acessar espécies químicas pode estar relacionada à complexidade e variabilidade das amostras e, em parte, devido ao fato de que tais amostras são simplesmente consideradas resíduo e descartadas após o término da sessão de hemodiálise.

## 2.5 Reações de coordenação

De forma geral, em todas as reações químicas as moléculas e os íons tendem a aumentar a estabilidade de seus elétrons de valência [23]. Em reações de coordenação, como por exemplo, reações envolvendo ácidos e bases de Lewis, os pares de elétrons são doados pelas bases (bases de Lewis – doadores) e recebidos por orbitais ligantes dos ácidos (ácidos de Lewis – receptores), de acordo com a equação (1):



A formação de complexos metal-ligantes (M-L) em solução pode ser exemplificada pela equação (2), o que também constitui uma reação ácido/base, onde M é o ácido e L é a base de Lewis:



A estabilidade resultante do complexo ML, assim como seu comportamento cinético, são conseqüências das interações fortes ou fracas dos orbitais *d* dos metais de transição com os orbitais ligantes.

Os metais são classificados em ácidos duros e moles [23]. Esta classificação se baseia no número de elétrons disponíveis na esfera de coordenação. Os cátions metálicos do Tipo A possuem a configuração eletrônica dos gases inertes ( $d^0$ ) e, por isso, correspondem aos cátions de “esfera dura”. Estes íons podem ser visualizados como esferas simétricas, que não são deformadas por outros íons (pouco polarizáveis). Os metais do Tipo B são altamente influenciados por outros íons, ou seja, são altamente polarizáveis e são classificados como “esferas moles”.

Há duas regras básicas para as reações ácido/base de Lewis:

- 1) Equilíbrio – ácidos duros se associam, preferencialmente, a bases duras e ácidos moles, a bases moles.
- 2) Cinética – ácidos duros reagem facilmente com bases duras e, ácidos moles, com bases moles.

Qualquer átomo deficiente em elétrons pode agir como um ácido de Lewis. Muitos compostos dos elementos do Grupo IIIA, como B e Al, são ácidos de Lewis, pois estes átomos só têm um sexteto de elétrons na camada externa. Muitos outros compostos que têm átomos com orbitais vacantes também agem como ácidos de Lewis, como os haletos de Zn(II) e Fe(III) usados em reações orgânicas.

Os analitos Al(III) e Fe(III) são exemplos de ácidos duros. Por isso, formam complexos preferencialmente com bases duras, ou seja, com fluoretos e ligantes que possuem oxigênio como átomo doador. Agentes quelantes contendo apenas nitrogênio ou enxofre como átomos doadores não formam complexos de estabilidade apreciável com Al(III) e Fe(III), pois não complexam adequadamente metais do Tipo A [23].

A Figura 1 mostra a estrutura do complexante VPC, que pode ser considerado uma base de Lewis após a desprotonação de seus grupos ácidos em solução aquosa. VPC possui 4 grupos ácidos, mas 2 sítios de coordenação: o grupo sulfóxido e o grupo fenólico do anel cetônico (evidenciados). A desprotonação no grupo sulfóxido está ligada ao fato de que este grupo exerce um efeito indutivo muito forte sobre os elétrons da estrutura aromática e seu próton fica mais positivo. Assim, a perda do próton para a solução aquosa é favorável, pois ele é um ácido forte. O grupo fenólico do anel cetônico também é um ácido forte, se comparado aos grupos fenólicos do anel aromático, uma vez que o efeito indutivo do grupo carbonila faz com que este próton seja muito mais positivo. Assim, o próton se separa mais fácil, e o ácido está mais ionizado em solução aquosa. A desprotonação dos grupos fenólicos do anel aromático é menos favorável, uma vez que estes grupos não são muito ácidos. Para  $pK_a = 7,8$ , o indicador livre se apresenta na forma  $H_3L^-$ .

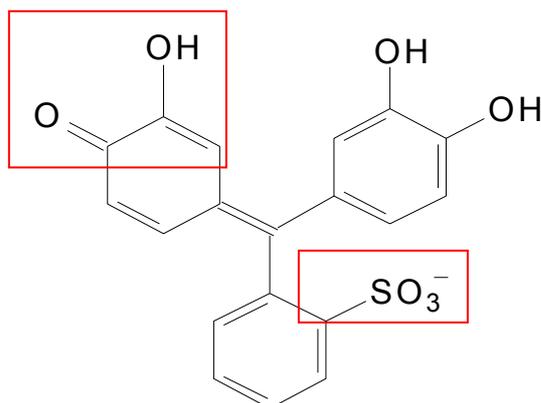


Figura 1 – Violeta de Pirocatecol ( $H_3L^-$ ,  $pK_a = 7,8$ ).

## 2.6 Calibração multivariada em medidas espectrofotométricas

Calibração ou regressão é um procedimento comum a todo processo analítico que visa encontrar um modelo que relacione a variável medida em um instrumento com a propriedade que se deseja investigar. Este modelo é usado, posteriormente, para fazer previsões da propriedade investigada. Em Química Analítica, a propriedade investigada é, geralmente, a concentração de uma espécie.

O modelo de calibração mais utilizado pelos químicos é o modelo univariado, assim denominado porque utiliza a resposta medida em um único sensor para construir o modelo.

O modelo de calibração é obtido medindo a resposta do sensor em um grupo de amostras de calibração com a concentração do analito conhecida. O método do ajuste dos mínimos quadrados é geralmente usado para estimar os coeficientes de regressão.

Com este modelo, previsões em outras amostras podem ser feitas através de medidas feitas para um único sensor, tal que a resposta deve ser dependente somente da espécie que está sob investigação. Na presença de interferentes, o analito deve ser separado dos outros constituintes que influenciam o sinal [44].

A extração de informações dos resultados de procedimentos analíticos é parte essencial de todo o experimento. A sofisticação de técnicas instrumentais de análise química, impulsionada pela combinação de instrumentos a computadores, produz uma grande quantidade de informação, muitas vezes complexa e variada.

Métodos de calibração multivariada [45] têm sido cada vez mais utilizados em química analítica para o tratamento destes dados. Têm, como princípio básico, a utilização simultânea de muitas variáveis,  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , para a construção de um modelo que relacione estas respostas a uma ou mais propriedades que se deseja quantificar.

Um espectro de absorção molecular é formado por medidas feitas em um grande número de comprimentos de onda. Estes dados constituem um sinal multivariado e, se este sinal for incluído no processo de calibração, pode-se fazer quantificações multicomponentes ou determinar um único componente na presença de seus interferentes, contrariamente à calibração univariada, onde isto não é possível.

O processo de calibração é constituído por duas etapas: descritiva e preditiva [44]. A primeira emprega um conjunto de medidas realizadas em uma série de soluções, cuja concentração dos analitos é conhecida, para construir um modelo que relacione a grandeza medida com a concentração da espécie de interesse. A etapa preditiva utiliza o modelo de calibração obtido na etapa anterior para prever as concentrações de uma série de amostras, com base nas medidas realizadas para cada amostra.

A calibração multivariada sempre envolve duas matrizes,  $X$  e  $y$ , tal que  $X$  representa a que contém variáveis independentes e  $y$ , as dependentes. Estas duas matrizes são relacionadas por regressão.

Outro tipo de modelagem existente é a Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis*, PCA). Ao contrário da calibração multivariada, PCA trabalha apenas com uma matriz  $X$  [45].

Para a compreensão dos fundamentos do PCA, são necessárias algumas considerações iniciais.

Um conjunto ou matriz de dados constituído por variáveis, organizadas em linhas e colunas, pode ser representado em um sistema cartesiano. Este sistema cartesiano possui eixos, que podem ser redefinidos com o uso do PCA a partir de projeções. Desta forma, cada eixo passa a ser um componente principal (*Principal Component*, PC), que maximiza a distância entre pontos e minimiza a distância ponto-eixo, apontando para a direção de variância máxima (PC1) e representando o melhor ajuste entre os pontos. O PC responsável pela segunda maior variância, PC2, será ortogonal (não correlacionado) ao PC1, constituindo também um novo sistema

de coordenadas. O termo variância está relacionado à extensão da faixa de valores abrangida pelo PC.

PCA decompõe a matriz  $\mathbf{X}$  em “estrutura”, um grupo de duas matrizes de dimensões reduzidas, que constituem o modelo de componentes principais e, em uma outra matriz, contendo apenas o resíduo da análise. Na “estrutura”, há PC's que se estendem sobre as direções de maior variância e, no resíduo, há PC's onde o aglomerado de dados possui uma variância suficientemente pequena para ser rejeitada. De forma simplificada, há uma redução na dimensionalidade dos dados pois apenas os PC's mais representativos, resultantes de combinações das variáveis originais, são reunidos em uma nova matriz, uma aproximação da matriz original  $\mathbf{X}$ .

Em termos de notação matemática, PCA é descrito pela equação (3):

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^t + \mathbf{E} \quad (3)$$

A matriz  $\mathbf{T}$  é a matriz dos *scores* e a matriz  $\mathbf{P}$ , dos *loadings*.  $\mathbf{E}$  é a matriz que constitui o erro ou o resíduo do modelo. O produto das matrizes  $\mathbf{T} \mathbf{P}^t$  constitui o modelo de componentes principais que descreve a estrutura de correlação das variáveis da matriz  $\mathbf{X}$ .

A matriz de *scores* está relacionada às novas coordenadas das amostras com relação aos PC's. Um gráfico de *scores* chama-se mapa das amostras.

A matriz de *loadings* está ligada às relações entre as variáveis originais e os novos PC's, ou seja, o quanto cada variável contribui ou qual o peso de cada variável para cada PC. Um gráfico de *loadings* chama-se mapa das variáveis.

O objetivo do método PCA é a simplificação do conjunto de dados, de forma que, em alguns casos, um grande número de variáveis (como absorvâncias em diversos comprimentos de onda) pode ser representado por apenas 2 ou 3 PC's, que podem ser observados em gráficos bidimensionais.

As diferenças entre as coordenadas das amostras no sistema original e no novo e a perda de informação devido à projeção para redução da dimensão são consideradas como erro ou resíduo do modelo.

Sabe-se que os PC's que constituem o modelo PCA são um conjunto de linhas ortogonais determinadas por direções de máxima variância. Eles têm uma origem comum, e há inúmeras formas para a escolha desta origem. Em alguns

casos, pode-se fazer o uso da origem inicial dos dados. No entanto, de forma geral, este procedimento não gera dados ótimos. Também, pode-se mudar a origem do espaço das variáveis para o centro do aglomerado das variáveis, o “ponto médio”. Este procedimento denomina-se “centrar na média” e a nova origem, comum aos PC’s, é chamada “centro médio”.

A calibração multivariada para  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  é, raramente, apenas estabelecer e encontrar um modelo entre as matrizes. É necessário que este seja útil na predição futura. Ou seja, usar o modelo partindo de  $\mathbf{X}$  para estimar  $\mathbf{y}$ . Após, é necessário testar o modelo e/ou predição numa matriz ainda não envolvida no desenvolvimento do modelo. Ou seja, validar o modelo em um grupo teste, que deve ser representativo [45].

Os métodos Regressão Linear Múltipla (*Multi Linear Regression*, MLR), Regressão por Componentes Principais (*Principal Components Regression*, PCR) e Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) são os mais utilizados para a obtenção de modelos de calibração multivariada em medidas espectroscópicas.

Dentre estes, o MLR é o mais simples. Neste método, as variáveis a serem previstas ( $\mathbf{y}$ ) são estimadas utilizando-se uma combinação linear entre as variáveis independentes encontradas na matriz  $\mathbf{X}$ , conforme a equação (4):

$$\mathbf{y} = b_1\mathbf{x}_1 + b_2\mathbf{x}_2 + b_n\mathbf{x}_n = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (4)$$

onde  $\mathbf{b}$  é um vetor como os coeficientes de regressão,  $\mathbf{X}$  é a matriz que contém as medidas analíticas de cada amostra considerada e  $n$  é o número de amostras utilizadas. O vetor  $\mathbf{b}$  é calculado a partir da equação (5):

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T\mathbf{y} \quad (5)$$

Quando os dados analíticos contêm baixo ruído e nenhuma colinearidade, ou seja, nenhuma relação linear entre as absorvâncias em diferentes comprimentos de onda, o método MLR apresenta-se como a melhor solução para a obtenção do modelo de regressão [46]. No entanto, na maioria dos casos, o modelo carrega

informações irrelevantes e ruídos do sistema. Além disto, se o número de amostras não for igual ao de variáveis ( $\mathbf{X}$  não constitui uma matriz quadrada) a inversa ( $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$ ) não poderá ser calculada.

O método PCR apresenta uma solução para as limitações do MLR. Neste método, a regressão não é feita com os dados originais da matriz  $\mathbf{X}$ , mas com dados tratados por PCA, onde uma aproximação da matriz original é usada, com dimensão reduzida. Embora o PCR proponha um tratamento dos dados por PCA, nem sempre há a eliminação do ruído do sistema.

O método PLS, desenvolvido por Herman Wold [47], envolve, simultânea e independentemente, duas análises de componentes principais (PCA) [45], diferindo do PCR, pois a informação dos valores de concentração é também utilizada para extrair PC's por projeção. Este processo torna a informação das concentrações mais relevante para o modelo de calibração e resulta em um modelo com melhor desempenho na predição em algumas aplicações; muito embora, os dois métodos tenham o mesmo desempenho quanto à predição em um grande número de aplicações práticas.

Tem-se o método PLS para a regressão de uma variável dependente de cada vez, conhecido como PLS-1, e o método para a regressão de duas ou mais variáveis simultaneamente, PLS-2.

No método PLS, basicamente, uma matriz contendo os espectros dos padrões ( $\mathbf{X}$ ) é relacionada com outra matriz que armazena dados sobre as concentrações ( $\mathbf{y}$ ), resultando nas equações (6) e (7). A matriz  $\mathbf{X}$  é decomposta em matrizes de *scores* e *loadings*, assim sendo também com a matriz  $\mathbf{y}$ . Os elementos  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$  são chamados de *scores* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ , respectivamente, e os elementos  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{Q}$  são chamados de *loadings* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ , respectivamente. Já as matrizes  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{F}$  representam os erros ou resíduos da modelagem de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ .

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^t + \mathbf{E} \quad (6)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{U} \mathbf{Q}^t + \mathbf{F} \quad (7)$$

O PLS oferece possibilidade superior de interpretação. Como a matriz  $\mathbf{y}$  influencia a decomposição da matriz  $\mathbf{X}$ , o método PLS resulta em ótimas predições.

Utiliza-se a matriz  $\mathbf{X}$  para a predição de valores da matriz  $\mathbf{y}$ , obtendo-se  $\hat{\mathbf{y}}_{\text{cal}}$  que é, então, comparada aos reais valores de concentração da matriz  $\mathbf{y}$ , ou seja, têm-se uma expressão para o erro do modelo de calibração, dado pela equação (8):

$$\text{Erro do modelo} = \hat{\mathbf{y}}_{\text{cal}} - \mathbf{y}_{\text{cal}} \quad (8)$$

De modo simplificado, pode-se dizer que esta expressão representa a diferença entre o valor predito e o valor de referência para a calibração.

Esta expressão pode ser elevada ao quadrado, e dividida pelo número de amostras,  $n$ , originando a equação (9), que demonstra, então, o resíduo do modelo de calibração:

$$\text{Resíduo} = (\hat{\mathbf{y}}_{\text{cal}} - \mathbf{y}_{\text{cal}})^2/n \quad (9)$$

O resíduo do modelo refere-se ao que não é explicado por  $\mathbf{T P}^t$ .

Para estimar-se o erro do modelo de calibração, utiliza-se o erro quadrático padrão de calibração [48] (*Root Mean Square Error of Calibration*, RMSEC), a raiz quadrada do resíduo, dado pela equação (10), nas unidades originais do conjunto de dados em questão:

$$\text{RMSEC} = \sqrt{(\hat{\mathbf{y}}_{\text{cal}} - \mathbf{y}_{\text{cal}})^2/n} \quad (10)$$

Usa-se o grupo teste na predição, ou  $\mathbf{X}_{\text{pred}}$ , para a predição dos valores  $\hat{\mathbf{y}}_{\text{pred}}$ , com um grupo de dados não envolvido na calibração. Então, pode-se comparar novamente o valor de referência e o predito, obtendo-se agora o erro do modelo de predição, dado pela equação (11):

$$\text{Erro do modelo} = \hat{\mathbf{y}}_{\text{pred}} - \mathbf{y}_{\text{pred}} \quad (11)$$

Também de modo simplificado, pode-se dizer que esta expressão representa a diferença entre o valor predito e o valor de referência para a predição. Tem-se o resíduo do modelo de predição, pela equação (12):

$$\text{Resíduo} = (\hat{\mathbf{y}}_{\text{pred}} - \mathbf{y}_{\text{pred}})^2/n \quad (12)$$

Para estimar-se o erro do modelo de predição, utiliza-se o erro quadrático padrão de predição, RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*), a raiz quadrada do resíduo do modelo de predição, dado pela equação (13), nas unidades originais do conjunto de dados:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{(\hat{\mathbf{y}}_{\text{pred}} - \mathbf{y}_{\text{pred}})^2/n} \quad (13)$$

A quantificação multicomponente de metais é um dos problemas de interesse corrente na literatura, e métodos para a determinação de dois a quatro componentes são relatados para análises de metais.

Poppi e colaboradores [49-50] executaram a determinação simultânea de Al(III) e Fe(III), através de métodos PLS, usando-se Alaranjado de Xilenol (AX) como complexante em amostras de extratos de plantas. Os analitos Ca(II) e Mg(II) foram determinados em amostras de concentrados salinos com Negro de Eriocromo T e métodos PLS [51].

Também, o reagente piridilazo resorcinol (PAR) foi citado como um reagente viável para determinações multicomponentes de diversos metais [52-56].

Analitos como Al(III) e Be(II) foram determinados em amostras geoquímicas por Madrakian [57], enquanto que Cu(II), Co(II) e Ni(II) [58] e Al(III), Fe(III) e Cu(II) [42], em soluções de ligas metálicas por métodos PLS.

Determinações multicomponentes para Sb(III) e Sb(V) [59], fármacos [60-66], aminoácidos [67] e vitaminas [68] em formulações farmacêuticas também foram desenvolvidas utilizando-se os métodos de regressão PLS. A determinação de drogas antiepilépticas em amostras biológicas foi relatada em trabalho publicado por Rezaei [69]. Pesticidas foram determinados através de métodos PLS em vegetais e frutas [70] e Cu(II), Zn(II) e Fe(III), em amostras de mel [71].

