5
Resultados e discussões

5.1.
Estudos com GF AAS

5.1.1.
Otimização multivariada

Definidas as variáveis a serem estudadas, o próximo passo foi construir a matriz de planejamento da primeira rodada de experimentos (Tabela 1). As amostras foram fortificadas com solução aquosa de $PtCl_2$, a um nível de 200 µg L^{-1}. Sete fatores de controle foram considerados, cada um deles com dois níveis, resultando em 128 combinações. Observou-se que, neste caso, era inviável executar o experimento completo, decidindo-se, por isso, utilizar a técnica de fatorial fracionário 2^{k-p}, (k=7 e p = 2), com resolução IV. Ao construir um experimento 2^{7-2}, com 32 rodadas de ensaios, procurou-se reduzir o número de experimentos, o tempo de experimentação e o consumo de reagentes. Os valores reais e codificados dos níveis dos fatores estudados na primeira rodada de experimentos apresentam-se na tabela 1, e a matriz de experimentos realizada nesta rodada encontra-se na tabela 2.

Tabela 1. Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento fatorial fracionário 2^{7-2}.

Variável	Descrição	Níveis	
		-1	+1
A	Tipo de diluente	HCl	HNO_3
B	Concentração do diluente (% v/v)	0,4	2
C	Temperatura de atomização (ºC)	2300	2500
D	Temperatura de pirólise (ºC)	1200	1600
E	Rampa de atomização (ºC/s)	1600	2000
F	Diluição	0	1:1
G	Volume de amostra injetado (µL)	10	20

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 2. Combinação entre as variáveis e os respectivos resultados de absorvância, para a medida de 200 µg L^{-1} de Pt em urina, no planejamento fatorial fracionário 2^{7-2}.

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G	Absorvância Integrada
1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,041
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,043
3	-1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	0,034
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	0,040
5	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	0,075
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	0,137
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0,081
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0,054
9	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	0,054
10	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0,056
11	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	0,071
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0,044
13	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	0,085
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	0,079
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	0,064
16	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	0,075
17	-1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0,009
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,049
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	0,038
20	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	0,040
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	0,081
22	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0,077
23	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	0,075
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0,064
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0,031
26	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,051
27	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	0,062
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	0,042
29	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	0,075
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0,085
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	0,063
32	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,066

F = ABCD G = ABDE

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Com os dados da tabela 2 foram estimados os efeitos principais individuais e de interação para esse experimento. Os resultados encontram-se na tabela 3. O planejamento fatorial dos dados contidos na tabela 2 foi realizado utilizando a “Análise e Planejamento de Experimentos” do programa de estatística Statistica 7.0 Statsoft. Através deste programa, tratamentos estatísticos foram aplicados no “Planejamento Padrão segundo Box-Hunter $2^{xx}(k-p)$”, obtendo-se várias tabelas e gráficos, sendo os mais importantes, para este caso, apresentados a seguir. A tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes (tabela 3) nos fornece, através da análise da probabilidade, *p-value*, quais os efeitos e suas interações que são estatisticamente significantes, com 95% de confiança. Os efeitos ou interações que apresentam $p<0,05$ são significativos, sendo os demais sem importância estatística. Assim, o efeito C (temperatura de atomização) e as interações AB e BC mostraram-se estatisticamente importantes, de acordo com este experimento.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 3. Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial fracionário 2^{7-2}.

	Efeito	Desvio padrão	t(6)	p	-95%	+95%	Coeficiente	Desvio padrão	-95%	+95%
Média/ Interação	0,060636	0,002343	25,87874	0,000000	0,054903	0,066370	0,060636	0,002343	0,054903	0,066370
(1)A	0,003946	0,004686	0,84208	0,432022	-0,007521	0,015413	0,001973	0,002343	-0,003760	0,007706
(2)B	-0,007277	0,004686	-1,55285	0,171449	-0,018744	0,004190	-0,003638	0,002343	-0,009372	0,002095
(3)C	**0,033238**	**0,004686**	**7,09271**	**0,000394**	**0,021771**	**0,044704**	**0,016619**	**0,002343**	**0,010886**	**0,022352**
(4)D	0,004057	0,004686	0,86579	0,419872	-0,007409	0,015524	0,002029	0,002343	-0,003705	0,007762
(5)E	-0,007676	0,004686	-1,63803	0,152530	-0,019143	0,003791	-0,003838	0,002343	-0,009571	0,001895
(6)F	0,008824	0,004686	1,88297	0,108707	-0,002643	0,020291	0,004412	0,002343	-0,001321	0,010145
(7)G	-0,004746	0,004686	-1,01273	0,350275	-0,016212	0,006721	-0,002373	0,002343	-0,008106	0,003360
1 e 2	**-0,011743**	**0,004686**	**-2,50598**	**0,046153**	**-0,023210**	**-0,000277**	**-0,005872**	**0,002343**	**-0,011605**	**-0,000138**
1 e 3	0,000654	0,004686	0,13946	0,893649	-0,010813	0,012120	0,000327	0,002343	-0,005407	0,006060
1 e 4	-0,004940	0,004686	-1,05406	0,332440	-0,016406	0,006527	-0,002470	0,002343	-0,008203	0,003264
1 e 5	0,001083	0,004686	0,23113	0,824896	-0,010384	0,012550	0,000542	0,002343	-0,005192	0,006275
1 e 6	0,001454	0,004686	0,31032	0,766812	-0,010012	0,012921	0,000727	0,002343	-0,005006	0,006460
1 e 7	-0,004844	0,004686	-1,03374	0,341113	-0,016311	0,006622	-0,002422	0,002343	-0,008155	0,003311
2 e 3	**-0,011666**	**0,004686**	**-2,48939**	**0,047201**	**-0,023132**	**-0,000199**	**-0,005833**	**0,002343**	**-0,011566**	**-0,000100**
2 e 4	0,003538	0,004686	0,75508	0,478782	-0,007928	0,015005	0,001769	0,002343	-0,003964	0,007503
2 e 5	0,006238	0,004686	1,33125	0,231453	-0,005228	0,017705	0,003119	0,002343	-0,002614	0,008853
2 e 6	0,004535	0,004686	0,96764	0,370595	-0,006932	0,016001	0,002267	0,002343	-0,003466	0,008001
2 e 7	0,003108	0,004686	0,66319	0,531846	-0,008359	0,014575	0,001554	0,002343	-0,004179	0,007287
3 e 4	-0,010445	0,004686	-2,22888	0,067370	-0,021912	0,001022	-0,005222	0,002343	-0,010956	0,000511
3 e 5 = 6 e 7	-0,000125	0,004686	-0,02673	0,979544	-0,011592	0,011341	-0,000063	0,002343	-0,005796	0,005671
3 e 6 = 5 e 7	0,004558	0,004686	0,97270	0,368268	-0,006908	0,016025	0,002279	0,002343	-0,003454	0,008012
3 e 7 = 5 e 6	-0,008401	0,004686	-1,79272	0,123188	-0,019868	0,003066	-0,004201	0,002343	-0,009934	0,001533
4 e 5	0,000922	0,004686	0,19681	0,850477	-0,010544	0,012389	0,000461	0,002343	-0,005272	0,006194
4 e 6	0,000983	0,004686	0,20987	0,840716	-0,010483	0,012450	0,000492	0,002343	-0,005242	0,006225
4 e 7	0,000440	0,004686	0,09398	0,928183	-0,011026	0,011907	0,000220	0,002343	-0,005513	0,005954

