

## **4 Procedimentos**

### **4.1. Amostragem e estocagem de amostras**

A coleta de urina deve ser feita levando-se em consideração as variáveis que possam influir na concentração de espécies em estudo, como hora do dia, período de exposição ao medicamento etc. Uma possibilidade é a coleta por um período de 24 horas, quando o paciente acorda, devendo a bexiga ser completamente esvaziada. Como não era o objetivo do trabalho um estudo toxicológico, não se levou em consideração estas questões. As amostras coletadas de indivíduos que não foram submetidos ao tratamento a base de drogas de platina foram coletadas e armazenadas em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL, à temperatura de 4°C, até sua utilização posterior. O maior prazo entre coleta e uso foi de 7 dias. Estas amostras foram tomadas de indivíduos de diferentes idades e sexo, tentando caracterizar as diferentes variações na matriz a serem encontradas no caso de um estudo toxicológico. Amostras de urina de um paciente sob tratamento quimioterápico com cisplatina foram recolhidas em frascos plásticos esterilizados e guardadas em freezer (-4°C), uma vez que precisavam ser estocadas por um período prolongado.

### **4.2. Metodologia**

#### **4.2.1. Otimização multivariada nos estudos com GF AAS**

Planejamentos estatísticos de experimentos ou planejamentos fatoriais são ferramentas muito importantes para otimização de sistemas, pois fornecem, com uma menor quantidade de experimentos, uma maior quantidade de informações e indicações sobre a influência das variáveis estudadas. A metodologia clássica, normalmente empregada, se baseia no estudo separado

de cada variável experimental, mas pode ser ineficiente na determinação das condições ótimas de um dado sistema, pois as interações entre as variáveis são desprezadas<sup>58</sup>. Determinar a influência de um ou mais fatores sobre um outro fator de interesse em um sistema é um dos problemas mais comuns em experimentos. O sistema atua como uma função, desconhecida em princípio, que opera sobre os fatores e produz como saída as respostas observadas. Há, então, que se descobrir essa função, ou pelo menos obter uma aproximação satisfatória para ela<sup>58</sup>.

Um experimento no qual a resposta variável é medida por todas as possíveis combinações dos fatores, em dois níveis diferentes, é conhecido como um planejamento fatorial completo. Esse planejamento detecta e estima todas as interações dos fatores, o que não pode ser feito pelo método univariado. Além disso, se os efeitos dos fatores forem aditivos, o planejamento fatorial requer, para fornecer um resultado com a mesma precisão, uma quantidade menor de medidas ( $2^k$ , no qual  $k$  é o número de fatores) em relação ao método univariado. Muitas são as variáveis a serem otimizadas na determinação de platina em urina por GF AAS; assim, escolheram-se apenas as variáveis que, por conhecimento prévio, eram as mais importantes, sendo estas: a natureza e a concentração do do diluente, o fator de diluição, o volume de amostra injetada no forno de grafite, as temperaturas de atomização e de pirólise e a rampa de atomização.

#### **4.2.2.**

#### **Procedimentos de calibração nos estudos com GF AAS**

Após o estudo de otimização das variáveis, procurou-se investigar os efeitos multiplicativos de matriz na resposta analítica e a possibilidade de calibração com soluções analíticas aquosas utilizando sais inorgânicos de platina. Portanto, fez-se a comparação das inclinações de curvas de calibração aquosas obtidas com cloreto de platina, carboplatina e cisplatina, assim como, curvas de adição de analito em diferentes amostras de urina livres de platina. Estas curvas foram preparadas pela diluição 1+1 das amostras de urina com solução de  $\text{HNO}_3$  0,4% v/v, contendo crescentes quantidades de platina, de tal forma que as concentrações finais nas amostras foram 40, 80, 120, 160 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### **4.2.3. Estudos de exatidão em GF AAS**

Para a obtenção de resultados analíticos confiáveis, faz-se necessário a validação da metodologia analítica desenvolvida, entendendo-se como validação de um método o processo de comprovação de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atingidos. A validação de um método necessita da análise de materiais de referência certificados, de modo a permitir a comparação dos resultados obtidos com os valores certificados ou pela comparação com outros provenientes de um procedimento independente e validado. Devido à falta de materiais certificados disponíveis para o presente trabalho, um estudo da exatidão do método desenvolvido foi realizado, utilizando-se para isso métodos comparativos.

### **4.2.4. Efeito do uso da solução mista de NaCl e HCl nos estudos com GF AAS**

Foi realizado um estudo adicional sobre o efeito do uso da solução mista de NaCl e HCl como diluente, buscando-se minimizar as possíveis interferências de matriz. A avaliação de seus resultados foi investigada através de estudos de recuperação. Para tal, uma urina livre de platina foi dividida em quinze alíquotas, fortificadas com a urina 3 do paciente sob tratamento quimioterápico, em três níveis diferentes, 100, 400 e 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### **4.2.5. Efeito da concentração do ácido nos estudos com CS-HR F AAS**

Como a espectrometria de absorção atômica na chama apresenta baixa sensibilidade para platina, o fator de diluição da amostra foi sempre 1+1, utilizando-se uma solução ácida como diluente. A injeção direta das amostras não é indicada, pois leva a uma grande formação de incrustações sólidas no queimador, comprometendo a análise. O ácido escolhido foi o HCl, mais indicado que o  $\text{HNO}_3$ . A otimização da sua concentração foi realizada de modo univariado, observando-se os parâmetros de curvas de adição de analito em três urinas distintas. A vazão de acetileno e a altura do queimador foram ajustadas para se obter um máximo de sinal de absorvância.

#### **4.2.6.**

#### **Otimização multivariada das condições da chama e da altura do queimador nos estudos com CS-HR F AAS**

Fez-se um planejamento multivariado D-optimal para definir as condições da chama (vazões dos gases) e a altura do queimador a ser usada; tomou-se como resposta a soma dos coeficientes angulares das curvas de adição de analito em três urinas diferentes e o desvio padrão relativo (RSD%) entre essas inclinações, buscando-se, desta forma, alcançar a maior sensibilidade possível em condições onde as curvas de adição de analito das diferentes urinas apresentassem a menor diferença de inclinação.

#### **4.2.7.**

#### **Procedimentos de calibração nos estudos com CS-HR F AAS**

Após o estudo de otimização das variáveis, procurou-se investigar os efeitos multiplicativos de matriz na resposta analítica e a possibilidade de calibração externa, com solução de calibração preparada em uma urina qualquer, livre de platina, utilizando sais inorgânicos de platina. Portanto, fez-se a comparação das inclinações das curvas de adição de analito com PtCl<sub>2</sub>, carboplatina e cisplatina em diferentes amostras de urina livres de platina. Estas curvas foram preparadas pela diluição 1+1 das amostras de urina com solução de HNO<sub>3</sub> 2% v/v contendo crescentes quantidades de platina, de tal forma que as concentrações finais nas amostras foram 1, 2, 3 e 4 mg L<sup>-1</sup>.

#### **4.2.8.**

#### **Estudos de exatidão**

Oito amostras de urina do paciente sobre tratamento quimioterápico com cisplatina foram analisadas pela metodologia proposta. O fator de diluição foi de 1+1 utilizando como diluente HCl 2% v/v. A curva de calibração externa foi construída, utilizando uma amostra de urina livre de platina. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles derivados de um método independente.