## 2.7 Planejamento experimental

Um dos problemas mais comuns na Química experimental é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse. Ou seja, como a resposta de uma medida ou observação depende de outros fatores.

Para isso, devem-se determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores, ou as variáveis controladas pelo experimentador, podem ser qualitativos ou quantitativos. Pode haver mais de uma resposta de interesse [72].

Um planejamento experimental requer a especificação dos níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que são empregados nos experimentos. Um planejamento experimental requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Em geral, se houver  $n_1$  níveis do fator 1,  $n_2$  níveis do fator 2, ..., e  $n_k$  do fator k, o planejamento será um fatorial  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ . Este é o número mínimo de experimentos a serem realizados para se ter um planejamento completo.

Ferré e colaboradores [73] apontam que um planejamento de misturas deve fornecer resultados mais exatos, uma vez que estes modelos acomodam melhor as interações entre os elementos e as diferenças cinéticas na formação dos complexos. Haaland [74] justifica em seu trabalho que um planejamento ortogonal de misturas é superior a um planejamento aleatório por acomodar, de forma mais eficiente, as interações possíveis com menos amostras de calibração.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Instrumentação

- Sistema de purificação de água Milli-Q, resistividade 18,2 MΩ.cm (Millipore, Bedford, USA);
- Balança analítica com 4 casas de precisão (Sartorius);
- Câmara de fluxo laminar Classe 100 (Trox do Brasil);
- Espectrofotômetro UV-visível com arranjo de diodos HP 8453 (Hewlett Packard);
- Computador com processador Pentium (Hewlett Packard);
- Polarógrafo 693 VA Processor e 694 VA Stand (Metrohm);
- *Software:*  
HP UV-Visible ChemStations (Hewlett Packard);  
The Unscrambler, versão 6.11 (CAMO A/S).

### 3.2 Reagentes e soluções

A água utilizada nos ensaios foi destilada, deionizada e purificada por um sistema Milli-Q. A solução padrão estoque de Fe(III) 100 mg L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da dissolução de ferro em pó em uma mistura de 2 mL de ácido clorídrico e 5 mL de ácido nítrico concentrados e o volume foi completado com água em balão volumétrico de 1000 mL. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de

alíquotas retiradas desta solução estoque de Fe(III), assim como de uma solução padrão estoque de Al(III)  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , preparada a partir de solução padrão de Al(III)  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A solução aquosa de violeta de pirocatecol (VPC) 10 mM (Aldrich, EUA) foi preparada pela dissolução de 0,4 g de corante em 100 mL de água. A solução foi armazenada em temperatura de  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo efetiva por 3 meses ao abrigo da luz. A solução tampão de hexametilenotetramina (HMTA) 0,6 M (pH 6,1) foi preparada dissolvendo-se 8,4 g do reagente em 100 mL de água, sendo mantida sob refrigeração até o uso.

### **3.3 Controle da contaminação**

Para garantir uma superfície livre de contaminação por Al(III), apenas materiais plásticos foram empregados nas análises. Todos os materiais foram deixados por, pelo menos, 48 h em solução 10% de  $\text{HNO}_3$  em etanol (v/v) e lavados abundantemente com água purificada imediatamente antes do uso. Todo o preparo das amostras foi realizado em uma câmara de fluxo laminar Classe 100 para evitar contaminação pelo ar.

### **3.4 Coleta de dados por EAM**

As medidas de absorvância foram realizadas na faixa de comprimentos de onda de 190 a 1100 nm com resolução espectral de 1 nm e 1 cm de percurso ótico em cubetas de quartzo. Todos os dados espectrais coletados através do *software* HP UV-Visible ChemStations foram convertidos para formato DX e importados pelo *software* The Unscrambler. Em seguida, trataram-se os dados utilizando-se os métodos PLS e PCR.

### **3.5 Formação dos complexos de Al(III)-VPC e Fe(III)-VPC**

No preparo destas soluções, foram usados frascos plásticos volumétricos de polietileno de 10 mL. Para as medidas espectrofotométricas, utilizaram-se os parâmetros de leitura especificados no item 2.4. Os espectros foram coletados usando-se, como branco, uma solução do complexante em presença de tampão, em condições específicas, descritas abaixo, para cada caso.

As condições experimentais empregadas, como pH, solução tampão e tempo de complexação se basearam em dados de literatura publicados anteriormente [20, 22].

#### **3.5.1 Ensaios para a formação do complexo Al(III)-VPC**

Volumes adequados de solução padrão estoque Al(III)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  foram utilizados para obter-se soluções de trabalho com concentrações de 0,2 a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Al(III), adicionando-se água, seguido de 0,2 mL de VPC 10 mM e tamponamento com 1,0 mL de HMTA, completando-se o volume com água a 10 mL. As medidas espectrofotométricas foram executadas imediatamente após o preparo das soluções para a verificação da linearidade do sistema.

#### **3.5.2 Ensaios para a formação do complexo Fe(III)-VPC**

Da mesma forma, prepararam-se soluções de trabalho com concentrações de 0,2 a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Fe(III), adicionando-se VPC e solução tampão, completando-se o volume com água a 10 mL. As medidas espectrofotométricas foram executadas imediatamente após o preparo das soluções para a verificação da linearidade do sistema.

### **3.6 Ensaios para a escolha das condições experimentais ideais para Al(III)/Fe(III)-VPC**

No preparo destas soluções, foram usados frascos plásticos volumétricos de polietileno de 10 mL. Os dados espectrais foram coletados conforme os parâmetros descritos no item 2.4, usando-se como branco, uma solução do complexante VPC em presença de tampão HMTA, em condições específicas para cada ensaio.

#### **3.6.1 Concentração do complexante VPC**

Para a verificação da concentração ideal de VPC, foram preparadas soluções em meio aquoso contendo misturas binárias de Al(III) e Fe(III), abrangendo uma faixa de concentrações de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Aleatoriamente, foram escolhidas as seguintes misturas dos analitos: 0,2 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,2 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 1); 0,2 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,8 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 2); 0,4 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,4 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 3); 0,4 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,6 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 4); 0,6 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,6 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 5); 0,6 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,8 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 6); 0,8 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,4 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 7); 0,8 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 8); 1,0 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 9).

Adicionou-se 0,2 mL de VPC nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5,0 e 10 mM. Adicionou-se, também, um volume fixo de 1,0 mL de solução tampão HMTA 0,6 M e completou-se o volume a 10 mL com água. As medidas espectrofotométricas foram executadas após 2 h do preparo das soluções.

#### **3.6.2 Tempo de repouso para complexação**

A fim de observar-se o tempo ideal de repouso das soluções previamente à coleta dos dados espectrais, prepararam-se soluções contendo misturas binárias de Al(III) e Fe(III), abrangendo uma faixa de concentrações de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> e adicionadas de 0,2 mL de VPC 10 mM e 1,0 mL de solução tampão HMTA 0,6 M, completando-se o volume final a 10 mL com água.

Aleatoriamente, foram escolhidas as seguintes misturas dos analitos: 0,2 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,2 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 1); 0,4 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,4 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 2); 0,8 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 0,8 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 3); 1,0 mg L<sup>-1</sup> Al(III) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> Fe(III) (Amostra 4).

Foram executadas medidas espectrofotométricas nos seguintes tempos de repouso: 0; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 min.

### **3.7 Calibração Multivariada aplicada à determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) com VPC**

#### **3.7.1 Análise de Componentes Principais (PCA)**

Para análise exploratória dos dados, 25 misturas binárias dos analitos, com concentrações individuais na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas em solução aquosa e adicionadas de VPC e solução tampão HMTA. Os dados espectrais foram submetidos ao PCA, previamente ao desenvolvimento dos modelos PLS e PCR. Similarmente, prepararam-se 25 misturas binárias dos analitos em soluções pré-hemodiálise para a coleta dos dados espectrais e tratamento por PCA.

Foram analisados dados centrados e não centrados na média a fim de comparação dos resultados.

#### **3.7.2 Métodos de Regressão**

Vinte e cinco misturas binárias dos analitos, com concentrações individuais na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas em solução aquosa e adicionadas de 0,2 mL de VPC e 1,0 mL de solução tampão HMTA. Treze soluções foram usadas como matriz de calibração e 14 soluções foram usadas como grupo de predição.

Uma outra matriz, constituída por 25 misturas binárias dos analitos em solução pré-hemodiálise, foi preparada similarmente. Da mesma forma, 13 soluções constituíram o grupo de calibração e 14, o grupo de predição.

Foram feitas medidas espectrofotométricas 120 minutos após o preparo das soluções. Os modelos PLS e PCR foram estudados para cada matriz. Foram

analisados 2 grupos distintos de dados espectrais (dados de absorvância de 910 comprimentos de onda por amostra e dados de absorvância de 580 comprimentos de onda por amostra).

As misturas binárias empregadas na construção dos modelos de calibração estão reunidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Misturas binárias dos analitos Al(III) e Fe(III) empregadas na construção do modelo de calibração para soluções aquosas e soluções pré-hemodiálise.

<b>Al(III) adicionado mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Fe(III) adicionado mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Amostra</b>
0,20	0,20	Al2Fe2
0,20	0,60	Al2Fe6
0,20	0,80	Al2Fe8
0,40	0,20	Al4Fe2
0,40	0,40	Al4Fe4
0,40	0,80	Al4Fe8
0,60	0,40	Al6Fe4
0,60	0,80	Al6Fe8
0,80	0,20	Al8Fe2
0,80	0,60	Al8Fe6
1,00	0,20	Al10Fe2
1,00	0,40	Al10Fe4
1,00	1,00	Al10Fe10

### 3.7.3 Aplicação a amostras de fluido pós-hemodiálise

As amostras reais utilizadas neste trabalho foram cedidas por um centro de nefrologia da cidade de Santa Maria/RS. O método proposto foi aplicado à quantificação simultânea dos analitos em 6 amostras de fluido pós-hemodiálise coletadas de 6 pacientes renais em um período de 4 semanas. Para a construção de

um grupo independente para a validação do método, várias amostras foram coletadas de cada paciente e uma mistura das mesmas foi usada.

Um fator de diluição de 1:10 foi empregado para o preparo das amostras de fluido pós-hemodiálise. Adicionou-se 0,2 mL de VPC e 1,0 mL de solução tampão HMTA a cada solução e o volume foi completado com água a 10 mL em frascos de polietileno. Um intervalo de 120 minutos antes da coleta dos dados espectrais foi necessário para o completo desenvolvimento da cor.

Medidas por voltametria adsortiva de redissolução (*Adsorptive Stripping Voltammetry*, AdSV) foram usadas como método comparativo, através da complexação de Al(III) e Fe(III) ao VSRS 0,5 mM. As soluções foram previamente aquecidas por 10 minutos em temperatura de 90 °C para acelerar a reação entre Al(III) e VSRS [1].

Os voltamogramas foram coletados com o eletrodo de trabalho de mercúrio operando no modo estacionário (*Hanging Mercury Drop Electrode*, HMDE) em uma faixa de potenciais de -100 a -800 mV. As medidas foram obtidas usando-se um potencial de adsorção de -100 mV (5 s), com amplitude de pulso de -50 mV e varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>. Um eletrodo auxiliar de platina foi usado e os potenciais foram medidos em relação a um eletrodo referência de Ag/AgCl/KCl 3 M. O volume usado na célula foi de 10 mL. As medidas foram executadas em temperatura de 20 ± 3 °C.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Formação dos complexos dos analitos com VPC

Em estudo publicado anteriormente [37], os reagentes VPC, ECR e CAS foram investigados de acordo com suas capacidades de formar complexos com Al(III). Bandas de absorção sobrepostas foram observadas em todos os casos. No entanto, uma melhor resolução entre bandas foi obtida com VPC. Por este fato, o reagente VPC foi escolhido para a determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) no presente trabalho. Segundo Hawke [37], VPC reage preferencialmente com Al(III) quando comparado a ECR e CAS.

O complexante VPC e o tampão HMTA foram amplamente testados para a formação de complexos entre Al(III) e VPC, em pH ideal 6,1 [26, 28, 35, 37, 39]. De acordo com estas informações, foram preparadas soluções dos analitos em VPC e tampão HMTA para as medidas espectrofotométricas. Em um primeiro momento, as soluções de VPC e HMTA foram testadas com base nas condições publicadas [28, 35, 37].

Foram obtidos dados de absorvância para o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) para Al(III)-VPC e Fe(III)-VPC. As curvas de calibração univariadas, para cada sistema, estão representadas na Figura 2.

Considerando a complexidade das amostras de fluido pós-hemodiálise que, além de apresentarem alta concentração salina (força iônica ca. 0,2 M) [75], contêm compostos orgânicos excretados pelos pacientes, foram calculados os valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para Al(III)-VPC e para Fe(III)-VPC neste meio. Os valores de  $\epsilon$ , considerados como a inclinação da reta determinada por regressão linear, foram  $2,4 \times 10^4$  e  $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Tais valores conferem com dados publicados em água pura [35, 37], verificando-se que mudanças na sensibilidade das medidas em fluidos pós-hemodiálise não foram observadas. Os dados utilizados para o cálculo de  $\epsilon$  estão na Tabela 3.

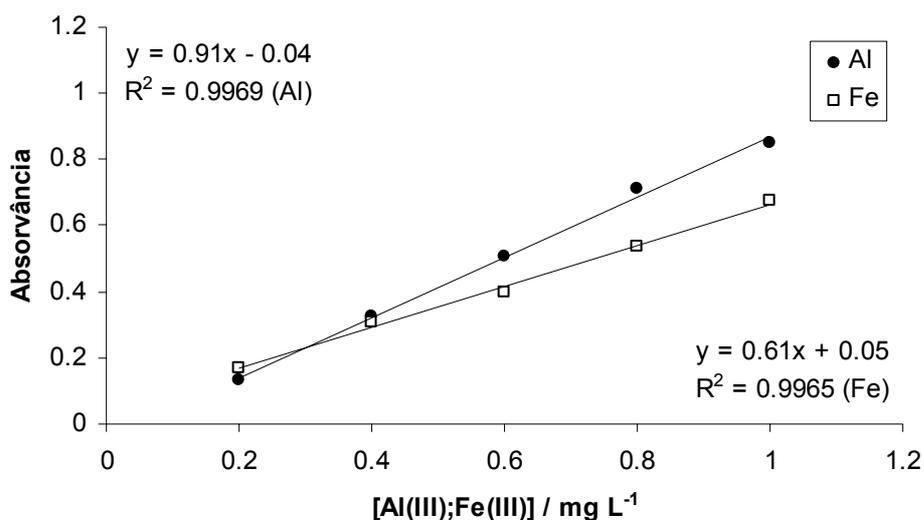


Figura 2. Curva de calibração univariada para Al(III)-VPC ( $\lambda_{\max}$  570 nm) e Fe(III)-VPC ( $\lambda_{\max}$  607 nm) ( $n=3$ ).

Tabela 3 - Dados utilizados para o cálculo de  $\epsilon$  em amostras de fluido pós-hemodiálise.

Al(III) mg L <sup>-1</sup>	Al(III) M	A 570 nm	Fe(III) mg L <sup>-1</sup>	Fe(III) M	A 607 nm
0,2	$7,406 \times 10^{-6}$	0,13063	0,2	$3,584 \times 10^{-6}$	0,17123
0,4	$1,481 \times 10^{-5}$	0,32724	0,4	$7,168 \times 10^{-6}$	0,30704
0,6	$2,222 \times 10^{-5}$	0,50742	0,6	$1,075 \times 10^{-5}$	0,40071
0,8	$2,962 \times 10^{-5}$	0,70982	0,8	$1,434 \times 10^{-5}$	0,53848
1,0	$3,703 \times 10^{-5}$	0,84949	1,0	$1,792 \times 10^{-5}$	0,67295
$y = 24.579,2x - 0,041$			$y = 34.451,7x + 0,048$		
$\epsilon = 2,4 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$			$\epsilon = 3,4 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$		

Os valores calculados para  $\epsilon$  são da ordem de 10.000, ou seja, correspondem a transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  encontradas no ligante orgânico VPC (transições eletrônicas de

elétrons em orbitais  $\pi$  – ligações duplas ou triplas - a orbitais excitados livres  $\pi^*$ ) [76].

## **4.2 Ensaio para a escolha das condições experimentais ideais para Al(III)/Fe(III)-VPC**

### **4.2.1 Concentração do complexante VPC**

Quatro valores de concentração de VPC foram investigados com base em trabalhos publicados anteriormente [26, 28, 35, 37, 39]: 0,5; 1,0; 5,0 e 10 mM.

De acordo com Røyset [35], se uma menor concentração de complexante é usada, o sistema pode se tornar muito suscetível a mudanças na cinética da reação causadas por possíveis interferentes. Um excesso molar de VPC frente ao Al(III) é desejável, a fim de minimizar interferências oriundas de ânions que formam complexos com este analito.

O volume adicionado de tampão HMTA 0,6 M (0,2 mL) foi considerado suficiente para a manutenção do pH do meio, em todas as soluções teste. A adição de volumes maiores de HMTA, tais como 2 ou 3 mL, gera valores de absorvância muito elevados para a solução branco, impossibilitando a coleta dos dados das soluções de trabalho e das amostras por EAM [35, 37].

De acordo com a Figura 3, as concentrações 0,5 e 1,0 mM de VPC são insuficientes para a formação dos complexos de Al(III) e Fe(III), a partir de soluções que apresentam concentrações de 0,4 mg L<sup>-1</sup> dos analitos (Amostra 2). As concentrações de 5 e 10 mM de VPC geram uma resposta linear para os valores de absorvância em todas as amostras. No entanto, a concentração de 10 mM garante a formação dos complexos, inclusive em soluções que apresentam uma concentração dos analitos superior a 0,8 mg L<sup>-1</sup> (Amostras 8 e 9). Assim, a partir deste momento, empregou-se uma solução de VPC 10 mM para o preparo das soluções de trabalho.