Para uma apresentação de forma rápida e clara dos efeitos estatisticamente importantes, utiliza-se o diagrama de Pareto (figura 5). O efeito principal C e as interações AB e BC, cujos retângulos se apresentam a direita da linha divisória (p = 0,05), devem ser considerados no modelo matemático. Os valores ao lado de cada retângulo representam os valores de t da distribuição de Student.

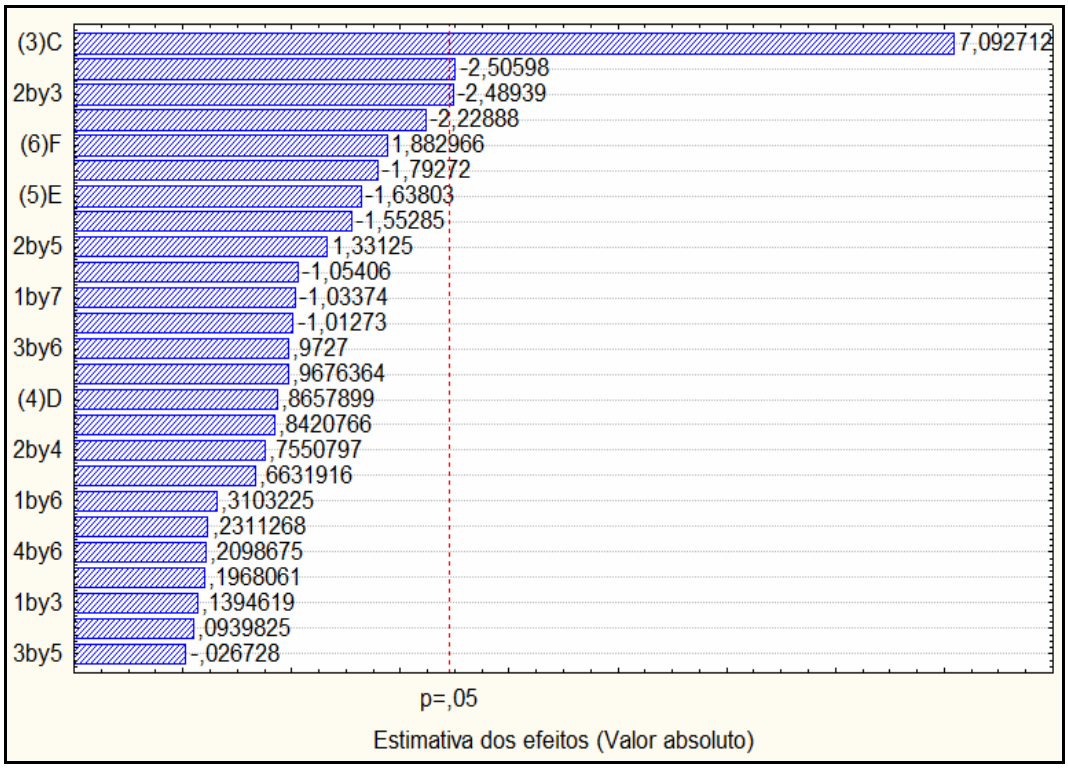


Figura 5. Diagrama de Pareto no planejamento fatorial fracionado 2^{7-2}.

Com o objetivo de se verificar se estatisticamente a variação dos resultados experimentais é produzida por algum(ns) fator(es), utilizou-se a ferramenta de análise de variância (ANOVA). Os testes são realizados com a estatística F. A análise de variância está apresentada na tabela 4.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 4. ANOVA para o planejamento fatorial fracionário 2^{7-2}.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)A	0,000125	1	0,000125	0,70909	0,432022
(2)B	0,000424	1	0,000424	2,41133	0,171449
(3)C	**0,008838**	**1**	**0,008838**	**50,30656**	**0,000394**
(4)D	0,000132	1	0,000132	0,74959	0,419872
(5)E	0,000471	1	0,000471	2,68313	0,152530
(6)F	0,000623	1	0,000623	3,54556	0,108707
(7)G	0,000180	1	0,000180	1,02561	0,350275
1 e 2	**0,001103**	**1**	**0,001103**	**6,27994**	**0,046153**
1 e 3	0,000003	1	0,000003	0,01945	0,893649
1 e 4	0,000195	1	0,000195	1,11104	0,332440
1 e 5	0,000009	1	0,000009	0,05342	0,824896
1 e 6	0,000017	1	0,000017	0,09630	0,766812
1 e 7	0,000188	1	0,000188	1,06862	0,341113
2 e 3	**0,001089**	**1**	**0,001089**	**6,19708**	**0,047201**
2 e 4	0,000100	1	0,000100	0,57015	0,478782
2 e 5	0,000311	1	0,000311	1,77223	0,231453
2 e 6	0,000164	1	0,000164	0,93632	0,370595
2 e 7	0,000077	1	0,000077	0,43982	0,531846
3 e 4	0,000873	1	0,000873	4,96789	0,067370
3 e 5	0,000000	1	0,000000	0,00071	0,979544
3 e 6	0,000166	1	0,000166	0,94615	0,368268
3 e 7	0,000565	1	0,000565	3,21385	0,123188
4 e 5	0,000007	1	0,000007	0,03873	0,850477
4 e 6	0,000008	1	0,000008	0,04404	0,840716
4 e 7	0,000002	1	0,000002	0,00883	0,928183
Erro	0,001054	6	0,000176		
Total	0,016724	31			