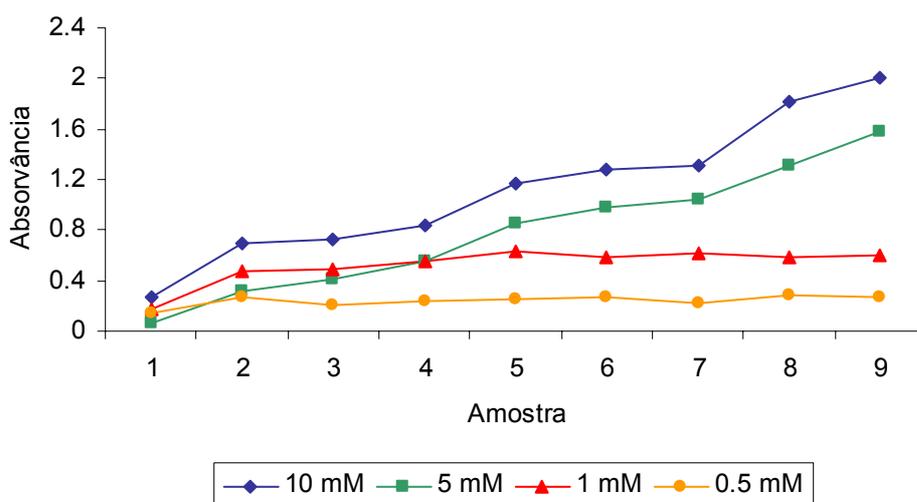


Figura 3. Escolha da concentração ideal de VPC em tampão HMTA (pH 6,1).  $\lambda_{\max}$  584 nm.

#### 4.2.2 Tempo de repouso para complexação

A reação de Al(III) e Fe(III) com AX foi investigada por Poppi e colaboradores [49-50]. Estes estudos mostraram que a reação de AX com Al(III) e Fe(III) em solução aquosa é complexa, visto que as espécies M-AX (M=Al,Fe) podem ser formadas através de vários equilíbrios, todos dependentes do pH e da razão  $[AX]/[M]$ . Também, a cinética de reação é muito lenta, pois um intervalo de 120 a 240 minutos é necessário para o desenvolvimento da cor antes da coleta dos dados.

A Tabela 4 mostra dados de absorvância obtidos em 7 intervalos de tempo para soluções de VPC 10 mM (HMTA, pH 6,1) em 4 amostras contendo misturas binárias dos analitos.

Usando-se VPC como cromóforo, um intervalo de 120 minutos é suficiente para a formação dos complexos, de acordo com os dados apresentados na Tabela 4. Os valores de absorvância relativos às soluções analisadas em um período de repouso de 60 a 120 minutos diferem daquelas analisadas imediatamente após o preparo das soluções. Um tempo de repouso de 120 minutos é suficiente para a formação da cor, uma vez que é garantida a formação dos complexos neste intervalo, inclusive em amostras que apresentam uma maior concentração dos analitos (Amostras 3 e 4 - 0,8 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Os tempos de 150 e 180 minutos são

inadequados, pois os valores de absorvância decrescem para todas as amostras, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Escolha do tempo ideal de complexação para Al(III)/Fe(III)-VPC (pH 6,1).  $\lambda_{\max}$  584 nm.

Tempo (min)	Absorvância (584 nm)			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
0	0,215	0,581	1,410	1,612
30	0,251	0,604	1,429	1,621
60	0,253	0,622	1,428	1,625
90	0,254	0,647	1,445	1,659
<b>120</b>	<b>0,267</b>	<b>0,671</b>	<b>1,485</b>	<b>1,669</b>
150	0,249	0,658	1,441	1,641
180	0,241	0,641	1,324	1,524

A cor intensa que apresentam algumas soluções de complexos é devida a processos intensos de transferência de carga. Estes processos são, simplesmente, os movimentos dos elétrons do íon metálico ao ligante ou vice-versa.

A solução contendo o complexante VPC livre tem coloração marrom. Quando adicionam-se os analitos, a solução passa a apresentar cor verde escuro a azul profundo, de acordo com a concentração dos analitos, devido à formação dos complexos Al(III)/Fe(III)-VPC.

#### 4.2.3 Análise espectral

VPC reage com Al(III) e Fe(III) e produz um complexo com comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) em 584 nm em tampão HMTA (pH 6,1). Em valores de pH inferiores a 6,1, não há formação dos complexos. Assim,  $\lambda_{\max}$  decresce com o decréscimo de valores de pH. Isto se deve ao fato de que, em valores menores de

pH, os grupos doadores do cromóforo não estão desprotonados; logo, não é possível a coordenação dos metais ao ligante. Para uma faixa de pH de 6,0 a 6,2, os complexos de Al(III) e Fe(III) com VPC apresentam valores estáveis de absorvância em concentração constante.

A determinação simultânea de Al(III) e Fe(III), usando-se medidas em um único comprimento de onda, não é possível, pois os complexos mostram bandas de absorção sobrepostas na faixa espectral de 220 a 800 nm.

Para quantificar Al(III), a espécie interferente mais crítica é Fe(III), que interfere formando complexos coloridos com a maioria dos complexantes usados para Al(III). Os complexos Al(III)-VPC e Fe(III)-VPC mostram espectros muito semelhantes, sendo que, para uma determinação univariada, agentes mascarantes são necessários. Cloridrato de hidroxilamina e *orto*-fenantrolina estão associados aos melhores resultados [26-27], pois cloridrato de hidroxilamina reduz Fe(III) a Fe(II) e *orto*-fenantrolina complexa as espécies Fe(II). VPC complexa Al(III) [28-29]. O ácido ascórbico também pode ser usado como agente mascarante, mas não suprime satisfatoriamente a interferência do Fe(III) [37].

Para determinar espécies metálicas por EAM, fazendo-se o uso de cromóforos, o ajuste do pH, assim como a solução tampão, são fatores que devem ser considerados [37]. Devido aos melhores resultados obtidos na determinação de Al(III) em tampão HMTA, prefere-se este ao tampão ácido acético/acetato de sódio em pH próximo a 6,0. A solução tampão HMTA tem sido usada [26, 28, 35, 37, 39] para o controle do pH na análise de Al(III) com cromóforos.

A dependência entre o pH e a formação dos complexos é resultante de diversos fatores. A complexação a Al(III) deve se intensificar à medida que os grupos doadores dos cromóforos são desprotonados com o aumento do pH. Ainda, em valores altos de pH a estequiometria dos complexos (assim como  $\lambda_{\max}$ ) pode ser alterada [37].

O espectro de absorção molecular do reagente VPC está representado na Figura 4 (curva a), usando-se água como branco. A curva b mostra o espectro de uma amostra de fluido pós-hemodiálise, usando-se solução pré-hemodiálise como branco. O fluido pós-hemodiálise, sem a adição de VPC, absorve fortemente na faixa espectral de 200 a 300 nm, onde VPC livre e os complexos também mostram bandas sobrepostas. A intensidade da banda varia de acordo com a amostra coletada de cada paciente. A presença de sinais espectrais na região do ultravioleta

está relacionada a compostos orgânicos excretados pelo paciente em cada sessão de hemodiálise.

O espectro de absorção molecular dos complexos Al(III)/Fe(III)-VPC em tampão HMTA (pH 6,1) está representado na Figura 4 pela curva c, para uma solução contendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Al(III) e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Fe(III). Neste experimento, usou-se como branco uma solução de VPC 10 mM em tampão HMTA.

Conforme se constata, o aparecimento de um pico de absorção na região de 580 nm é atribuído à formação dos complexos analitos-VPC, uma vez que este sinal não está presente no espectro do complexante na forma livre (curva a).

Em meio tamponado (HMTA, pH 6,1), VPC e os complexos Al(III)-VPC e Fe(III)-VPC absorvem em uma faixa espectral de 200 a 790 nm. Usando-se VPC como complexante em solução tampão HMTA como branco, uma banda espectral com máximo em 480 nm mostra valor negativo, pois o VPC livre absorve fortemente na faixa espectral de 380 a 500 nm, com menor influência na absorção dos complexos Al(III)/Fe(III)-VPC. Comparativamente, na faixa espectral de 240 a 340 nm, valores positivos são obtidos, pois VPC livre absorve menos do que os respectivos complexos.

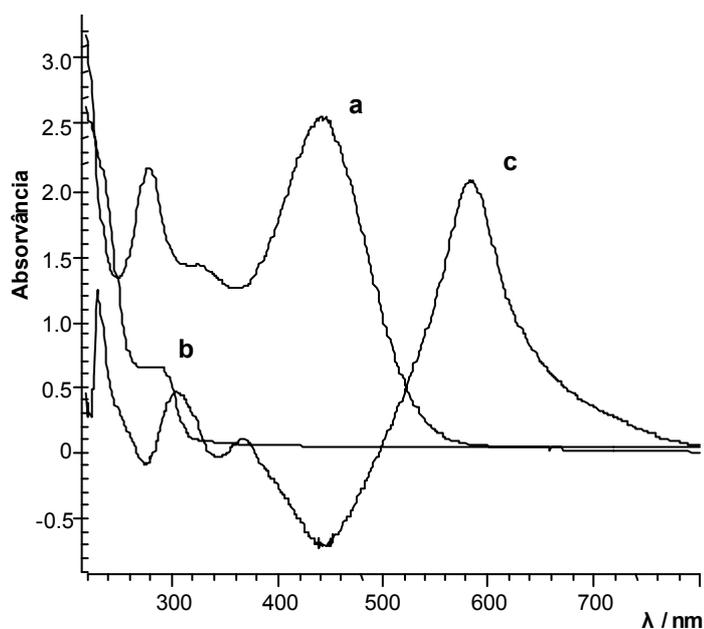


Figura 4. Espectro de absorção molecular: (a) Reagente VPC 10 mM. (b) Fluido pós-hemodiálise. (c) Complexos Al(III)/Fe(III)-VPC (tampão HMTA, pH 6,1) para  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Al(III) e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Fe(III).

Os espectros de absorção molecular de 25 misturas binárias de Al(III) e Fe(III), com concentrações individuais na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, em VPC e HMTA (pH 6,1) estão representados na Figura 5. Uma solução de VPC em presença de HMTA foi usada como branco. Pode-se observar a severa sobreposição dos espectros na faixa de 200 a 800 nm. Assim, faz-se necessário o uso de uma série de combinações dos analitos para a adequada representação dos dados.

Os espectros dos complexos mostram, em pH 6,1, um ponto isobéstico em torno de 500 nm. Algumas mudanças no  $\lambda_{\max}$  e a formação do ponto isobéstico indicam uma seqüência de reações. Como VPC tem dois sítios de complexação, os complexos formados podem existir em um equilíbrio simultâneo com Al(III) e Fe(III). Assim, espécies como Al(III)-VPC, Fe(III)-VPC e Al(III)/Fe(III)-VPC são possíveis. A formação de uma espécie intermediária é seguida da conversão a um complexo 1:1 ( $\lambda_{\max}$  584 nm) [37].

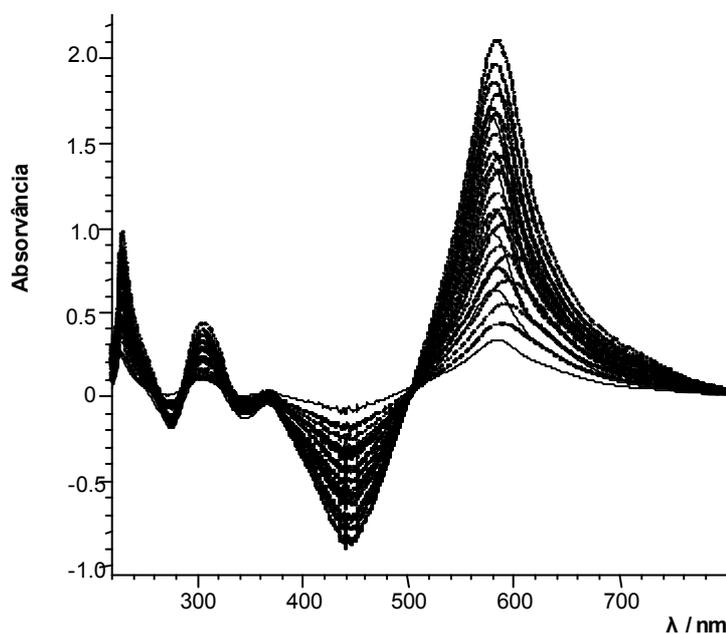


Figura 5. Espectro de absorção molecular dos complexos Al(III)/Fe(III)-VPC (tampão HMTA, pH 6,1). As concentrações de Al(III) e Fe(III) variam de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> nas misturas binárias dos analitos.

### **4.3 Calibração Multivariada aplicada à determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) com VPC**

Como resultado de um planejamento experimental [72], foram usados, para cada analito, cinco níveis para o fator concentração: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Desta forma, tem-se um fatorial 5 x 5, ou seja, um número mínimo de 25 soluções de misturas binárias dos analitos deve ser utilizado para a obtenção de um planejamento ortogonal completo.

#### **4.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)**

##### **4.3.1.1 Dados não centrados na média**

Em um primeiro momento, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada a 25 misturas binárias dos analitos em meio aquoso. PCA foi executado com os dados espectrais não centrados na média, usando-se os valores de absorvância de 910 comprimentos de onda. Toda a variabilidade dos dados foi explicada por PC1 e PC2 (99%). O gráfico de scores está representado na Figura 6.

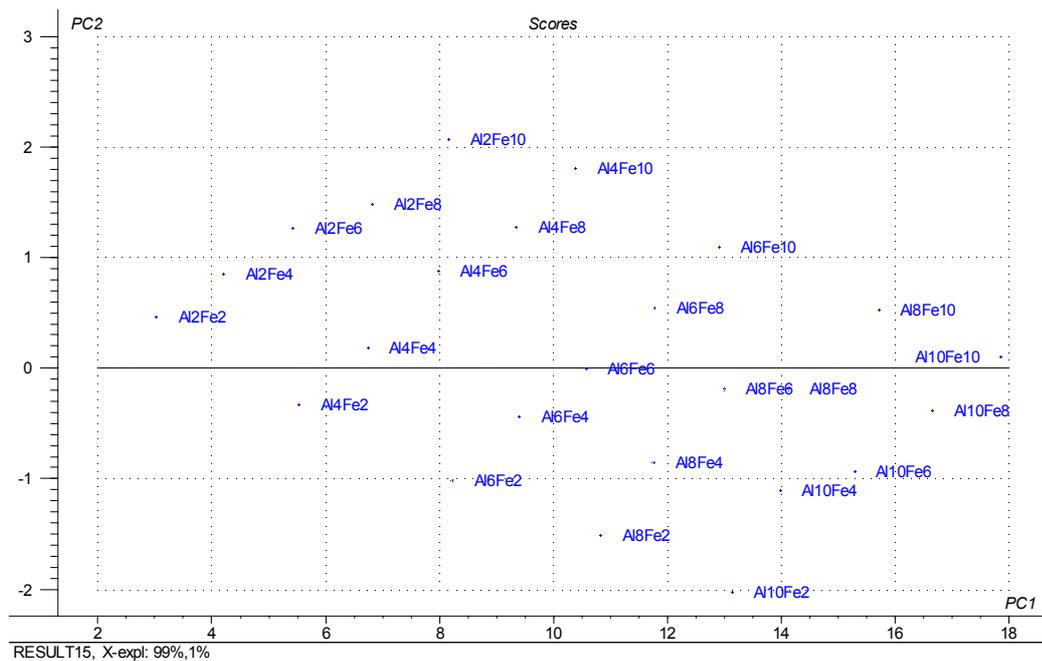


Figura 6. PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PCA para os dados espectrais não centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em soluções aquosas.

Utilizando-se amostras de misturas binárias dos analitos em soluções pré-hemodiálise (Figura 7), foram observadas algumas pequenas diferenças nas coordenadas das amostras em relação aos PC's para algumas misturas binárias dos analitos. Este fato pode estar relacionado à presença do meio salino nas soluções analisadas, o que pode influenciar a redefinição dos eixos pelas projeções do PCA e comprometer a distribuição das amostras nos PC's. Ainda, a escolha de não centrar os dados na média pode impossibilitar a correta obtenção dos dados [45].

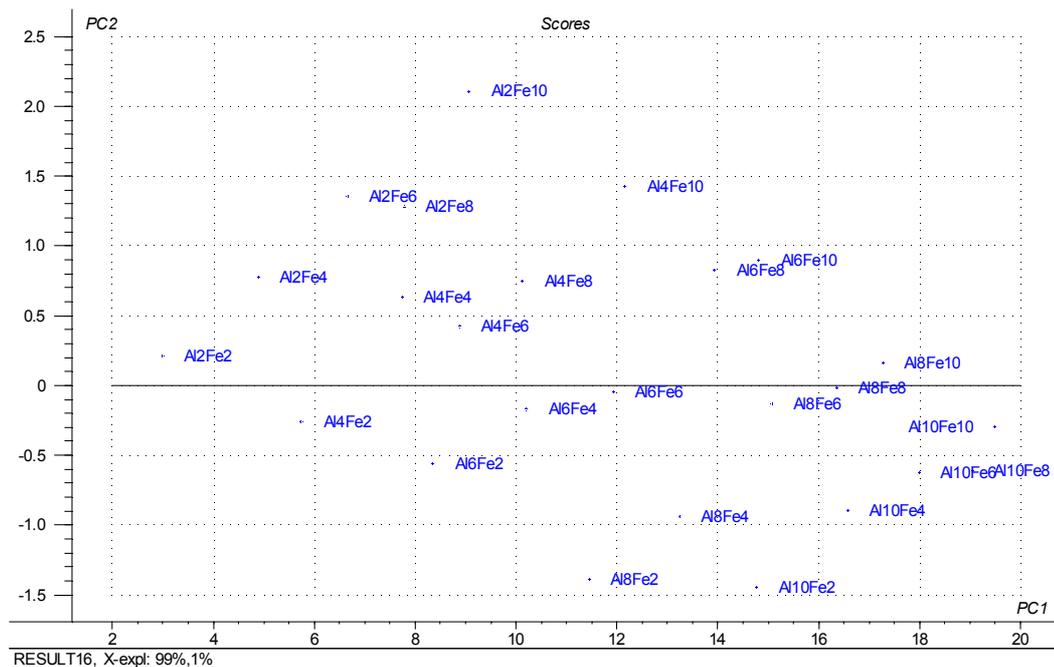


Figura 7. PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PCA para os dados espectrais não centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em soluções pré-hemodiálise.

#### 4.3.1.2 Dados centrados na média

PCA foi executado com os dados espectrais centrados na média usando-se os valores de absorvância de 910 comprimentos de onda. Observando-se um gráfico dos *scores* (Figura 8) de 25 misturas binárias dos analitos em meio aquoso, obtido através do PCA, percebe-se que o componente principal 1 (PC1) é intimamente relacionado à concentração de Al(III), assim como PC2 à concentração de Fe(III). Praticamente toda a variabilidade dos dados foi explicada por PC1 e PC2 (93%).

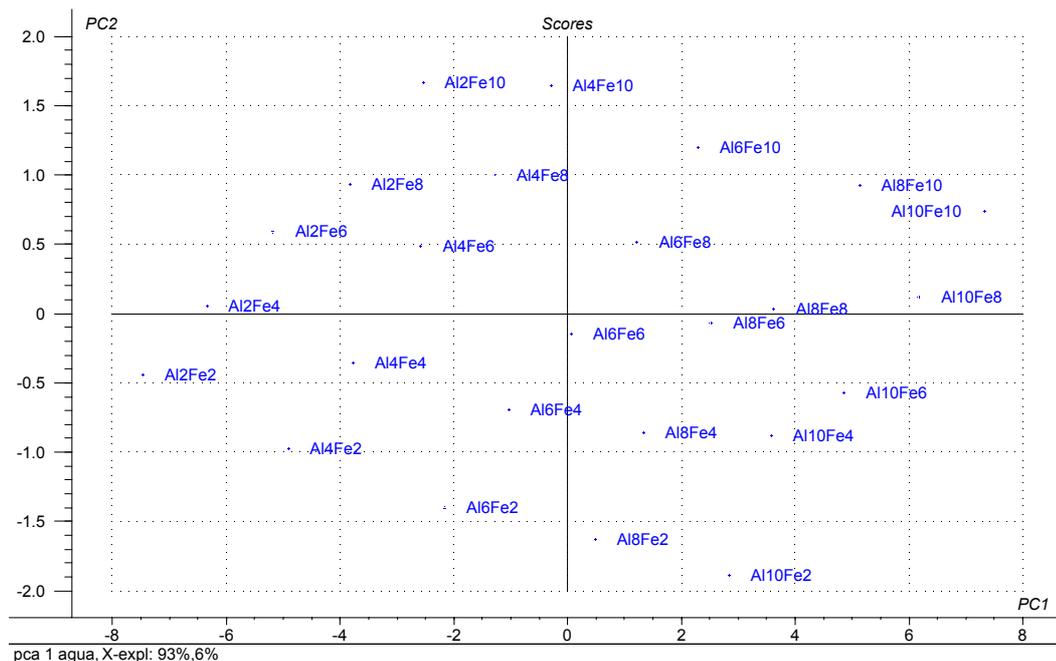


Figura 8. PC1 vs. PC2. Gráfico dos *scores* obtido por PCA para os dados espectrais centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em soluções aquosas.

Similarmente, utilizando-se amostras de misturas binárias em soluções pré-hemodiálise (Figura 9), não foram observadas significativas diferenças entre os gráficos de *scores*, comparando-se as Figuras 8 e 9. PC1 é relacionado à concentração de Al(III), assim como PC2, à concentração de Fe(III).

Como o gráfico de *scores* representa as coordenadas de cada amostra nos PC's, podem-se utilizar modelos de calibração, tanto em soluções aquosas, como em meio salino, sem influência sobre os valores de predição das concentrações dos analitos em amostras envolvidas no grupo de predição.

Praticamente toda a variância dos dados foi explicada por PC1 e PC2 (95%).

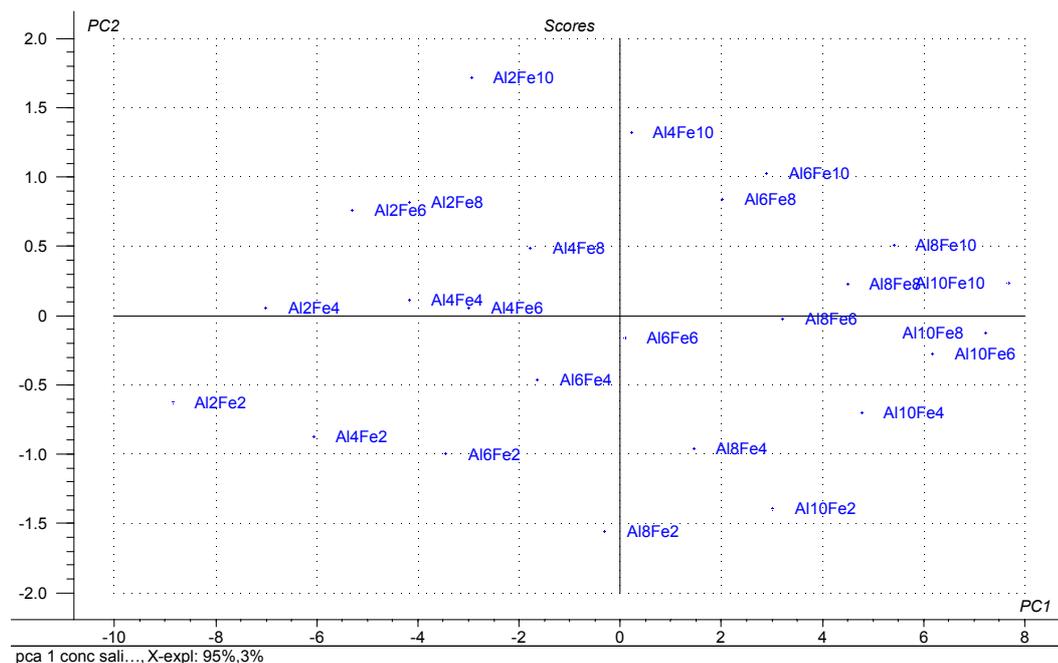


Figura 9. PC1 vs. PC2. Gráfico dos *scores* obtido por PCA para os dados espectrais centrados na média. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em soluções pré-hemodiálise.

Como os gráficos de *scores* obtidos para dados não centrados (Figuras 6 e 7) apresentam algumas diferenças expressivas, o que não foi observado na comparação das Figuras 8 e 9, a opção de centrar os dados na média foi escolhida para o tratamento prévio dos dados espectrais, confirmando a idéia de que dados centrados possibilitam a obtenção de dados ótimos [45].

### 4.3.2 Métodos de Regressão

#### 4.3.2.1 MLR

O método MLR não pôde ser aplicado, uma vez que se usou um número maior de variáveis (comprimentos de onda) do que de amostras. Como a matriz obtida não é quadrada, não poderá ter a sua inversa executada. Conseqüentemente, não há solução para este sistema.

#### 4.3.2.2 PLS

O método PLS para regressão de uma única variável  $y$ , PLS-1, foi empregado no desenvolvimento dos modelos de calibração. Assim, foram desenvolvidos dois métodos PLS-1, um para cada analito. Testou-se também o método PLS-2, que realiza a regressão de duas variáveis simultaneamente, mas melhores resultados foram obtidos com o uso do PLS-1.

Inicialmente, desenvolveu-se o método PLS usando-se dados de absorvância em **910 comprimentos de onda**, na faixa de 190 a 1100 nm com resolução de 1 nm.

Nos métodos PLS-1 desenvolvidos para Al(III) e Fe(III) em **soluções aquosas**, obtiveram-se os gráficos de *scores* representados nas Figuras 10 e 11. Estão representados nos gráficos os componentes principais PC1 e PC2. Observa-se uma distribuição uniforme dos *scores* das amostras em cada PC, o que é esperado, considerando o planejamento ortogonal empregado no preparo das misturas binárias dos analitos. Percebe-se que PC1 é intimamente relacionado à concentração de Al(III), assim como PC2 à concentração de Fe(III).

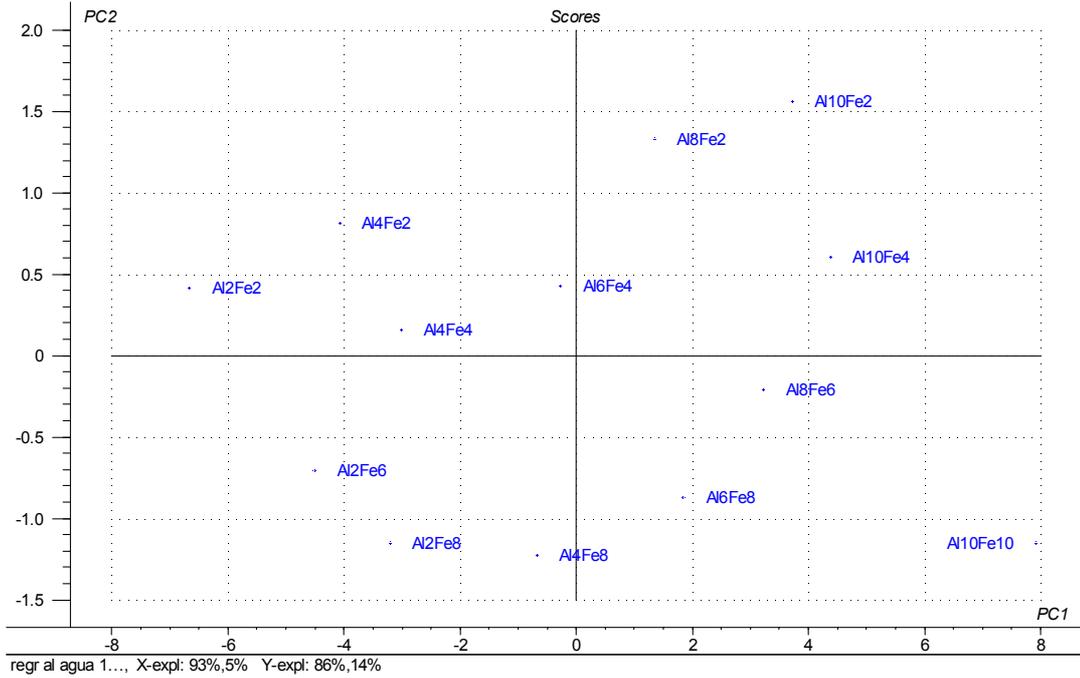


Figura 10. Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em **soluções aquosas**.

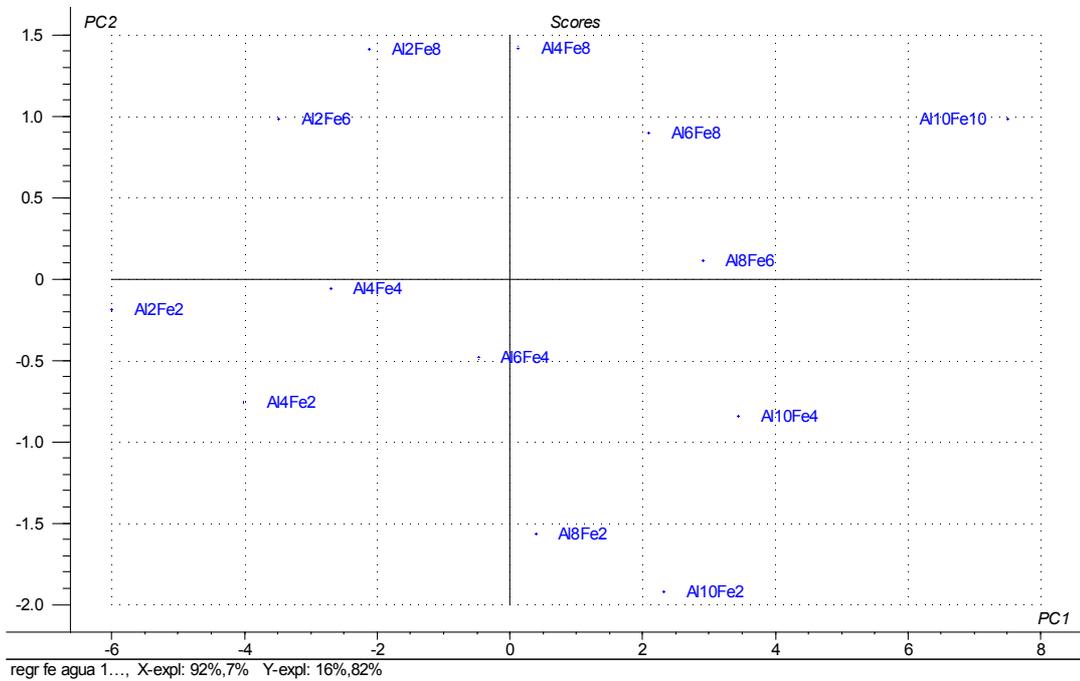


Figura 11. Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais em **soluções aquosas**.

Nas Figuras 12 e 13, observam-se os gráficos de *loadings* para um único PC (PC1) relativos à regressão para Al(III) e Fe(III), respectivamente. Como o gráfico de *loadings* envolvendo todos os PC's é, geralmente, de difícil interpretação, faz-se uma representação unitária de cada PC para tornar possível o seu entendimento.

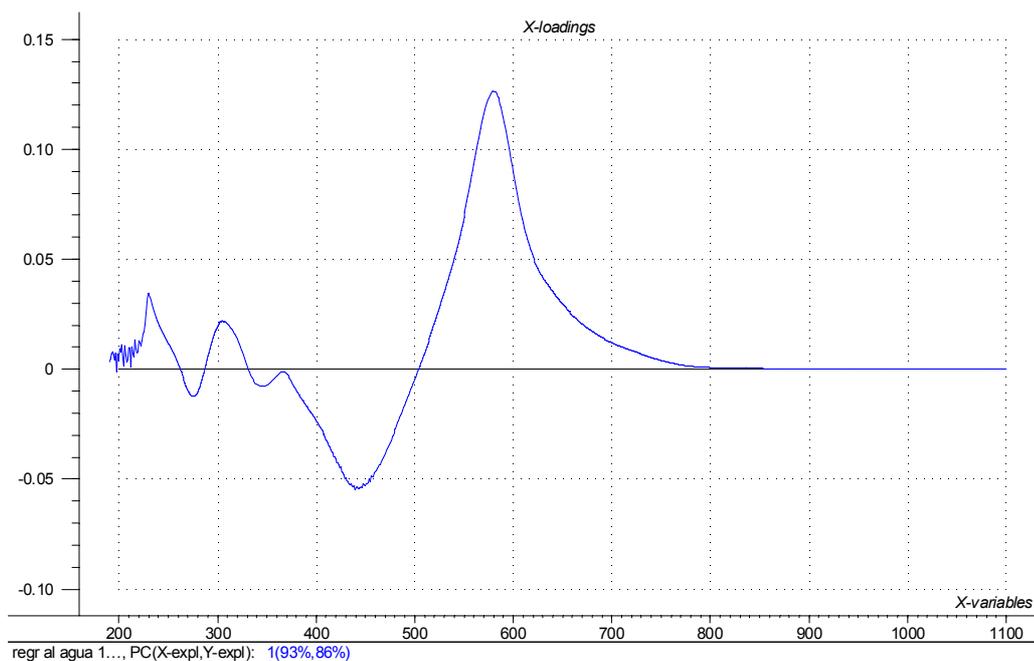


Figura 12. Regressão para Al(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.

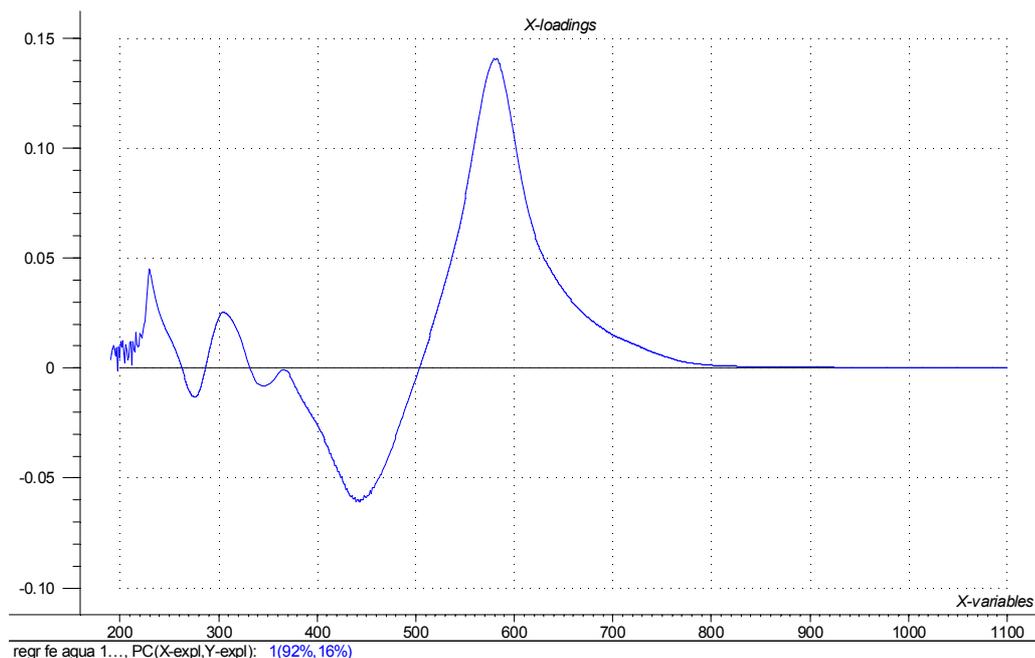


Figura 13. Regressão para Fe(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.

O valor do resíduo, relativo à perda de informação pelas projeções do PCA, foi praticamente nulo para PC3, em ambos os analitos, como pode ser visto na Figura 14. Modelos ideais fornecem valores de resíduo desprezíveis. Assim, foram usados 3 PC's para a confecção dos modelos PLS-1, pois apenas 3 PC's são necessários para explicar quase 100% da variância dos dados em soluções aquosas.

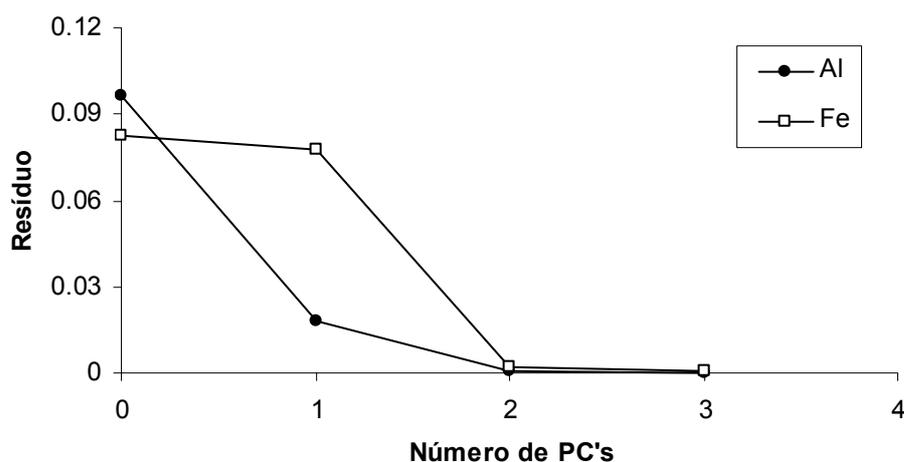


Figura 14. Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1.

Usando 910 dados de absorvância por amostra, as pequenas diferenças entre os espectros foram bem descritas pelo tratamento multivariado, tanto que Fe(III) pôde ser incluído na calibração como analito e não mais como um interferente.