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

A análise de variância coincide com a tendência encontrada na tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes. Da mesma forma, o efeito principal (efeito C, temperatura de atomização) e as interações AB e BC apresentam significância estatística. Através desta primeira rodada de experimentos, verificou-se que apenas o efeito da temperatura de atomização influencia na determinação de Pt em urina por GF AAS; no entanto, esta informação contrasta com o relatado na literatura. Assim, para verificar a veracidade das conclusões retiradas das análises estatísticas apresentadas anteriormente, decidiu-se eliminar três dos fatores experimentais e planejar um experimento completo com quatro fatores, com dois níveis cada um (Fatorial 2^{4-0}). Com esse critério, os efeitos de interação que ocorrem no sistema foram identificados com mais precisão. Os parâmetros tipo de ácido (HNO_3), fator de diluição (1+1) e volume de amostra (20 µL) foram fixados. Assim, iniciou-se a otimização multivariada com um planejamento fatorial completo de quatro variáveis (2^4 = 16 experimentos) e dois níveis (alto e baixo). As combinações entre as variáveis e respectivos resultados de absorvância, para a análise estão mostradas na tabela 5. Os ensaios foram feitos de modo aleatório, não na ordem apresentada, e realizados em triplicata.

Tabela 5. Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento fatorial completo 2^{4-0}.

Variável	Descrição	Níveis	
		-1	+1
B	Concentração do diluente (% v/v)	0,3	0,6
C	Temperatura de atomização (ºC)	2300	2400
D	Temperatura de pirólise (ºC)	1400	1600
E	Rampa de atomização (ºC)	1700	1800

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

O planejamento fatorial completo dos dados contidos na tabela 5 também foi realizado utilizando a “Análise e Planejamento de Experimentos” do programa Statistica 7.0 Statsoft. Através deste programa, tratamentos estatísticos foram aplicados no “Planejamento Padrão Box-Hunter $2^{xx}(k-p)$”, obtendo-se várias tabelas e gráficos, sendo os mais importantes, para este caso, apresentados a seguir (tabela 6 e 7).

Tabela 6. Combinações entre as variáveis e os respectivos resultados de absorbância no planejamento 2^{4-0}.

Ensaio	B	C	D	E	Absorvância Integrada
1	-1	-1	-1	-1	0,130
2	+1	-1	-1	-1	0,118
3	-1	+1	-1	-1	0,146
4	+1	+1	-1	-1	0,153
5	-1	-1	+1	-1	0,129
6	+1	-1	+1	-1	0,127
7	-1	+1	+1	-1	0,170
8	+1	+1	+1	-1	0,142
9	-1	-1	-1	+1	0,125
10	+1	-1	-1	+1	0,107
11	-1	+1	-1	+1	0,165
12	+1	+1	-1	+1	0,151
13	-1	-1	+1	+1	0,139
14	+1	-1	+1	+1	0,131
15	-1	+1	+1	+1	0,159
16	+1	+1	+1	+1	0,163
17	-1	-1	-1	-1	0,111
18	+1	-1	-1	-1	0,119
19	-1	+1	-1	-1	0,146
20	+1	+1	-1	-1	0,153

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

21	-1	-1	+1	-1	0,131
22	+1	-1	+1	-1	0,126
23	-1	+1	+1	-1	0,169
24	+1	+1	+1	-1	0,143
25	-1	-1	-1	+1	0,124
26	+1	-1	-1	+1	0,108
27	-1	+1	-1	+1	0,167
28	+1	+1	-1	+1	0,151
29	-1	-1	+1	+1	0,139
30	+1	-1	+1	+1	0,131
31	-1	+1	+1	+1	0,157
32	+1	+1	+1	+1	0,162
33	-1	-1	-1	-1	0,104
34	+1	-1	-1	-1	0,117
35	-1	+1	-1	-1	0,147
36	+1	+1	-1	-1	0,153
37	-1	-1	+1	-1	0,129
38	+1	-1	+1	-1	0,125
39	-1	+1	+1	-1	0,171
40	+1	+1	+1	-1	0,142
41	-1	-1	-1	+1	0,126
42	+1	-1	-1	+1	0,107
43	-1	+1	-1	+1	0,163
44	+1	+1	-1	+1	0,150
45	-1	-1	+1	+1	0,141
46	+1	-1	+1	+1	0,129
47	-1	+1	+1	+1	0,157
48	+1	+1	+1	+1	0,152

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

A tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes (tabela 7) nos fornece, através da análise da probabilidade, p, quais os efeitos e suas interações que são estatisticamente significantes, com 95% de confiança. Os efeitos ou interações que apresentam $p<0,05$ são significativos, sendo os demais sem importância estatística. Assim, os efeitos B (concentração do diluente), C (temperatura de atomização), D (temperatura de pirólise) e E (rampa de atomização) assim como a interação CD, todos em destaque em negrito, são os efeitos importantes neste experimento.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 7. Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial completo 2^{4-0}.

	Efeito	Desvio padrão	t(6)	P	-95%	+95%	Coeficiente	Desvio padrão	-95%	+95%
Média/ Interação	0,139746	0,001038	134,6884	0	0,137644	0,141848	0,139746	0,001038	0,137644	0,141848
(1)B	**-0,007803**	**0,002075**	**-3,76046**	**0,000586**	**-0,01201**	**-0,0036**	**-0,0039**	**0,001038**	**-0,006**	**-0,0018**
(2)C	**0,031776**	**0,002075**	**15,31293**	**1,36E-17**	**0,027571**	**0,03598**	**0,015888**	**0,001038**	**0,013786**	**0,01799**
(3)D	**0,009437**	**0,002075**	**4,547575**	**5,65E-05**	**0,005232**	**0,013641**	**0,004718**	**0,001038**	**0,002616**	**0,006821**
(4)E	**0,004197**	**0,002075**	**2,022394**	**0,050409**	**-7,9E-06**	**0,008401**	**0,002098**	**0,001038**	**-3,9E-06**	**0,004201**
1 e 2	-0,00084	0,002075	-0,4044	0,688248	-0,00504	0,003365	-0,00042	0,001038	-0,00252	0,001683
1 e 3	-0,00224	0,002075	-1,08107	0,286661	-0,00645	0,001961	-0,00112	0,001038	-0,00322	0,000981
1 e 4	-0,00225	0,002075	-1,08429	0,285253	-0,00645	0,001955	-0,00113	0,001038	-0,00323	0,000977
2 e 3	-0,00576	0,002075	-2,77457	0,008614	-0,00996	-0,00155	-0,00288	0,001038	-0,00498	-0,00078
2 e 4	0,000878	0,002075	0,422871	0,674837	-0,00333	0,005082	0,000439	0,001038	-0,00166	0,002541
3 e 4	0,000348	0,002075	0,167863	0,867605	-0,00386	0,004553	0,000174	0,001038	-0,00193	0,002276

A análise de variância, ANOVA, apresentada na tabela 8, coincide com a tendência encontrada na tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes. Da mesma forma, os efeitos com significância estatística são os efeitos B, C, D e E, assim como a interação CD, que apresentam $p<0,05$.