A Figura 15 mostra os parâmetros de regressão, assim como coeficiente angular e linear, em torno de 1 e 0, respectivamente, para soluções aquosas, obtidos através do modelo PLS empregando dados de 910 comprimentos de onda por amostra, centrados na média. O grupo de calibração apresentou RMSEC ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de 0,021 para Al(III) e 0,012 para Fe(III).

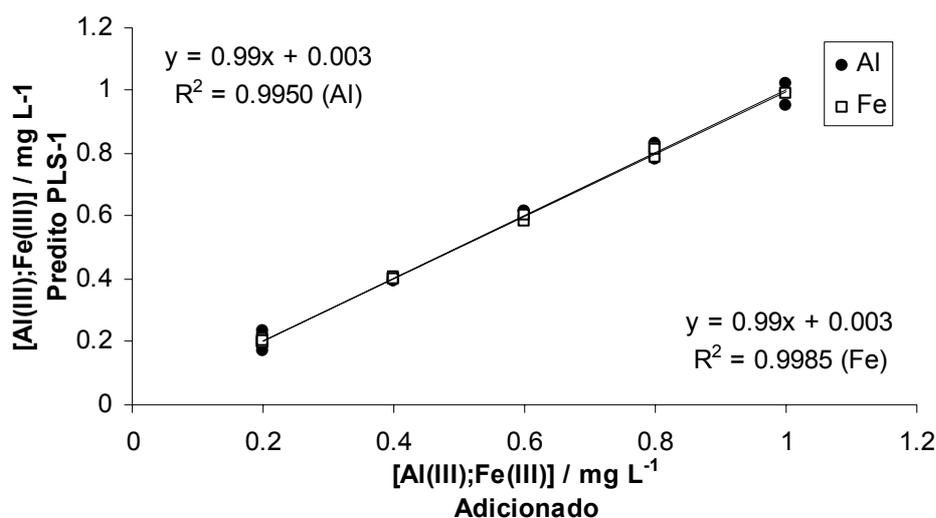


Figura 15. Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções aquosas determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).

No método PLS-1 desenvolvido para Al(III) e Fe(III) em **soluções pré-hemodiálise**, utilizando-se 910 comprimentos de onda por amostra, obtiveram-se os gráficos de scores representados nas Figuras 16 e 17. Estão representados nos gráficos os componentes principais PC1 e PC2. Observa-se a boa distribuição das amostras em cada PC. Percebe-se que, como nas soluções aquosas, PC1 é intimamente relacionado à concentração de Al(III), assim como PC2 à concentração de Fe(III).

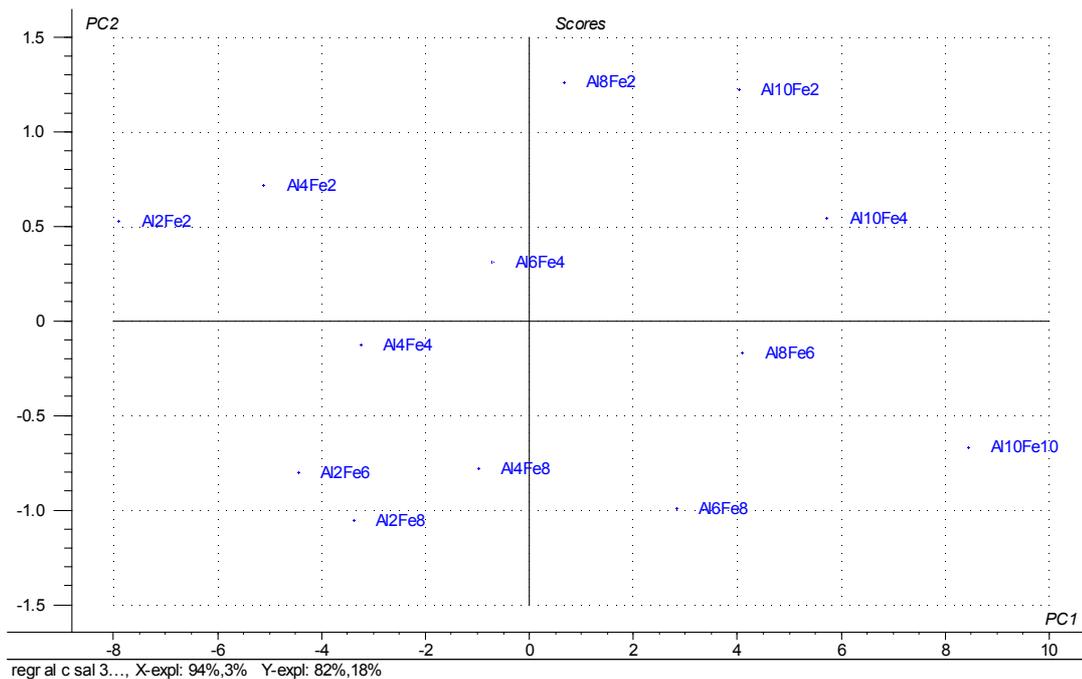


Figura 16. Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em **soluções pré-hemodiálise**.

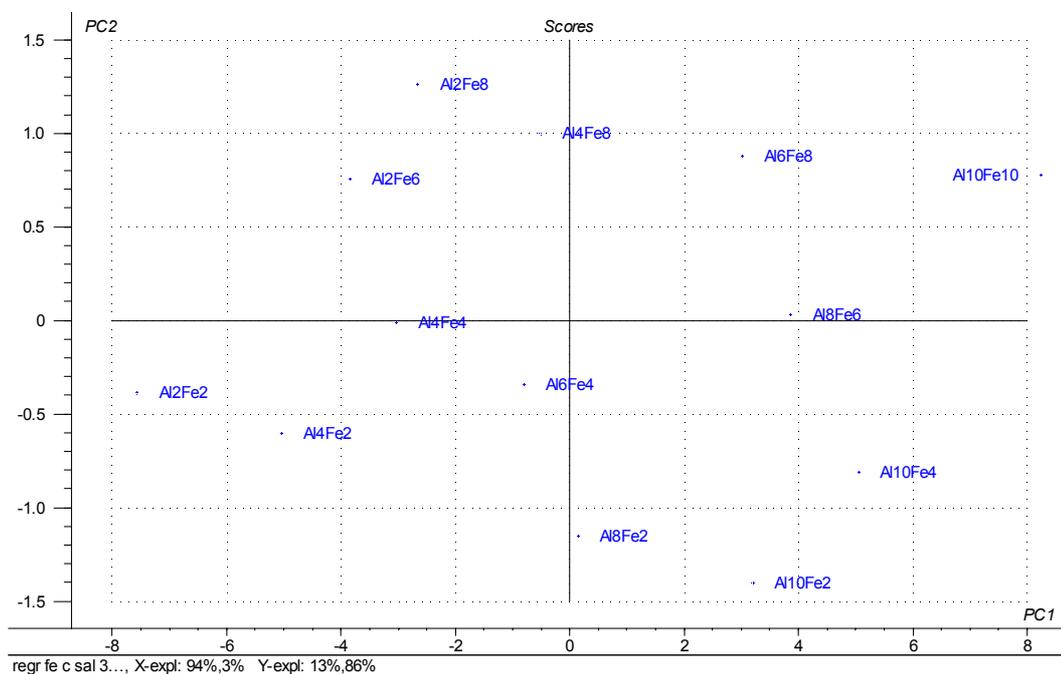


Figura 17. Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais em **soluções pré-hemodiálise**.

Nas Figuras 18 e 19, observam-se os gráficos de *loadings* para um único PC (PC1) relativos à regressão para Al(III) e Fe(III), respectivamente.

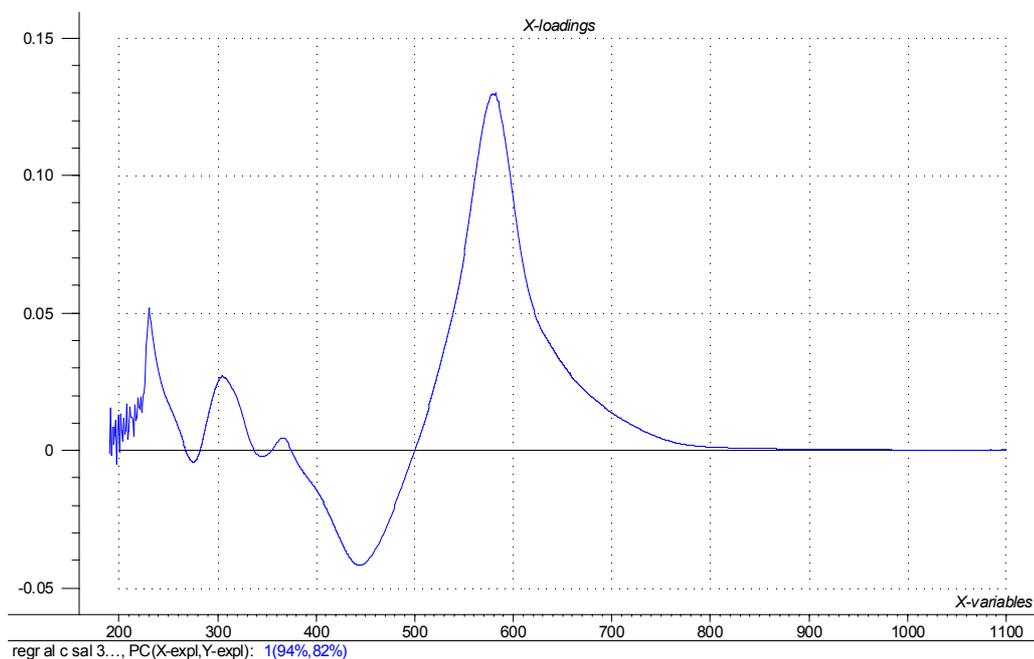


Figura 18. Regressão para Al(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.

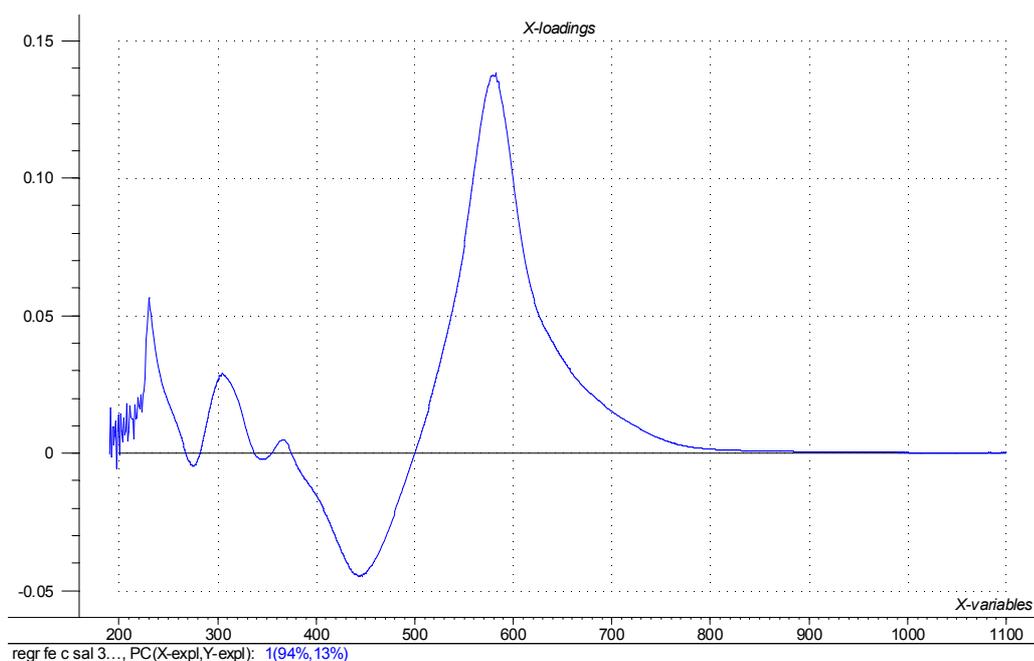


Figura 19. Regressão para Fe(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 910 comprimentos de onda, centrados na média.

O valor do resíduo, relativo à perda de informação pelas projeções do PCA, foi praticamente nulo para PC3, em ambos os analitos, como pode ser visto na Figura 20. Usaram-se 3 PC's para a confecção dos modelos PLS-1, que explicam quase 100% da variância dos dados em soluções pré-hemodiálise.

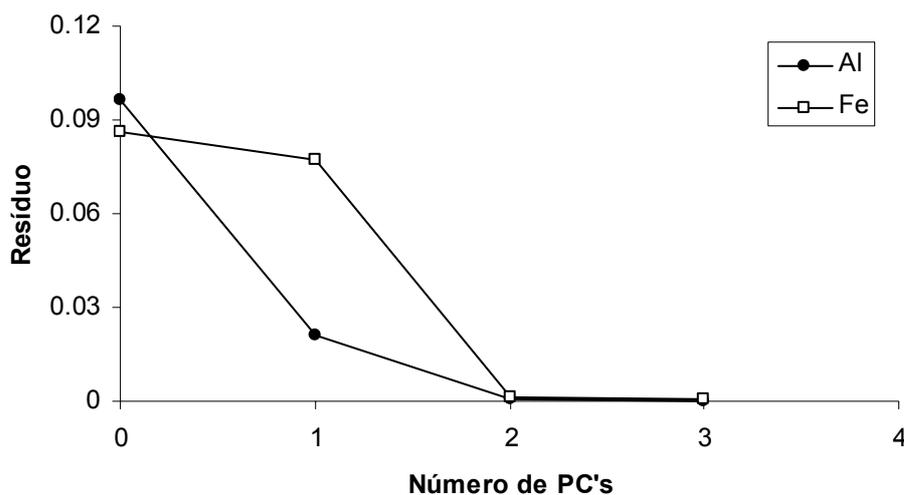


Figura 20. Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1.

A Figura 21 mostra os parâmetros de regressão, assim como coeficiente angular e linear, em torno de 1 e 0, respectivamente, para soluções pré-hemodiálise, obtidos através do modelo PLS empregando dados de 910 comprimentos de onda por amostra, centrados na média. O grupo de calibração apresentou RMSEC ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de 0,013 para Al(III) e 0,022 para Fe(III).

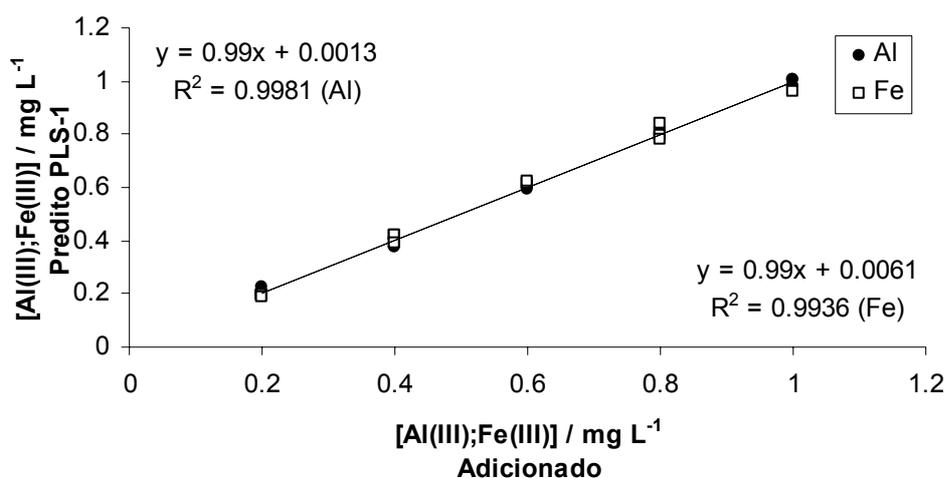


Figura 21. Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções pré-hemodiálise determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).

Em um segundo momento, desenvolveu-se o método PLS usando-se dados de absorvância em **580 comprimentos de onda** por amostra, na faixa de 220 a 800 nm com resolução de 1 nm.

Nos métodos PLS-1 desenvolvidos para Al(III) e Fe(III) em **soluções aquosas**, obtiveram-se os gráficos de *scores* representados nas Figuras 22 e 23. Estão representados nos gráficos os componentes principais PC1 e PC2. Observa-se a boa distribuição das amostras em cada PC. Percebe-se que PC1 é intimamente relacionado à concentração de Al(III), assim como PC2 à concentração de Fe(III), assim como usando-se um conjunto de dados de 910 comprimentos de onda por amostra.

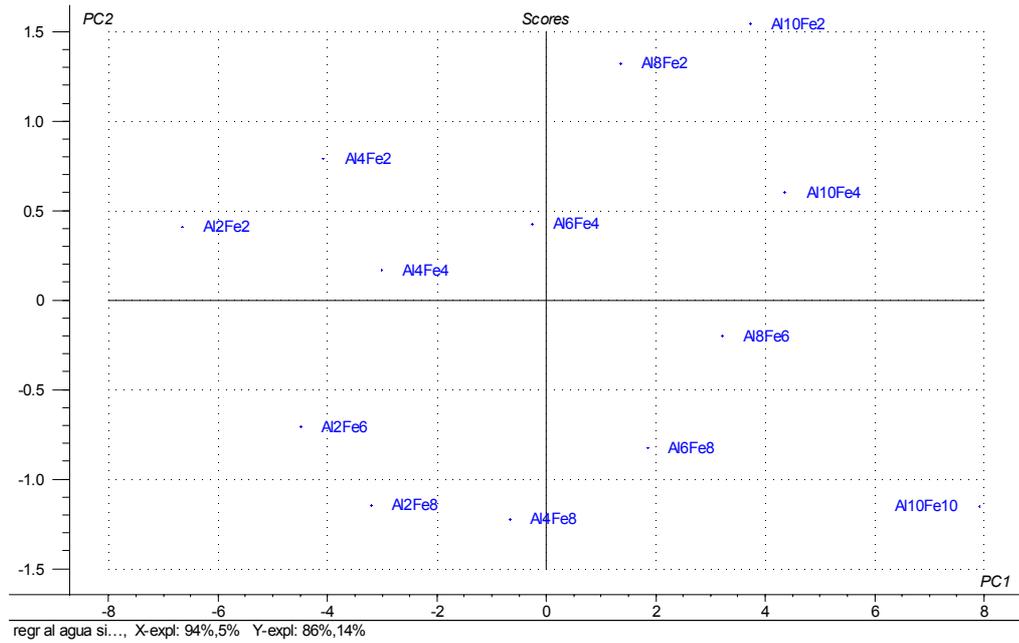


Figura 22. Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em **soluções aquosas**.

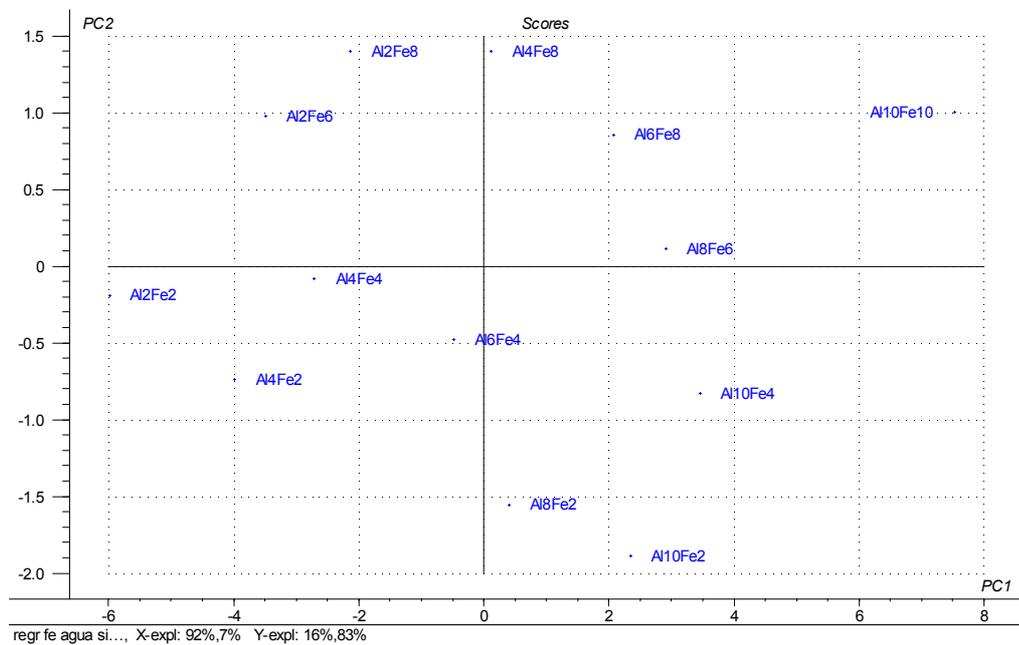


Figura 23. Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais em **soluções aquosas**.

Nas Figuras 24 e 25, observam-se os gráficos de *loadings* para PC1, relativos à regressão para Al(III) e Fe(III), respectivamente.

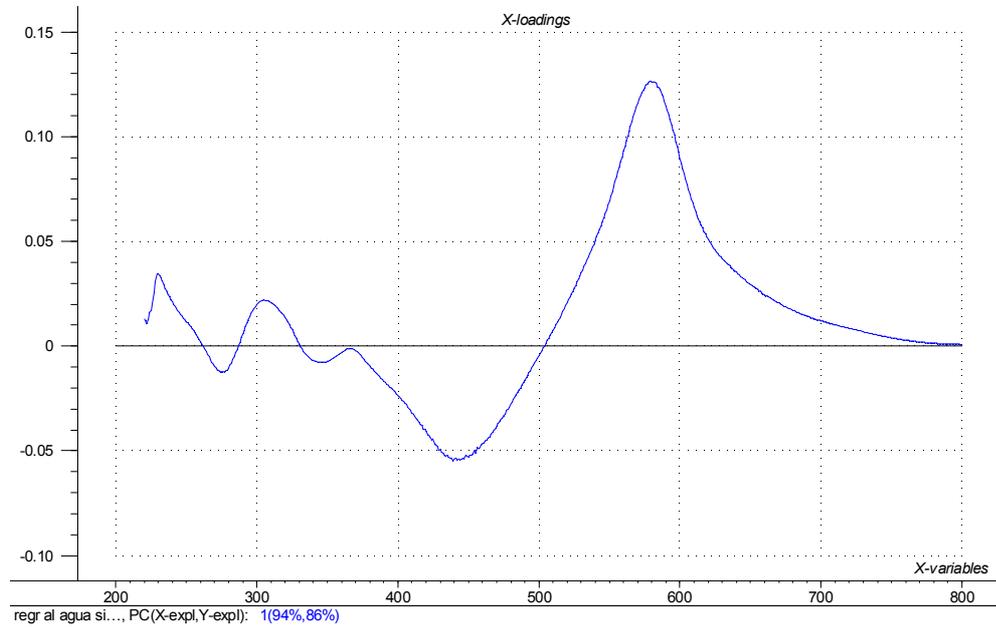


Figura 24. Regressão para Al(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.

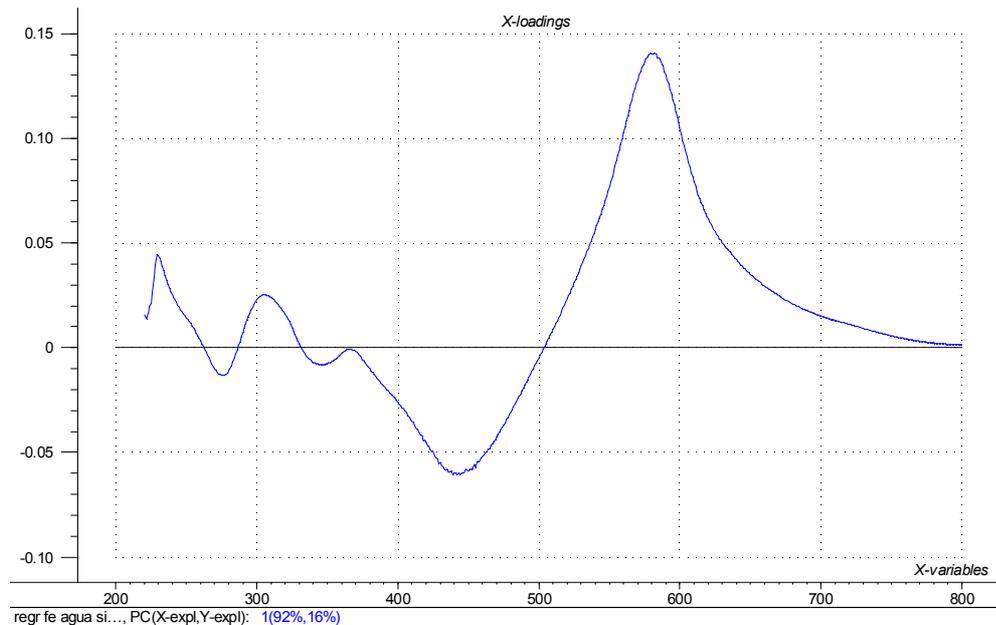


Figura 25. Regressão para Fe(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.

Similarmente aos dados obtidos para 910 comprimentos de onda, o valor do resíduo relativo à perda de informação pelas projeções do PCA foi praticamente nulo para PC3, em ambos os analitos, como pode ser visto na Figura 26. Usaram-se 3 PC's para a confecção dos modelos PLS-1, suficientes para explicar quase 100% da variância dos dados em soluções aquosas.

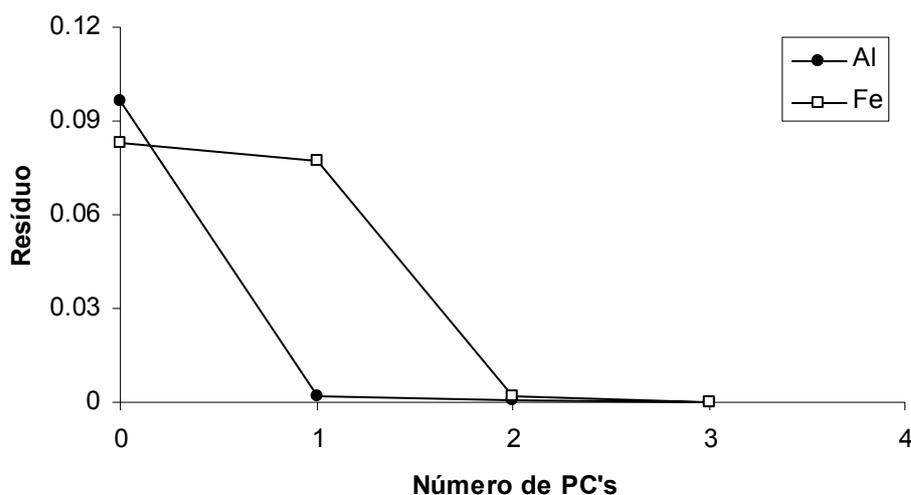


Figura 26. Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1.

Usando-se 580 dados de absorvância por amostra, as pequenas diferenças entre os espectros também foram bem descritas pelo tratamento multivariado. A Figura 27 mostra os parâmetros de regressão, assim como coeficiente angular e linear, para soluções aquosas, obtidos através do modelo PLS empregando dados de 580 comprimentos de onda por amostra, centrados na média. O RMSEC ( $\text{mg L}^{-1}$ ) calculado foi de 0,021 para Al(III) e 0,011 para Fe(III).

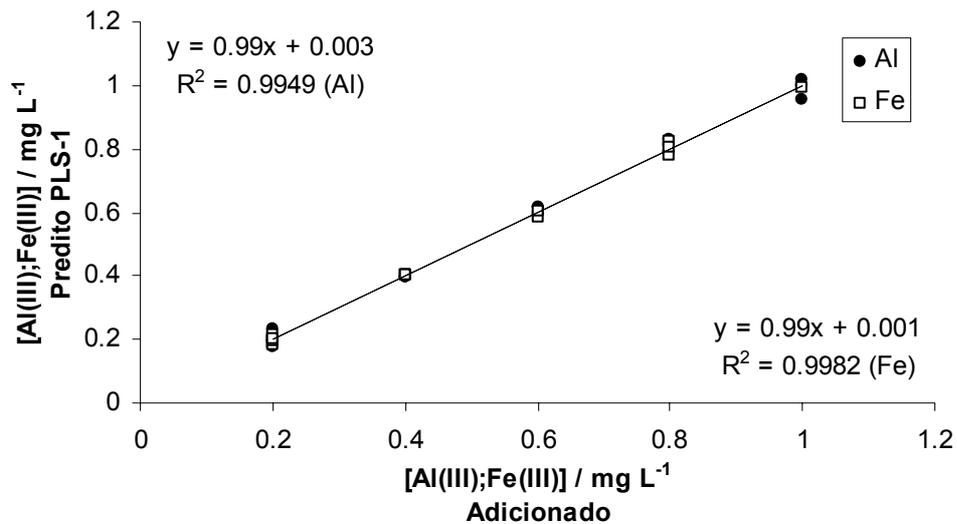


Figura 27. Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções aquosas determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).

No método PLS-1 desenvolvido para Al(III) e Fe(III) em **soluções pré-hemodiálise**, utilizando-se 580 comprimentos de onda por amostra, obtiveram-se os gráficos de scores representados nas Figuras 28 e 29. Estão representados nos gráficos os componentes principais PC1 e PC2. Observa-se a boa distribuição das amostras em cada PC. Percebe-se que, como nas soluções aquosas, PC1 é intimamente relacionado à concentração de Al(III), assim como PC2 à concentração de Fe(III).

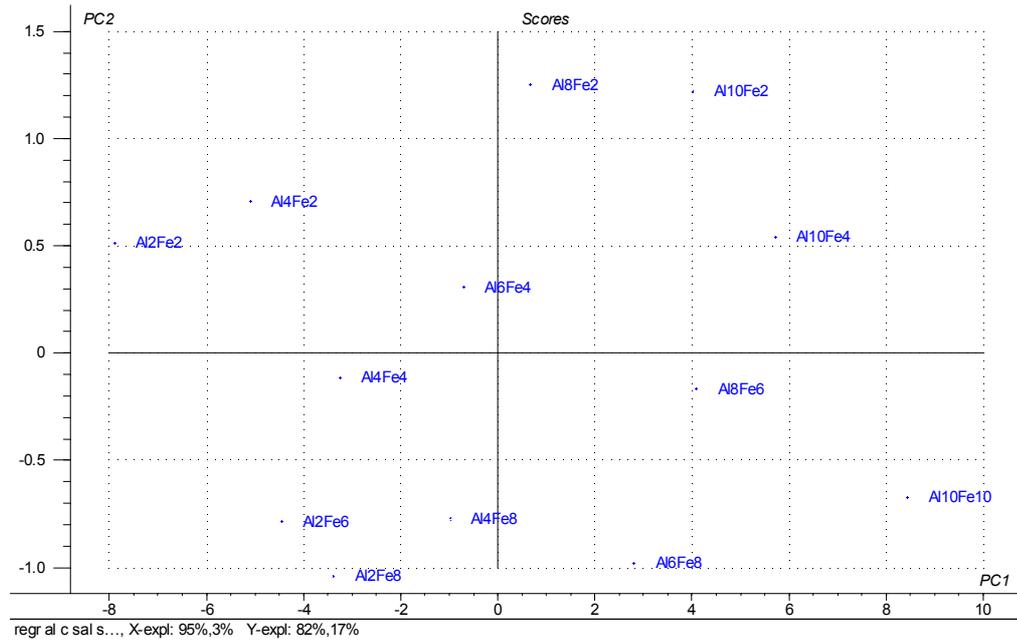


Figura 28. Regressão para Al(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais. Os numerais indicam as concentrações de Al(III) e Fe(III) na faixa de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em **soluções pré-hemodiálise**.

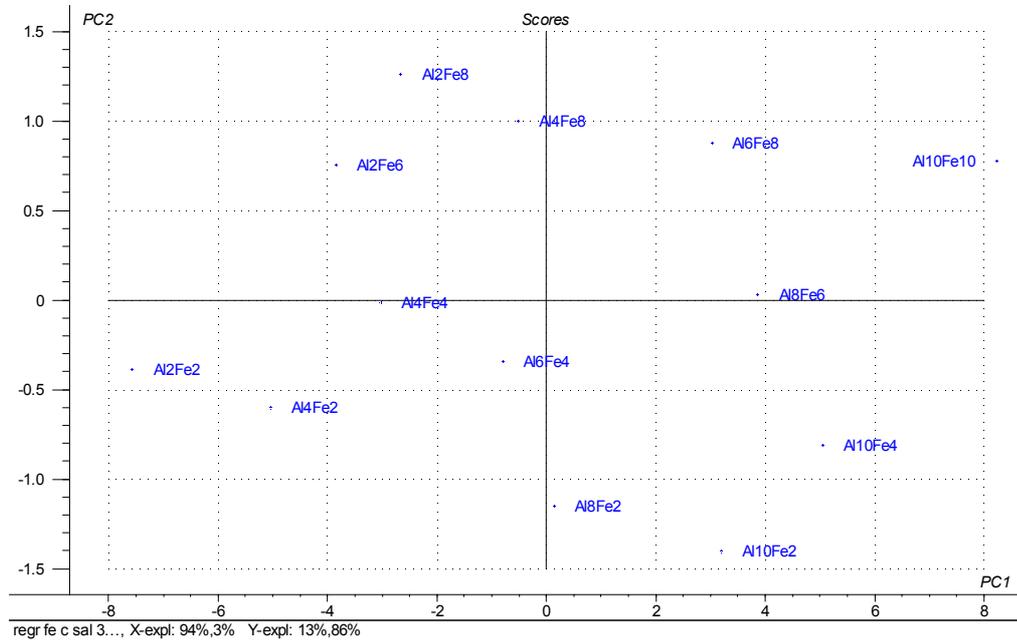


Figura 29. Regressão para Fe(III). PC1 vs. PC2. Gráfico dos scores obtido por PLS-1 para os dados espectrais em **soluções pré-hemodiálise**.

Nas Figuras 30 e 31, observam-se os gráficos de *loadings* para um único PC (PC1) relativos à regressão para Al(III) e Fe(III), respectivamente.

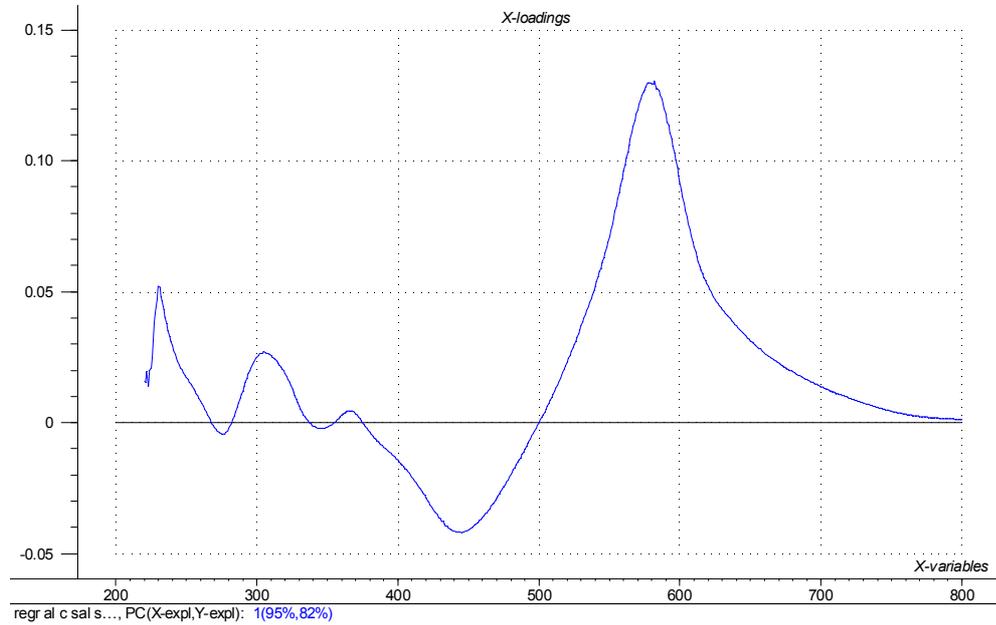


Figura 30. Regressão para Al(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.