Tabela 8. ANOVA para o planejamento fatorial completo 2^{4-0}.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)B	**0,000731**	**1**	**0,000731**	**14,14109**	**0,000586**
(2)C	**0,012116**	**1**	**0,012116**	**234,4857**	**1,36E-17**
(3)D	**0,001069**	**1**	**0,001069**	**20,68044**	**5,65E-05**
(4)E	**0,000211**	**1**	**0,000211**	**4,090076**	**0,050409**
1 e 2	8,45E-06	1	8,45E-06	0,163538	0,688248
1 e 3	6,04E-05	1	6,04E-05	1,168719	0,286661
1 e 4	6,07E-05	1	6,07E-05	1,175676	0,285253
2 e 3	**0,000398**	**1**	**0,000398**	**7,698221**	**0,008614**
2 e 4	9,24E-06	1	9,24E-06	0,17882	0,674837
3 e 4	1,46E-06	1	1,46E-06	0,028178	0,867605
Erro	0,001912	37	5,17E-05		
Total	0,016577	47			

O programa também nos fornece o R^2 que é chamado coeficiente de determinação do modelo. O valor de R^2 máximo é 1 e, quanto mais próximo de 1, melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas. Para o modelo desenvolvido, R^2 é igual a 0,8535, ou seja, 85,35% da variação média é explicada pela regressão utilizada, o que é satisfatório. Pelo diagrama de Pareto, novamente observa-se que os efeitos com significância estatística são os efeitos B, C, D e E, assim como a interação CD, cujos retângulos se apresentam a

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

direita da linha divisória (p=0,05). Portanto, são esses os parâmetros e intereções que devem ser considerados no modelo matemático.

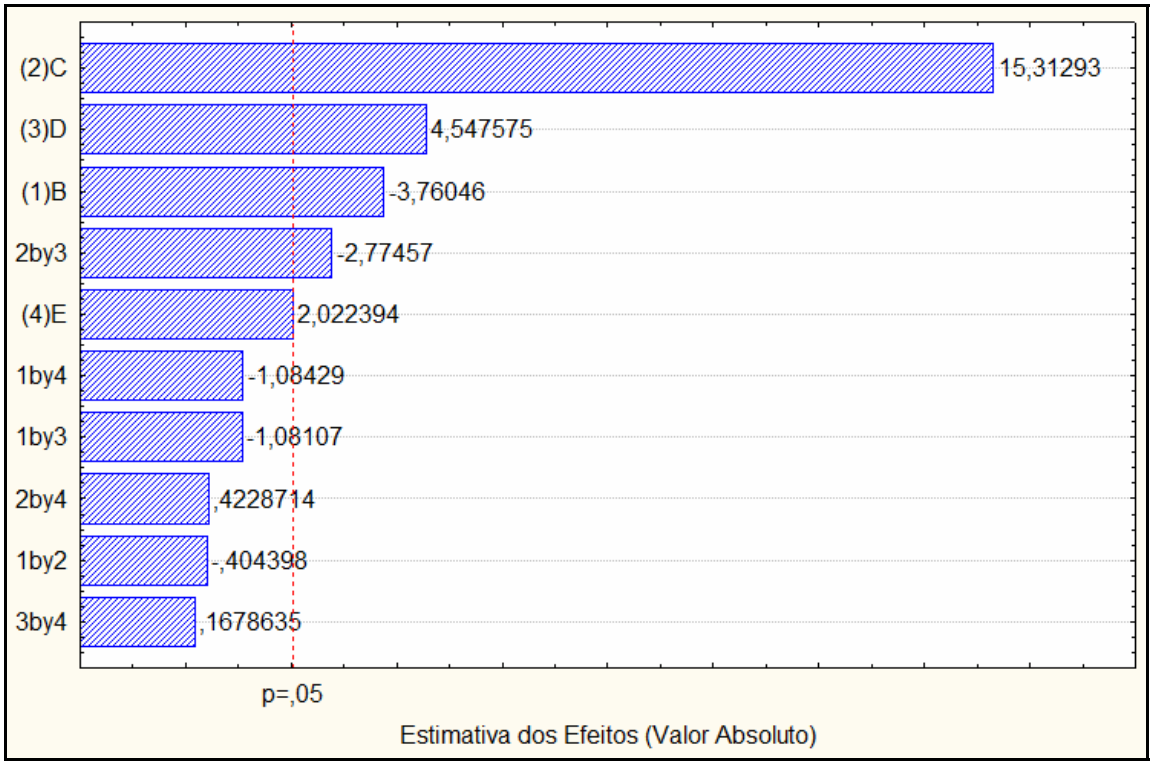


Figura 6. Diagrama de Pareto no planejamento fatorial completo 2^{4-0}.

Através deste segundo experimento, pôde-se verificar que a concentração do diluente, a temperatura de pirólise, a temperatura de atomização e a rampa de atomização são estatisticamente significativos na determinação de platina em urina por GF AAS. O próximo passo, portanto, tratou de determinar as condições ótimas para a determinação de platina na urina. Para isso, fez-se o uso da metodologia de superfície de resposta (MSR). A metodologia de superfícies de resposta tem duas etapas distintas (modelagem e deslocamento), que são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o intuito de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples à resposta obtida com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

O caminho de máxima inclinação pode ser determinado algebricamente, a partir dos coeficientes do modelo. No caso, em que temos uma superfície de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

resposta determinada por 4 fatores, o caminho de máxima inclinação é proporcional ao módulo e aos sinais dos coeficientes do modelo. Para traçar este caminho, escolheu-se o fator temperatura de atomização, por apresentar maior coeficiente, para servir de base. Como este fator apresenta coeficiente positivo, escolheu-se o nível máximo como ponto central para o próximo experimento. Assim, determinou-se o deslocamento dos demais fatores, o que pode ser visto na tabela 9 e 10.

$$\Delta x_B = \frac{-0{,}007803}{0{,}031776} = -0{,}025 \qquad \Delta x_C = \frac{0{,}031776}{0{,}031776} = 1$$

$$\Delta x_D = \frac{0{,}009437}{0{,}031776} = 0{,}30 \qquad \Delta x_E = \frac{0{,}004197}{0{,}031776} = 0{,}13$$

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 9. Variáveis estudadas com os respectivos níveis no terceiro experimento

Variável	Descrição	Níveis	
		-1	+1
B	Concentração do diluente (% v/v)	0,20	0,30
C	Temperatura de atomização (ºC)	2350	2450
D	Temperatura de pirólise (ºC)	1600	1660
E	Rampa de atomização (ºC)	1800	1813

Tabela 10. Combinações entre as variáveis e os respectivos resultados de absorvância no terceiro planejamento.

Ensaio	B	C	D	E	Absorvância
1	-1	-1	-1	-1	0,136
2	+1	-1	-1	-1	0,136
3	-1	+1	-1	-1	0,151
4	+1	+1	-1	-1	0,168
5	-1	-1	+1	-1	0,135
6	+1	-1	+1	-1	0,145
7	-1	+1	+1	-1	0,151
8	+1	+1	+1	-1	0,156
9	-1	-1	-1	+1	0,118
10	+1	-1	-1	+1	0,145
11	-1	+1	-1	+1	0,149
12	+1	+1	-1	+1	0,155
13	-1	-1	+1	+1	0,131
14	+1	-1	+1	+1	0,127
15	-1	+1	+1	+1	0,154
16	+1	+1	+1	+1	0,161
17	-1	-1	-1	-1	0,133
18	+1	-1	-1	-1	0,135
19	-1	+1	-1	-1	0,150
20	+1	+1	-1	-1	0,165
21	-1	-1	+1	-1	0,135

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

22	+1	-1	+1	-1	0,142
23	-1	+1	+1	-1	0,153
24	+1	+1	+1	-1	0,156
25	-1	-1	-1	+1	0,119
26	+1	-1	-1	+1	0,141
27	-1	+1	-1	+1	0,149
28	+1	+1	-1	+1	0,151
29	-1	-1	+1	+1	0,129
30	+1	-1	+1	+1	0,125
31	-1	+1	+1	+1	0,153
32	+1	+1	+1	+1	0,159
33	-1	-1	-1	-1	0,133
34	+1	-1	-1	-1	0,131
35	-1	+1	-1	-1	0,148
36	+1	+1	-1	-1	0,165
37	-1	-1	+1	-1	0,132
38	+1	-1	+1	-1	0,142
39	-1	+1	+1	-1	0,152
40	+1	+1	+1	-1	0,157
41	-1	-1	-1	+1	0,119
42	+1	-1	-1	+1	0,143
43	-1	+1	-1	+1	0,149
44	+1	+1	-1	+1	0,151
45	-1	-1	+1	+1	0,132

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

46	+1	-1	+1	+1	0,127
47	-1	+1	+1	+1	0,157
48	+1	+1	+1	+1	0,159

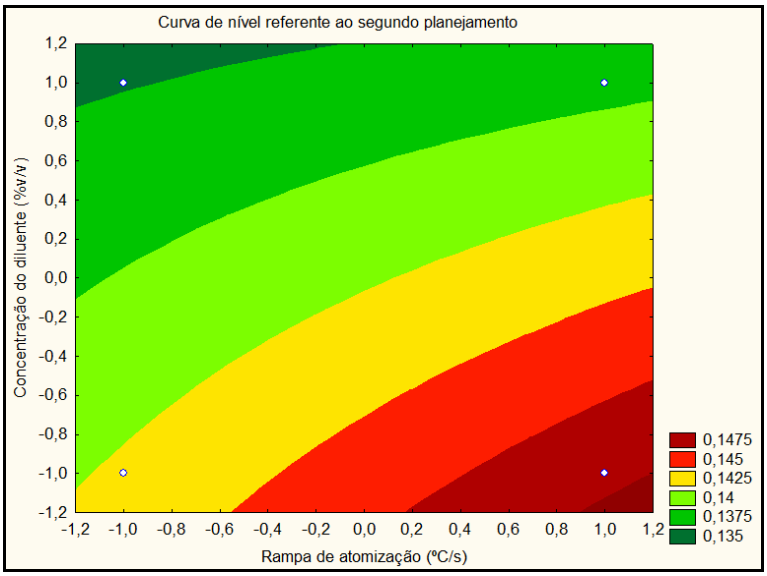
Analisando a tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes (tabela 11) vemos que os efeitos ou interações significativos são: efeitos B (concentração do ácido), C (temperatura de atomização), E (rampa de atomização) e a interação BD.

Comparando o experimento anterior com este experimento, através das tabelas 7 e 11, verifica-se uma inversão dos sinais dos coeficientes referentes à concentração do diluente e a rampa de atomização. No experimento anterior o sinal aumentava com a diminuição da concentração do diluente e com o aumento da rampa de atomização, sendo que, neste experimento, ocorre o inverso, isto é, o sinal aumenta com o aumento da concentração do diluente e com a diminuição da rampa de atomização, o que pode ser verificado na figura 7. Como a temperatura de atomização não teve significância no intervalo estudado neste experimento, pode-se dizer, através dos resultados até aqui obtidos, que 1600 ºC é o valor ótimo para este fator.

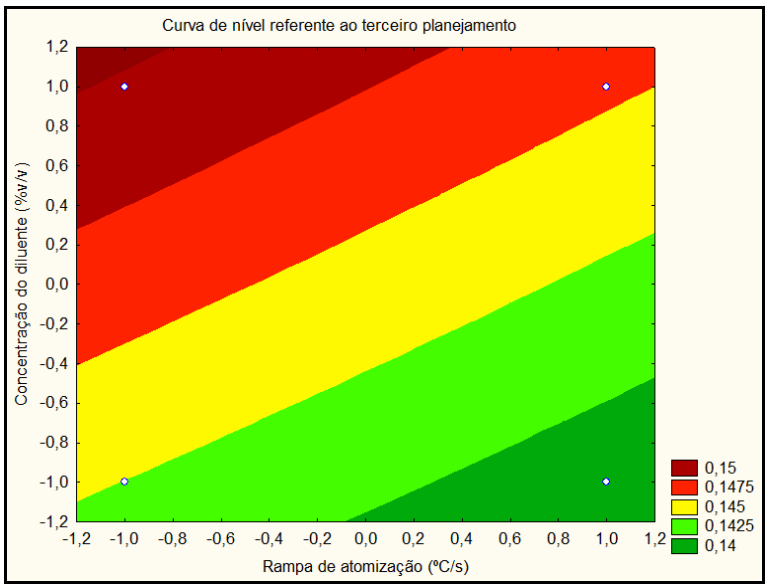
PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 11. Estimativa dos efeitos e coeficientes para o terceiro planejamento.