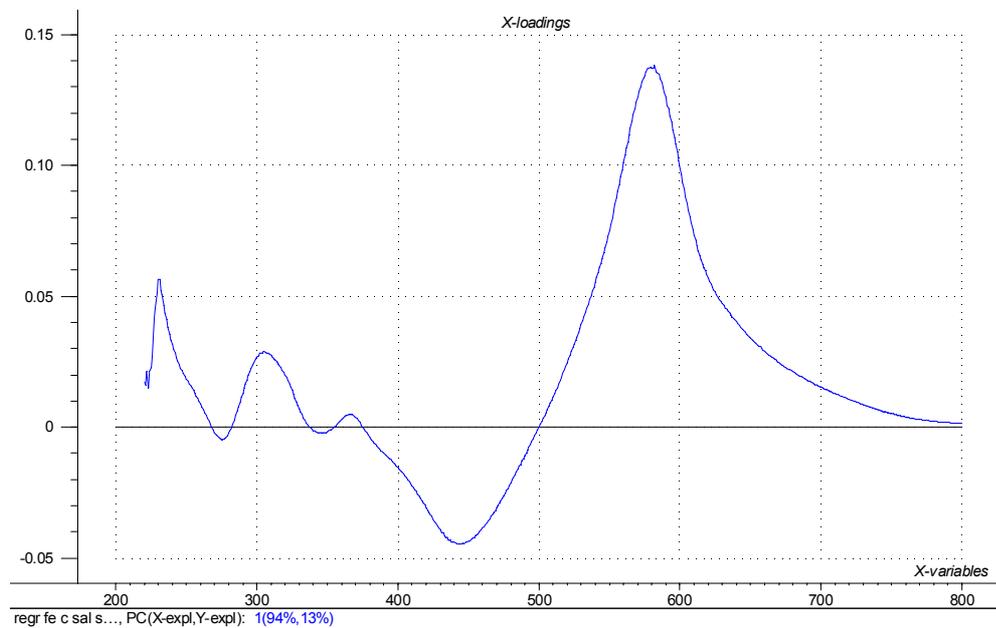


Figura 31. Regressão para Fe(III). Gráfico de *loadings* para PC1, a partir de dados de 580 comprimentos de onda, centrados na média.

O valor do resíduo, relativo à perda de informação pelas projeções do PCA, foi praticamente nulo para PC3, em ambos os analitos, como pode ser visto na Figura 32. Usaram-se 3 PC's para a confecção dos modelos PLS-1, suficientes para explicar 100% da variância dos dados em soluções pré-hemodiálise.

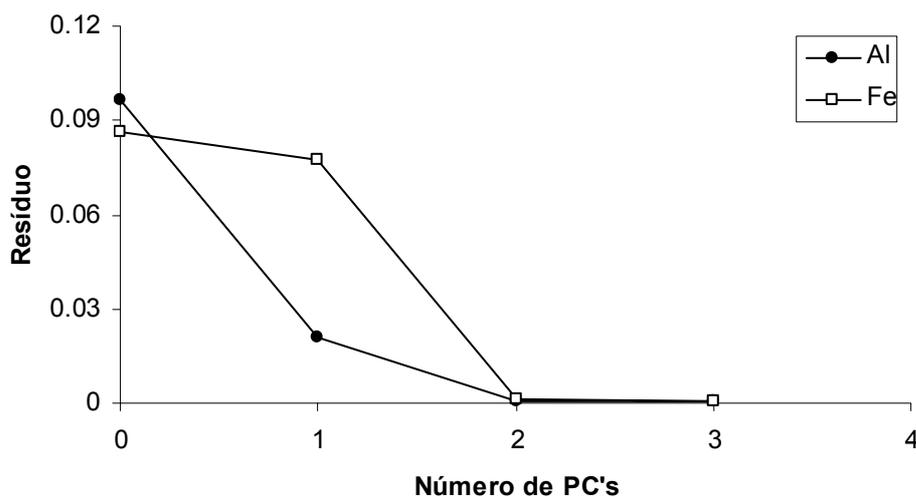


Figura 32. Resíduo do modelo PLS-1, usado para a avaliação do número ótimo de PC's a serem usados no método PLS-1.

A Figura 33 mostra os parâmetros de regressão, assim como coeficiente angular e linear, obtidos através do modelo PLS empregando dados de 580 comprimentos de onda por amostra, centrados na média. O grupo de calibração apresentou RMSEC ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de 0,013 para Al(III) e 0,021 para Fe(III).

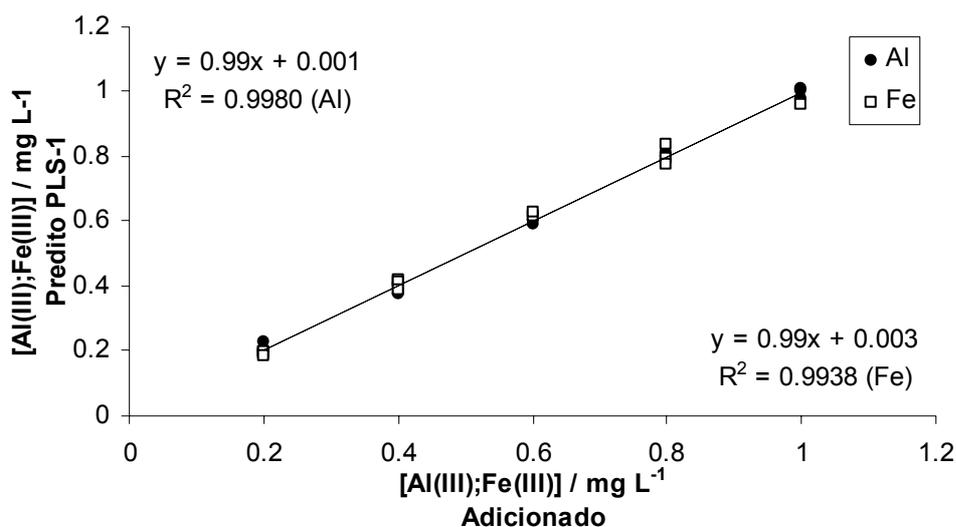


Figura 33. Correlação linear para Al(III) e Fe(III) em soluções pré-hemodiálise determinada por PLS-1 ( $n=3$ ).

Usando este grupo de dados de 580 comprimentos de onda por amostra, as pequenas diferenças entre os espectros também foram bem descritas pelo tratamento multivariado.

Após o desenvolvimento dos métodos PLS para 2 conjuntos distintos de dados e para 2 conjuntos distintos de amostras, algumas considerações conclusivas podem ser feitas.

Nos mapas das amostras, ou gráficos dos *scores*, observou-se que as coordenadas de cada amostra com relação aos PC's preservam particularidades entre si. Observando-se comparativamente as Figuras 9 e 16, relativas à regressão para Al(III) em soluções aquosas e em soluções pré-hemodiálise, respectivamente, nota-se que não há diferenças significativas entre as coordenadas de cada amostra relativas ao PC1 e ao PC2. O aumento da concentração de Al(III) é observado ao longo do PC1, enquanto que o PC2 está relacionado à concentração de Fe(III) nas misturas binárias dos analitos. A mesma comparação pode ser feita analisando-se as Figuras 10 e 17, relativas à regressão para Fe(III), em soluções aquosas e em soluções pré-hemodiálise, respectivamente.

O mapa das variáveis para cada grupo de dados, ou seja, os gráficos de *loadings*, são bastante semelhantes. Isto está relacionado ao fato de que as relações entre as variáveis originais e os novos PC's são preservadas em todos os

modelos PLS, pois as diferenças entre as coordenadas das amostras no sistema original e no novo, assim como a perda de informação são mínimas. Isto explica por quê o valor do resíduo relativo à perda de informação pelas projeções do PCA é praticamente nulo para PC3, em todos os modelos PLS.

Logo, a variância dos dados dos sistemas é explicada quase que em sua totalidade para a maioria dos modelos PLS desenvolvidos.

A redução na dimensão de um grande número de variáveis e sua representação por apenas 3 PC's foi constatada em todos os modelos PLS desenvolvidos.

Os dados obtidos fazendo-se o uso de ambos os grupos distintos de dados espectrais (valores de absorvância de 910 comprimentos de onda e de 580 comprimentos de onda por amostra) apresentaram resultados satisfatórios de uma forma geral. No entanto, como se pode fazer o uso de um número menor de variáveis no modelo de calibração, sem comprometer sua performance, escolheu-se o grupo de dados constituído por 580 comprimentos de onda como ideal.

Os valores de coeficiente linear ( $r^2$ ) para todos os modelos de calibração estão próximos a 1, e os valores de RMSEC resultantes são relativamente baixos, o que demonstra que os modelos são válidos para a determinação simultânea dos analitos.

Foram obtidos dados satisfatórios para o modelo de calibração executado em solução aquosa, assim como para o modelo empregando solução pré-hemodiálise. Decidiu-se por adotar o modelo de calibração em solução pré-hemodiálise como grupo corrente, pois se entende que este conjunto apresenta uma maior similaridade às amostras reais de fluido pós-hemodiálise e, assim, pode gerar valores de predição mais confiáveis.

A Tabela 5 mostra os resultados de predição obtidos através do modelo PLS-1 para os analitos e também valores de recuperação de amostras adicionadas de Al(III) e Fe(III), em soluções pré-hemodiálise, determinados com o método proposto. Para o modelo de calibração foi empregado o conjunto de dados que abrange 580 comprimentos de onda, tendo os dados centrados na média. Como grupo de calibração, usaram-se 13 misturas binárias dos analitos em soluções pré-hemodiálise (vide Tabela 2), conforme descrito no item 2.7.2. Valores de recuperação entre 90 e 115% foram obtidos.

Tabela 5 - Valores preditos pelo método PLS-1 e recuperações obtidas a partir de adições de Al(III) e Fe(III) em amostras de soluções pré-hemodiálise ( $n=3$ ).

Adicionado mg L <sup>-1</sup>		Predito mg L <sup>-1</sup>		Recuperação (%)	
Al(III)	Fe(III)	Al(III)	Fe(III)	Al(III)	Fe(III)
0,20	0,20	0,21±0,02	0,18±0,07	105,0	90,0
0,20	0,40	0,20±0,03	0,37±0,04	100,0	92,5
0,20	1,00	0,19±0,01	1.10±0,02	95,0	110,0
0,40	0,60	0,43±0,03	0,62±0,03	107,5	103,3
0,40	1,00	0,41±0,02	0,99±0,03	102,5	99,0
0,60	0,20	0,57±0,06	0,23±0,05	95,0	115,0
0,60	0,60	0,55±0,05	0,59±0,04	91,7	98,3
0,60	1,00	0,57±0,02	1,00±0,02	95,0	100,0
0,80	0,40	0,76±0,03	0,44±0,02	95,0	110,0
0,80	0,80	0,78±0,04	0,78±0,05	97,5	97,5
0,80	1,00	0,82±0,04	1,00±0,02	102,5	100,0
1,00	0,60	0,99±0,05	0,55±0,05	99,0	91,7
1,00	0,80	0,98±0,04	0,76±0,01	98,0	95,0
1,00	1,00	0,97±0,01	1,00±0,02	97,0	100,0
<i>Média recuperação (%)</i>				98,6	100,1

#### 4.3.2.3 PCR

Na comparação entre os modelos PCR e PLS, observou-se que as diferenças entre os valores de RMSEC e RMSEP são mínimas. No entanto, PLS foi escolhido como técnica de tratamento multivariado, uma vez que melhores resultados, de uma forma geral, foram obtidos com este método de regressão.

#### 4.3.3 Aplicação a amostras de fluido pós-hemodiálise

Amostras de fluido pós-hemodiálise de 6 pacientes renais foram coletadas conforme descrito no item 2.7.3. Também se fez a coleta de amostras de soluções pré-hemodiálise empregadas no dialisador de cada paciente, para fins de comparação. Estas amostras foram analisadas pelo método proposto e as concentrações de Al(III) e Fe(III) foram simultaneamente determinadas.

Foram empregadas 13 misturas binárias dos analitos em solução pré-hemodiálise (vide Tabela 2) para a confecção dos modelos de calibração pelo método PLS-1. O conjunto de variáveis usado para a obtenção dos modelos de calibração foi o grupo constituído por dados de absorvância em 580 comprimentos de onda, centrados na média. A curva de calibração relativa a este sistema está representada na Figura 33.

Os dados de predição estão reunidos na Tabela 6, assim como os valores de RMSEP para cada analito.

Tabela 6 - Dados de predição obtidos através do modelo PLS-1 ( $n=3$ ) para amostras de solução pré-hemodiálise e fluido pós-hemodiálise de pacientes distintos.

Amostra	Predito mg L <sup>-1</sup>	
	Al(III)	Fe(III)
<b>Paciente 1</b>		
<i>Fluido Pré</i>	0,198±0,02	n.d.
<i>Fluido Pós</i>	0,240±0,02	0,133±0,01
<b>Paciente 2</b>		
<i>Fluido Pré</i>	0,096±0,04	n.d.
<i>Fluido Pós</i>	0,195±0,05	n.d.
<b>Paciente 3</b>		
<i>Fluido Pré</i>	0,163±0,03	n.d.
<i>Fluido Pós</i>	0,228±0,02	n.d.
<b>Paciente 4</b>		
<i>Fluido Pré</i>	0,200±0,02	n.d.
<i>Fluido Pós</i>	0,288±0,02	0,154±0,02
<b>Paciente 5</b>		
<i>Fluido Pré</i>	0,124±0,03	n.d.
<i>Fluido Pós</i>	0,247±0,06	0,254±0,04
<b>Paciente 6</b>		
<i>Fluido Pré</i>	0,201±0,07	n.d.
<i>Fluido Pós</i>	0,285±0,04	0,165±0,05
<i>RMSEP</i>	0,0170	0,0182

n.d. - não-detectado

Os valores de concentração obtidos para Al(III) em amostras de soluções pré-hemodiálise são relativamente altos se comparados a dados publicados por Merian [25], onde recomenda-se que a concentração final de Al(III) seja de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estudos mostram que amostras de soluções pré-hemodiálise coletadas imediatamente após o contato com o dialisador podem apresentar contaminação por Al(III) e Fe(III) pelas partes metálicas do sistema de osmose reversa [25]. Assim, pode ter ocorrido uma contaminação das amostras analisadas, uma vez que as mesmas foram coletadas após 2 h do início da sessão de hemodiálise.

Sabe-se que a presença de fluoreto (mesmo em baixas concentrações) na água a ser utilizada em hemodiálise aumenta a capacidade de difusão do Al(III) nas membranas de osmose reversa [25]. Algumas amostras de água para diálise oriundas do mesmo centro de nefrologia do qual foram coletadas as amostras salinas e analisadas pelo Lachem - Laboratório de Análises Químicas - UFSM, apresentaram elevadas concentrações de fluoreto. A presença de fluoreto em concentração equivalente à de Al(III) pode formar o mineral criolita no sistema de hemodiálise [21], e esta também pode ser uma fonte de contaminação das amostras de solução pré-hemodiálise e fluido pós-hemodiálise analisadas.

Em relação aos fluidos pós-hemodiálise, os valores de concentração de Al(III) e Fe(III) encontrados são oriundos da passagem dos analitos pela membrana do dialisador no processo da hemodiálise. Estes valores podem estar relacionados à contaminação das amostras pelo contato com as partes metálicas do sistema de osmose reversa, assim como podem ter sido, em parte, excretados durante a sessão de hemodiálise, resultado de fontes externas de contaminação aos pacientes renais.

Bertagnolli [77] observou que medicamentos (veículos e excipientes), a ingestão de erva mate, sucos artificiais, refrigerantes e verduras folhosas colaboram como maior fonte de contaminação por Al(III) aos pacientes renais. A contaminação por Fe(III) pode se dar pela ingestão de cereais, frutas, vegetais e café [25].

Nas amostras de fluido pós-hemodiálise, alguma fração de Al(III) e Fe(III) pode estar ligada a compostos excretados pelos pacientes, como creatinina e uréia. No entanto, estudos mostram que VPC sobreestima a fração livre de Al(III) independente do ligante ao qual ele possa estar ligado [31, 37]. Por isso, o complexante VPC é inadequado para determinações de Al(III) livre (tóxico) em amostras de água, mas ideal aos interesses deste trabalho.

Como não há material de referência para amostras de fluido pós-hemodiálise, o método proposto foi validado frente ao método voltamétrico publicado recentemente [1].

Amostras de fluido pós-hemodiálise, coletadas conforme o item 2.7.3, foram adicionadas de Al(III) e Fe(III) e analisadas comparativamente por AdSV e pelo método proposto. A adição dos analitos às amostras foi necessária, uma vez que, para medidas por EAM algumas amostras apresentaram concentrações de Fe(III) inferiores ao limite de detecção do método.

Ambos os métodos apresentaram resultados similares e baixos valores de desvio padrão para a determinação de Al(III) e Fe(III) em amostras de fluido pós-hemodiálise, o que pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de concentração de Al(III) e Fe(III) obtidos através dos métodos EAM/PLS-1 e AdSV em amostras de fluido pós-hemodiálise ( $n=3$ ).

<b>EAM/PLS-1</b>		<b>AdSV</b>	
<b>mg L<sup>-1</sup></b>			
<b>Al(III)</b>	<b>Fe(III)</b>	<b>Al(III)</b>	<b>Fe(III)</b>
0,23±0,020	0,25±0,023	0,21±0,015	0,22±0,025
0,34±0,010	0,28±0,026	0,32±0,020	0,31±0,015
0,42±0,020	0,43±0,020	0,41±0,030	0,39±0,015
0,58±0,020	0,47±0,020	0,55±0,026	0,45±0,020

A Figura 34 mostra os parâmetros de regressão, assim como coeficientes angulares e lineares relativos a cada analito, para ambos os métodos.

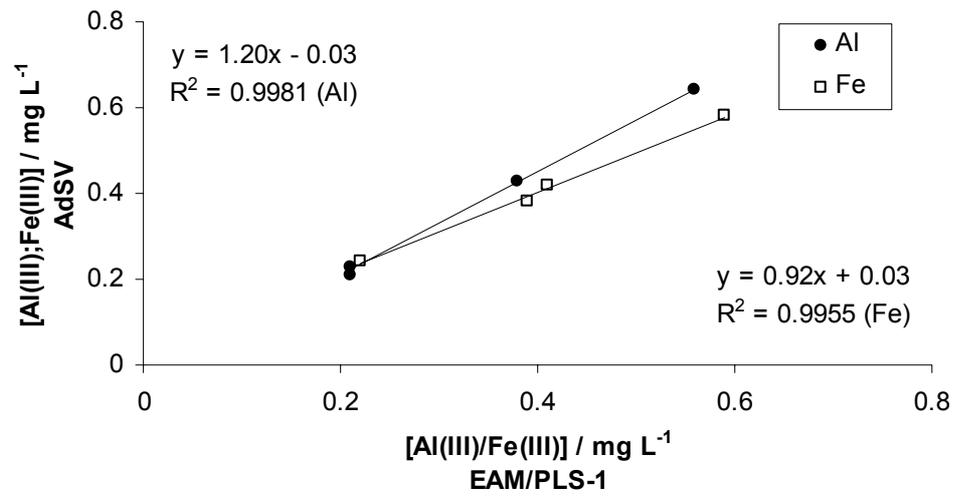


Figura 34. Correlação linear para Al(III) e Fe(III) determinada com o método proposto e AdSV em amostras de fluido pós-hemodiálise ( $n=3$ ).