	Efeito	Desvio padrão	t(6)	P	-95%	+95%	Coeficiente	Desvio padrão	-95%	+95%
Média/ Interação	**0,144046**	**0,000762**	**189,0878**	**0**	**0,142503**	**0,14559**	**0,144046**	**0,000762**	**0,142503**	**0,14559**
(1)B	**0,007029**	**0,001524**	**4,613551**	**4,62E-05**	**0,003942**	**0,010116**	**0,003515**	**0,000762**	**0,001971**	**0,005058**
(2)C	**0,021929**	**0,001524**	**14,39308**	**9,74E-17**	**0,018842**	**0,025016**	**0,010965**	**0,000762**	**0,009421**	**0,012508**
(3)D	0,001037	0,001524	0,68041	0,500481	-0,00205	0,004124	0,000518	0,000762	-0,00103	0,002062
(4)E	**-0,00407**	**0,001524**	**-2,67405**	**0,011089**	**-0,00716**	**-0,00099**	**-0,00204**	**0,000762**	**-0,00358**	**-0,00049**
1 e 2	-0,0001	0,001524	-0,06728	0,946725	-0,00319	0,002985	-5,1E-05	0,000762	-0,00159	0,001492
1 e 3	**-0,00351**	**0,001524**	**-2,30049**	**0,027158**	**-0,00659**	**-0,00042**	**-0,00175**	**0,000762**	**-0,0033**	**-0,00021**
1 e 4	-0,00021	0,001524	-0,1351	0,893267	-0,00329	0,002881	-0,0001	0,000762	-0,00165	0,001441
2 e 3	0,000173	0,001524	0,113766	0,910038	-0,00291	0,00326	8,67E-05	0,000762	-0,00146	0,00163
2 e 4	0,002201	0,001524	1,444504	0,157013	-0,00089	0,005288	0,0011	0,000762	-0,00044	0,002644
3 e 4	0,000843	0,001524	0,553517	0,583239	-0,00224	0,00393	0,000422	0,000762	-0,00112	0,001965



(a)



(b)

Figura 7. Comparação das curvas de nível: (a) curva de nível referente ao segundo planejamento e (b) curva de nível referente ao terceiro planejamento.

A análise de variância, ANOVA, apresentada na tabela 12, coincide com a tendência encontrada na tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes. Da mesma forma, os efeitos com significância estatística são os efeitos B, C, E e a interação BD, que apresentam $p < 0,05$.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 12. ANOVA para o terceiro planejamento.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)B	**0,000593**	**1**	**0,000593**	**21,2849**	**0,000046**
(2)C	**0,005771**	**1**	**0,005771**	**207,160**	**0,000000**
(3)D	0,000013	1	0,000013	0,4630	0,500481
(4)E	**0,000199**	**1**	**0,000199**	**7,1506**	**0,011089**
1 e 2	0,000000	1	0,000000	0,0045	0,946725
1 e 3	**0,000147**	**1**	**0,000147**	**5,2922**	**0,027158**
1 e 4	0,000001	1	0,000001	0,0183	0,893267
2 e 3	0,000000	1	0,000000	0,0129	0,910038
2 e 4	0,000058	1	0,000058	2,0866	0,157013
3 e 4	0,000009	1	0,000009	0,3064	0,583239
Erro	0,001031	37	0,000028		
Total	0,007821	47			

Quando se quer verificar a curvatura de um plano, ou seja, a existência de termos quadráticos no modelo de regressão, pode-se utilizar o planejamento composto central. Esta técnica consiste em acrescentar pontos axiais ao experimento fatorial 2^k, com pontos centrais. Assim, mais próximo dos valores ótimos, fez-se um planejamento composto central com as três variáveis B, C e E: 2^3 experimentos (8), referentes ao planejamento fatorial, 2x3 experimentos axiais (6), com $\alpha = \pm\sqrt[4]{2^3}$ e 4 ensaios no ponto central. As variáveis aqui estudadas, com os respectivos valores para cada nível, estão mostradas na tabela 13. Os experimentos foram realizados de modo aleatório, e não na ordem apresentada.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 13. Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento composto central.

Variável	Descrição	Nível				
		-1,68	-1	0	+1	1,68
B	Concentração do ácido	0,14	0,2	0,30	0,40	0,46
C	Temperatura de atomização (ºC)	2400	2420	2450	2480	2500
E	Rampa de atomização (ºC/s)	1790	1800	1815	1830	1840

Foi realizado também o planejamento composto central dos dados contidos na tabela 14, utilizando a "Analise e Planejamento de Experimentos/Composto Central" do programa Statística 7.0 Statsoft. Através deste programa, podem ser obtidos várias tabelas e gráficos, sendo os mais importantes apresentados a seguir.

Tabela 14. Combinações entre as variáveis e os respectivos resultados de absorvância no planejamento composto central.

Ensaio	Concentração	Temperatura de atomização	Rampa	Absorvância Integrada
1	-1	-1	-1	0,073
2	1	-1	-1	0,088
3	-1	1	-1	0,080
4	1	1	-1	0,098
5	-1	-1	1	0,074
6	1	-1	1	0,084
7	-1	1	1	0,082
8	1	1	1	0,093
9	-1,68	0	0	0,084

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

10	1,68	0	0	0,089
11	0	-1,68	0	0,081
12	0	1,68	0	0,095
13	0	0	-1,68	0,089
14	0	0	1,68	0,090
15	0	0	0	0,087
16	0	0	0	0,093
17	0	0	0	0,098
18	-1	-1	-1	0,072
19	1	-1	-1	0,090
20	-1	1	-1	0,078
21	1	1	-1	0,090
22	-1	-1	1	0,072
23	1	-1	1	0,082
24	-1	1	1	0,078
25	1	1	1	0,096
26	-1,68	0	0	0,084
27	1,68	0	0	0,084
28	0	-1,68	0	0,082
29	0	1,68	0	0,089
30	0	0	-1,68	0,090
31	0	0	1,68	0,087
32	0	0	0	0,083
33	0	0	0	0,094

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

34	0	0	0	0,089
35	-1	-1	-1	0,072
36	1	-1	-1	0,088
37	-1	1	-1	0,081
38	1	1	-1	0,094
39	-1	-1	1	0,078
40	1	-1	1	0,081
41	-1	1	1	0,076
42	1	1	1	0,092
43	-1,68	0	0	0,085
44	1,68	0	0	0,085
45	0	-1,68	0	0,081
46	0	1,68	0	0,097
47	0	0	-1,68	0,089
48	0	0	1,68	0,087
49	0	0	0	0,081
50	0	0	0	0,092
51	0	0	0	0,090

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 15. Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento composto central.

	Efeito	Desvio padrão	t(6)	p	-95%	+95%	Coeficiente	Desvio padrão	-95%	+95%
Média/ Interação	**0,090140**	**0,001564**	**57,62512**	**0,000000**	**0,086981**	**0,093299**	**0,090140**	**0,001564**	**0,086981**	**0,093299**
(1)B (L)	**0,008163**	**0,001470**	**5,55321**	**0,000002**	**0,005195**	**0,011132**	**0,004082**	**0,000735**	**0,002597**	**0,005566**
B (Q)	**-0,005075**	**0,001619**	**-3,13377**	**0,003184**	**-0,008346**	**-0,001804**	**-0,002538**	**0,000810**	**-0,004173**	**-0,000902**
(2)C (L)	**0,007353**	**0,001470**	**5,00171**	**0,000011**	**0,004384**	**0,010321**	**0,003676**	**0,000735**	**0,002192**	**0,005161**
C (Q)	**-0,003491**	**0,001619**	**-2,15548**	**0,037046**	**-0,006761**	**-0,000220**	**-0,001745**	**0,000810**	**-0,003381**	**-0,000110**
(3)E (L)	-0,001188	0,001470	-0,80847	0,423488	-0,004157	0,001780	-0,000594	0,000735	-0,002079	0,000890
E (Q)	-0,002531	0,001619	-1,56259	0,125835	-0,005801	0,000740	-0,001265	0,000810	-0,002901	0,000370
1 e 2	0,001389	0,001920	0,72350	0,473481	-0,002488	0,005266	0,000695	0,000960	-0,001244	0,002633
1 e 3	-0,001854	0,001920	-0,96571	0,339853	-0,005731	0,002023	-0,000927	0,000960	-0,002866	0,001012
2 e 3	0,000430	0,001920	0,22380	0,824022	-0,003448	0,004307	0,000215	0,000960	-0,001724	0,002153

Analisando a tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes (tabela 15), vemos que os efeitos ou interações significativos são os efeitos B (Linear), B (Quadrático), C (Linear) e C (Quadrático).

A análise de variância, ANOVA, apresentada na tabela 16, coincide com a tendência encontrada na tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes. Da mesma forma, os efeitos com significância estatística são B (Linear), B (Quadrático), C (Linear) e C (Quadrático).

Tabela 16. ANOVA para o planejamento composto central.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)B (L)	**0,000682**	**1**	**0,000682**	**30,83814**	**0,000002**
B (Q)	**0,000217**	**1**	**0,000217**	**9,82054**	**0,003184**
(2)C (L)	**0,000553**	**1**	**0,000553**	**25,01710**	**0,000011**
C (Q)	**0,000103**	**1**	**0,000103**	**4,64609**	**0,037046**
(3)E (L)	0,000014	1	0,000014	0,65362	0,423488
E (Q)	0,000054	1	0,000054	2,44170	0,125835
1 e 2	0,000012	1	0,000012	0,52345	0,473481
1 e 3	0,000021	1	0,000021	0,93259	0,339853
2 e 3	0,000001	1	0,000001	0,05009	0,824022
Erro	0,000907	41	0,000022		
Total	0,002447	50			

Analisando a tabela de coeficientes de regressão (tabela 17), pode-se verificar que os efeitos com significância estatística são os efeitos B (Linear), B (Quadrático), C (Linear) e C (Quadrático), sendo os erros padrões menores que os valores dos efeitos. Este resultado coincide com a tendência encontrada na tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes e na tabela ANOVA.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 17. Coeficientes de regressão para o planejamento composto central.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(41)	p	-95%	+95%
(1)B (L)	**0,090140**	**0,001564**	**57,62512**	**0,000000**	**0,086981**	**0,093299**
B (Q)	**0,004082**	**0,000735**	**5,55321**	**0,000002**	**0,002597**	**0,005566**
(2)C (L)	**-0,002538**	**0,000810**	**-3,13377**	**0,003184**	**-0,004173**	**-0,000902**
C (Q)	**0,003676**	**0,000735**	**5,00171**	**0,000011**	**0,002192**	**0,005161**
(3)E (L)	-0,001745	0,000810	-2,15548	0,037046	-0,003381	-0,000110
E (Q)	-0,000594	0,000735	-0,80847	0,423488	-0,002079	0,000890
1 e 2	-0,001265	0,000810	-1,56259	0,125835	-0,002901	0,000370
1 e 3	0,000695	0,000960	0,72350	0,473481	-0,001244	0,002633
2 e 3	-0,000927	0,000960	-0,96571	0,339853	-0,002866	0,001012

O diagrama de Pareto (figura 8) mostra de forma rápida e clara os efeitos estatisticamente significativos, B e C linear e B e C quadrático, cujos retângulos se apresentam a direta da linha divisória (p=0,05).

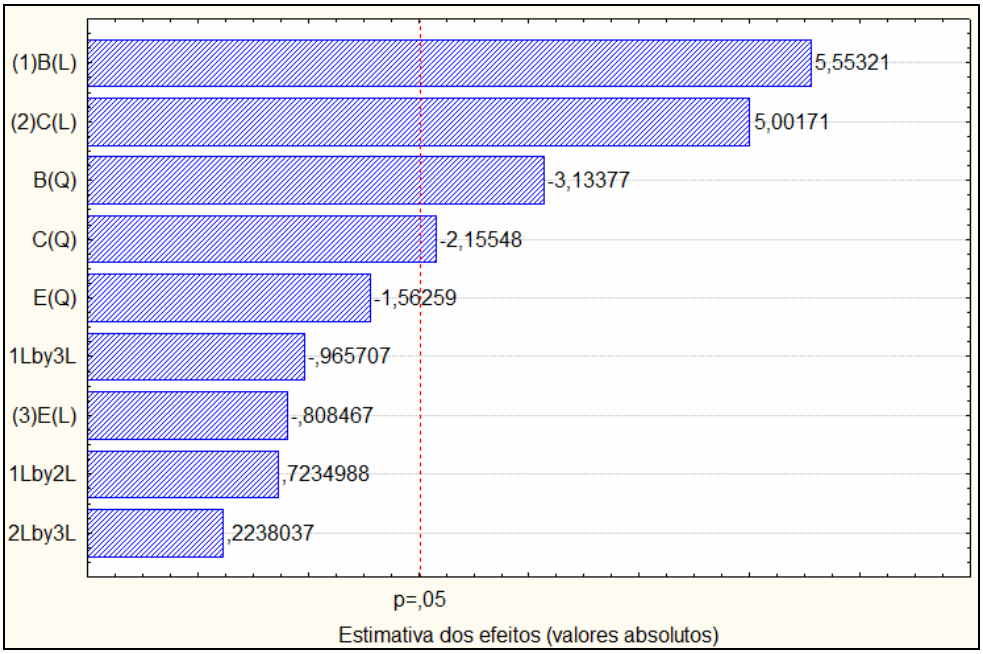


Figura 8. Diagrama de Pareto para o planejamento composto central.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Na figura 9 está mostrado o gráfico que relaciona os valores observados com os valores previstos. Quanto mais próximos os pontos estão da reta, maior é a explicação do sistema pela regressão utilizada. A dispersão dos pontos neste gráfico indica que o modelo tem uma capacidade limitada de explicar a variabilidade do sistema (R^2 = 0,63).