## 5 CONCLUSÃO

Devido ao perigo de intoxicação por metais ao qual os pacientes renais ficam expostos, faz-se necessário o controle de rotina dos níveis destes metais em soluções pré e pós-hemodiálise, pelo contato freqüente destes indivíduos com um grande volume destas soluções. A presente metodologia pode ser uma alternativa ao monitoramento de amostras de sangue dos pacientes, de forma não-invasiva. As concentrações de Al(III) e Fe(III) podem ser monitoradas, periodicamente, em amostras de fluido pós-hemodiálise.

Neste trabalho, desenvolveu-se uma metodologia para a quantificação simultânea de Al(III) e Fe(III) por espectrometria de absorção molecular em amostras de fluido pós-hemodiálise. A determinação fez-se possível a partir da formação dos complexos dos metais com o reagente VPC em tampão HMTA (pH 6,1). O método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi empregado como ferramenta para a determinação simultânea dos analitos em amostras com alta concentração salina sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, uso de agentes mascarantes ou etapas de separação. A presente técnica consiste em um procedimento simples, rápido e de baixo custo.

A fim de obter-se um modelo de regressão ideal, com boa correlação e mínimo valor de erro, empregaram-se misturas binárias dos analitos em solução pré-hemodiálise como grupo de calibração, utilizando-se dados de absorvância em 580 comprimentos de onda por amostra. A partir deste modelo de calibração, fez-se a predição de valores de concentração de Al(III) e Fe(III) em amostras de fluido pré e pós-hemodiálise. Dados de predição para amostras de fluido pós-hemodiálise adicionadas dos analitos foram comparados a medidas por voltametria adsortiva de redissolução (AdSV). Ambos os métodos apresentaram resultados similares para a determinação dos analitos em fluidos pós-hemodiálise.

## 6 REFERÊNCIAS

[1] LOCATELLI, C.; **Simultaneous determination of aluminum and iron in high salt content matrices by adsorptive stripping voltammetry – Application to dialysis fluids**, *Electroanalysis*, v. 15, p. 1397, 2003.

[2] SAVORY, J., WILLS, M.R.; **Aluminum and chronic failure: sources, absorption, transport and toxicity**, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, v. 27(1), p. 59, 1989.

[3] WYNGAARDEN, J., SMITH, L., BENNETT, J.; **Tratado de Medicina Interna**, 19<sup>a</sup> ed., Ed. G. Koogan, Rio de Janeiro, 1993.

[4] SAVORY, J., WILLS, M.R.; **Trace Metals: essential nutrients or toxins**, *Clin. Chem.*, v. 38(8), p. 1565, 1992.

[5] KEIRSSE, H., SMEYERS-VERBEKE, J., VERBEELEN, D., MASSART, D.; **Critical study of the speciation of aluminum in biological fluids by size-exclusion chromatography and electrothermal atomic absorption**, *Anal. Chem.*, v. 60, p. 380, 1988.

[6] WOOLFSON, A.D., GRACEY, G.M.; **Matrix effects in the determination of aluminum in dialysis fluids by graphite furnace atomic absorption spectrometry**, *Analyst*, v. 112, p. 1387, 1987.

[7] HALLS, D.J.; **Faster analysis of biological samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry**, *Anal. Proc.*, v. 25(7), p. 232, 1988.

[8] FAGIOLI, F., LOCATELLI, C., GILLI, P.; **Determination of aluminum in serum by atomic absorption spectrometry with the L'vov platform at different resonance lines**, *Analyst*, v. 112(9), p. 1229, 1987.

[9] WELZ, B., SPERLING, M.; **Atomic Absorption Spectrometry**, Ed. VCH, Weinheim, Alemanha, 1999.

[10] BERGER, H., MEYEBERG, F., DANNECKER, W.; **Effects of some typical environmentally relevant matrixes on the trace element analysis by graphite-tube furnace AAS**, Fortschritte in der Atomspektrometrischen Spurenanalytik, v. 2, p. 607, 1986.

[11] SLAVIN, W.; **The determination of trace metals in seawater**, Atom. Spectroscopy, v. 1(3), p. 66, 1980.

[12] DO NASCIMENTO, D.B., SCHWEDT, G.; **Polyethylene (PE) powder as an absorbent for preconcentration of aluminum, beryllium and thallium**, Mikrochim. Acta, v. 126(1-2), p. 159, 1997.

[13] DO NASCIMENTO, D.B., SCHWEDT, G.; **Off-line and on-line preconcentration of trace levels of beryllium using complexing agents with atomic spectrometric and fluorimetric detection**, Anal. Chim. Acta, v. 283, p. 909, 1993.

[14] BOHRER, D., GIODA, A., BINOTTO, R., DO NASCIMENTO, P.C.; **On-line and spectrophotometric determination of low levels of aluminum in high-salt content samples: application to analysis of hemodialysis fluids**, Anal. Chim. Acta, v. 362, p. 163, 1998.

[15] LIMA, D.; **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1992.

[16] DAUGIRDAS, J., ING, T.; **Handbook of Dialysis**, 2<sup>nd</sup>. ed., Little Brown & Company, Boston, EUA, 1994.

[17] EASTERLING, R., SEKERS, K., **American National Standard for Hemodialysis Systems**, AAMI, 1981.

[18] BRASIL, Resolução RDC (ANVISA) n<sup>o</sup>. 154, de 15 de Junho de 2004. Diário Oficial da União: Poder Executivo, de 17 de Junho de 2004.

[19] BOHRER, D.; **Alumínio em diálise – Uma visão analítica**, J. Bras. Nefrol., v. 19(3), p. 426, 1997.

[20] Association for the Advancement of Medical Instrumentation, **Hemodialysis System**, 2<sup>nd</sup>. ed., ANSI/AAMI RD5, 1992.

[21] HARRISON, P.; **Fluoride in water: a UK perspective**, J. Fluorine Chem., v. 126(11-12), p. 1448, 2005.

[22] GREGER, J.L., SUTHERLAND, J.E.; **Aluminum exposure and metabolism**, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., v. 34(5), p. 439, 1997.

[23] MERIAN, E. (Ed.); **Metals and Their Compounds in the Environment**, Ed. VCH, Weinheim, Alemanha, 1991.

[24] KRUCK, T.P.A., KALOW, W., MCLACHLAN, C.; **Determination of Desferrioxamine and a major metabolite by high-performance liquid chromatography: application to the treatment of aluminum-related disorders**, J. Chromatogr., v. 341, p. 123, 1985.

[25] ANTON, A.; **Colorimetric estimation of aluminum with pyrocatechol violet**, Anal. Chem., v. 32(6), p. 725, 1960.

[26] DOUGAN, W.K., WILSON, A.L.; **The absorptiometric determination of aluminum in water - A comparison of some chromogenic reagents and the development of an improved method**, Analyst, v. 99, p. 413, 1974.

[27] WILSON, A.D., SERGEANT, G.A.; **The colorimetric determination of aluminum in minerals by pyrocatechol violet**, Analyst, v. 88, p. 109, 1963.

[28] EATON, A.D., CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E. (Eds.); **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, APHA-AWWA-WPCF, 19<sup>th</sup>. ed., Washington, EUA, 1995.

[29] ELENKOVA, N.G., POPOVA, E.; **Spectrophotometric investigation of the reaction of eriochrome cyanin RC and magnesium and aluminum**, Talanta, v. 22, p. 925, 1975.

[30] HILL, U.T.; **Direct photometric determination of aluminum in iron ores**, Anal. Chem., v. 28(9), p. 1419, 1956.

[31] HAWKE, D., POWELL, K., SIMPSON, S.; **Equilibrium modelling of interferences in the visible spectrophotometric determination of aluminum(III): comparison of the chromophores chrome azurol S, eriochrome cyanine R and pyrocatechol violet, and stability constants for eriochrome cyanine R-aluminum complexes**, Anal. Chim. Acta, v. 319, p. 305, 1996.

[32] PAKALNS, P.; **Spectrophotometric determination of aluminum with chrome azurol S**, Anal. Chim. Acta, v. 32, p. 57, 1965.

[33] HAWKE, D., POWELL, K., SJÖBERG, S.; **A potentiometric and spectrophotometric study of the system  $H^+$ - $Al^{3+}$ -chrome azurol S**, Polyhedron, v. 14(3), p. 377, 1995.

[34] MARCZENKO, Z., JAROSZ, M.; **Formation of ternary complexes of aluminum with some triphenylmethane reagents and cationic surfactants**, Analyst, v. 107, p. 1431, 1982.

[35] RØYSET, O.; **Flow-injection spectrophotometric determination of aluminum in water with pyrocatechol violet**, Anal. Chim. Acta, v. 185, p. 75, 1986.

[36] RIOS, A., DE CASTRO, M.L., VALCÁRCEL, M.; **New approach to the simultaneous determination of pollutants in waste waters by flow-injection analysis**, Analyst, v. 110, p. 277, 1985.

[37] HAWKE, D., POWELL, K.; **Flow-injection analysis applied to the kinetic determination of reactive (toxic) aluminum: comparison of chromophores**, Anal. Chim. Acta, v. 299, p. 257, 1994.

[38] BENSON, R., WORSFOLD, P., SWEETING, S.; **On-line determination of residual aluminum in potable and treated waters by flow-injection analysis**, Anal. Chim. Acta, v. 238(1), p. 177, 1990.

[39] RØYSET, O.; **Comparison of four chromogenic reagents for the flow-injection determination of aluminum in waters**, Anal. Chim. Acta, v. 178, p. 223, 1985.

[40] REIS, B.F., BERGAMIN FILHO, H., ZAGATTO, E.A., KRUG, F.J.; **Merging zones in flow-injection analysis: Part 3. Spectrophotometric determination of aluminum in plant and soil materials with sequential addition of pulse reagents**, Anal. Chim. Acta, v. 107, p. 309, 1979.

[41] DOWNARD, A.J., KIPTON, H., POWELL, P., XU, S.; **Voltammetric determination of aluminum using a chemically modified electrode**, Anal. Chim. Acta, v. 251, p. 157, 1991.

[42] SAFAVI, A., MIRZAEI, M., ABDOLLAHI, H.; **Simultaneous spectrophotometric determination of iron, titanium and aluminum by partial least squares calibration method in micellar medium**, Anal. Lett., v.36(3), p. 699, 2003.

[43] ZAGATTO, E.A., JACINTHO, A.O., PESSEDA, L.C., KRUG, F.J., REIS, B., BERGAMIN FILHO, H.; **Merging zones in flow-injection analysis: Part 5. Simultaneous determination of aluminum and iron in plants digests by a zone-sampling approach**, Anal. Chim. Acta, v. 125, p. 37, 1981.

[44] PIMENTEL, F., BARROS NETO, B., UGULINO, M.; **Recomendações para calibração em Química Analítica: Parte 1 - Fundamentos e calibração com um componente**, Quim. Nova, v. 25(5), p. 856, 2002.

[45] ESBENSEN, K.; **Multivariate Analysis in Practice**, 3<sup>rd</sup>. ed., CAMO A/S, Trondheim, Noruega, 1998.

[46] MARTENS, M., NAES, T., **Multivariate Calibration**, Ed. John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA, 1989.

[47] WOLD, H., KOWALSKI, B., GERLACH, R.; **Partial least squares path modeling with latent variables**, Anal. Chim. Acta., v. 112(4), p. 417, 1979.

[48] OTTO, M.; **Chemometrics**, Ed. VCH, Weinheim, Alemanha, 1999.

[49] COSCIONE, A., DE ANDRADE, J.C., POPPI, R., MELLO, C., VAN RAIJ, B., DE ABREU, M.; **Multivariate calibration applied to a highly interfering chemical system – The simultaneous spectrophotometric determination of aluminum and iron in plants using xylenol orange and partial least squares**, Anal. Chim. Acta, v. 423, p. 31, 2000.

[50] COSCIONE, A., DE ANDRADE, J.C., POPPI, R.; **PLS regression using real sample calibration for aluminum and iron determination in plants**, Analyst, v. 127(1), p. 135, 2002.

[51] KARGOSHA, K., SARRAFI, A.H.M.; **Simultaneous determination of calcium and magnesium in dialysis fluids using multivariate calibration methods**, Anal. Lett., v. 34(10), p. 1781, 2001.

[52] ENGSTRÖM, E., KARLBERG, B.; **Screening method for metals based on array spectrophotometry and multivariate analysis**, J. Chemom., v. 10, p. 509, 1996.

[53] ENGSTRÖM, E., KARLBERG, B., JÖNEBRING, I.; **Assessment of a screening method for metals in seawater based on the non-selective reagent PAR**, Anal. Chim. Acta, v. 371, p. 227, 1998.

[54] GOMEZ, E., ESTELA, J.M., CERDA, V., BLANCO, B.; **Simultaneous spectrophotometric determination of metal ions with PAR**, Fresenius' J. Anal. Chem., v. 342, p. 318, 1992.

[55] HERNÁNDEZ, F., JIMÉNEZ, F., JIMÉNEZ, A.I., ARIAS, J.J., HAVEL, J.; **Multicomponent flow-injection based analysis with diode array detection and partial least squares multivariate calibration evaluation – Rapid determination of Ca(II) and Mg(II) in waters and dialysis liquids**, Anal. Chim. Acta, v. 320(2-3), p. 177, 1996.

[56] OTTO, M., WEGSCHEIDER, W.; **Spectrophotometric multicomponent analysis applied to trace metal determination**, Anal. Chem., v. 57(1), p. 63, 1985.

[57] MADRAKIAN, T., AFKHAMI, A., BORAZJANI, M., BAHRAM, M.; **Partial least squares regression for the simultaneous determination of aluminum and beryllium in geochemical samples using xylene orange**, Spectrochim. Acta, Part A, v. 61(13-14), p. 2988, 2005.

[58] GHASEMI, J., SHAHABADI, N., SERAJI, H.R.; **Spectrophotometric simultaneous determination of cobalt, copper and nickel using nitroso-R-salt in alloys by partial least squares**, Anal. Chim. Acta, v. 510(1), p. 121, 2004.

[59] GONZALEZ, M.J.G., RENEDO, O.D., MARTINEZ, J.A.; **Simultaneous determination of antimony(III) and antimony(V) by UV-Vis spectroscopy and partial least squares method**, Talanta, v. 68(1), p. 67, 2005.

[60] KONZEN, P. **Metodologias limpas para o controle de qualidade de medicamentos e alimentos empregando meta-heurísticas**. Monografia (Curso de Matemática Aplicada e Computacional) – Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul, 2003.

[61] EL-GINDY, A.; **HPLC and chemometric assisted spectrometry methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride**, Farmaco, v. 60(9), p. 745, 2005.

[62] EL-GINDY, A., EMARA, S., MOSTAFA, A.; **HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of atenolol, amiloride hydrochloride and chlorthalidone**, *Farmaco*, v. 60(3), p. 269, 2005.

[63] DINC, E. , OZDEMIR, A., BALEANU, D.; **Comparative study of the continuous wavelet transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 37(3), p. 569, 2005.

[64] SENA, M., CHAUDHRY, Z., COLLINS, C., POPPI, R.; **Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 36(4), p. 743, 2004.

[65] FERRARO, M., CASTELLANO, P.M., KAUFMAN, T.S.; **Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 34(2), p. 305, 2004.

[66] ARAMA, C., GEORGITA, C.; **Simultaneous determination of paracetamol, chlorpheniramine and pseudoephedrine by the partial least squares method**, *Farmacia*, v. 50(6), p. 30, 2002.

[67] GHASEMI, J., ABBASI, B., NIAZI, A., NADAF, E., MORDAI, A.; **Spectrophotometric multicomponent determination of folic acid, thiamine, riboflavin and pyridoxal by using double divisor-ratio spectra derivative-zero crossing method**, *Anal. Lett.*, v. 37(12), p. 2609, 2004.

[68] ABERASTURI, F.J., JIMÉNEZ, A.I., ARIAS, J.J., JIMÉNEZ, F.; **Simultaneous spectrophotometric determination of folic acid, pyridoxine, riboflavin and thiamine by partial least squares**, *Anal. Lett.*, v. 35(10), p. 1677, 2002.

[69] REZAEI, Z., HEMMATEENEJAD, B., KHABNADIDEH, S., GORGIN, M.; **Simultaneous spectrophotometric determination of carbamazepine and phenytoin in serum by PLS regression and comparison with HPLC**, *Talanta*, v. 65(1), p. 21, 2005.

[70] NI, Y., HUANG, C., KOKOT, S.; **Application of multivariate calibration and artificial neural networks to simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbamate pesticides**, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, v. 71(2), p. 177, 2004.

[71] CAMINA, J.M., BOERIS, M.S., MARTINEZ, L.D., LUCO, J.M., MARCHEVSKY, E.J.; **Simultaneous determination of Cu, Zn and Fe in honey using partial least squares regression method PLS-2**, Chem. Anal., v. 49(5), p. 717, 2004.

[72] BRUNS, R.E., BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.; **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Ed. Unicamp, Campinas, 1995.

[73] FERRÉ, J., BOQUÉ, R., FERNANDEZ-BAND, B., LARRECHI, M.S., RIUS, F.X.; **Figures of merit in multivariate calibration – Determination of four pesticides in water by flow-injection analysis and spectrophotometric detection**, Anal. Chim. Acta, v. 348(1-3), p. 167, 1997.

[74] BRONSON, D., DANIELS, D., DIXON, J., REDICK, C., HAALAND, P.; **Virtual kinetics: using statistical experimental design for rapid analysis of enzyme inhibitor mechanisms**, Biochem. Pharmacol., v. 50(6), p. 823, 1995.

[75] MARQUES, M.S. **Aplicação da calibração multivariada na determinação de cloro residual em fluidos de diálise**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2002.

[76] CHRISTIAN, G.; **Analytical Chemistry**, 5<sup>th</sup>. ed., Ed. John Wiley & Sons, EUA, 1994.

[77] BERTAGNOLLI, D. **Avaliação da intoxicação por alumínio na dieta alimentar e medicamentos de pacientes com insuficiência renal crônica**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2004.

## APÊNDICE

### 1. Composição das soluções pré-hemodiálise

**Solução Ácida:** 138 mEq/L Na<sup>+</sup>; 1,5 mEq/L K<sup>+</sup>; 2,5 mEq/L Ca<sup>2+</sup>; 1,0 mEq/L Mg<sup>2+</sup>;  
108 mEq/L Cl<sup>-</sup>; 34,8 mEq/L HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**Solução Básica:** 34,8 mEq/L HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 34,8 mEq/L Na<sup>+</sup>.