As figuras 10 e 11 apresentam a variação dos resíduos (diferença entre o valor observado e o previsto) deixados pelo ajuste do modelo. Pode-se verificar que não há tendência e os resíduos parecem flutuar aleatoriamente em torno do valor zero. Caso houvesse tendência, o modelo proposto não estaria ajustado.

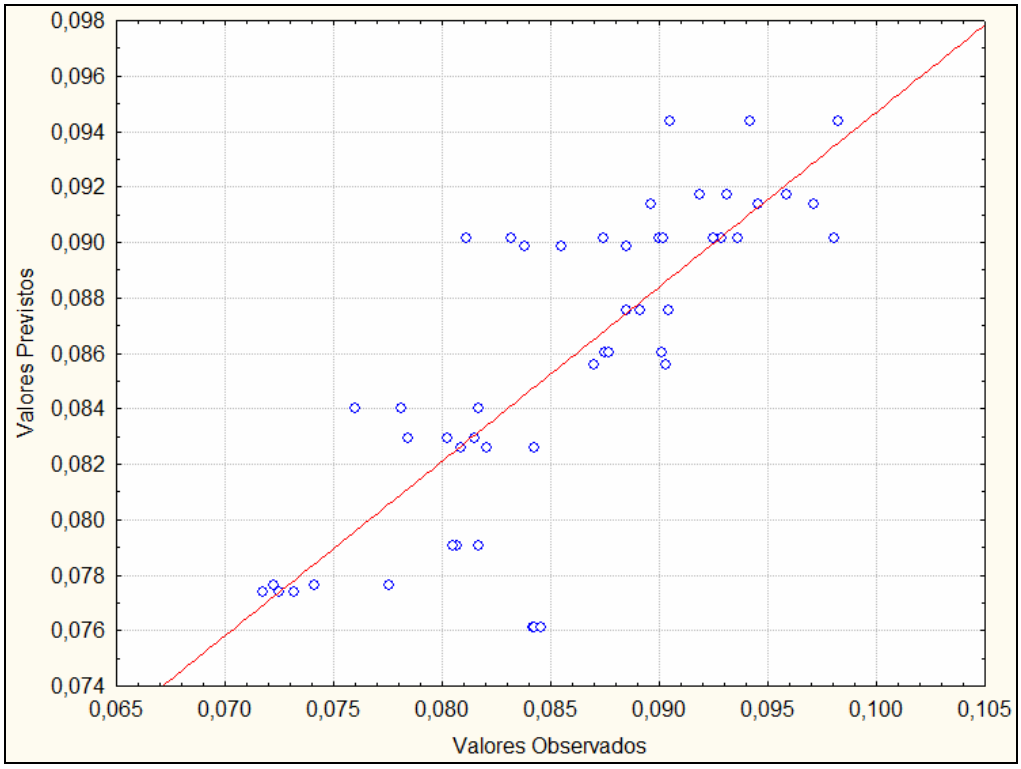


Figura 9. Valores observados x valores previstos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

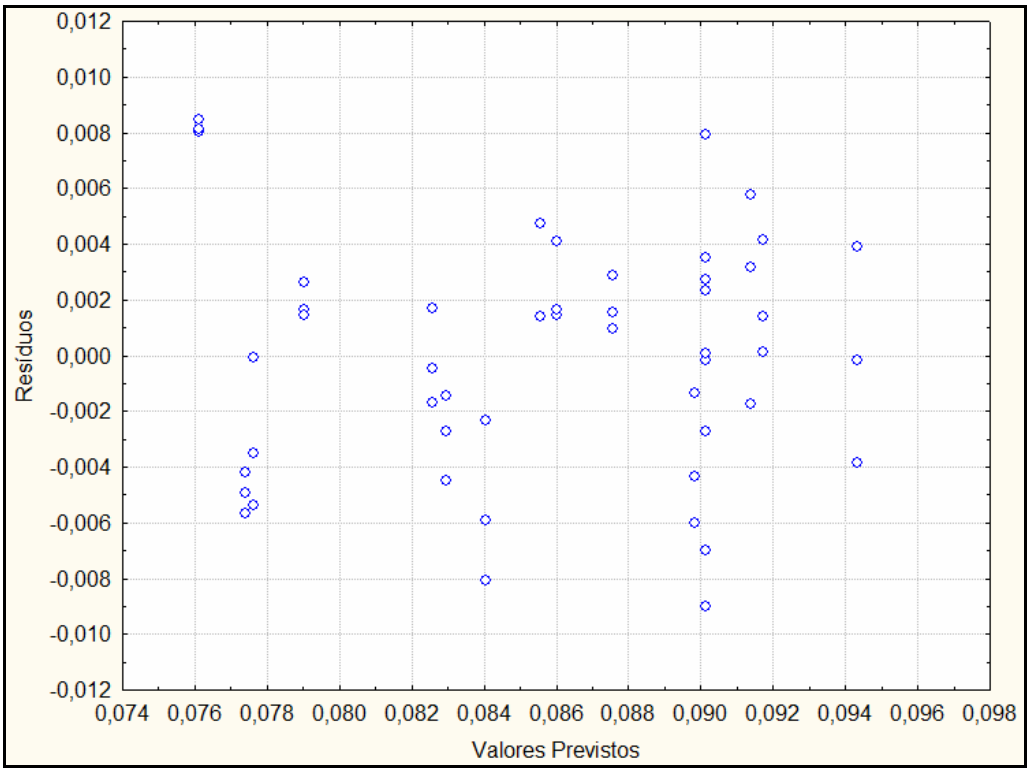


Figura 10. Valores previstos x resíduos.

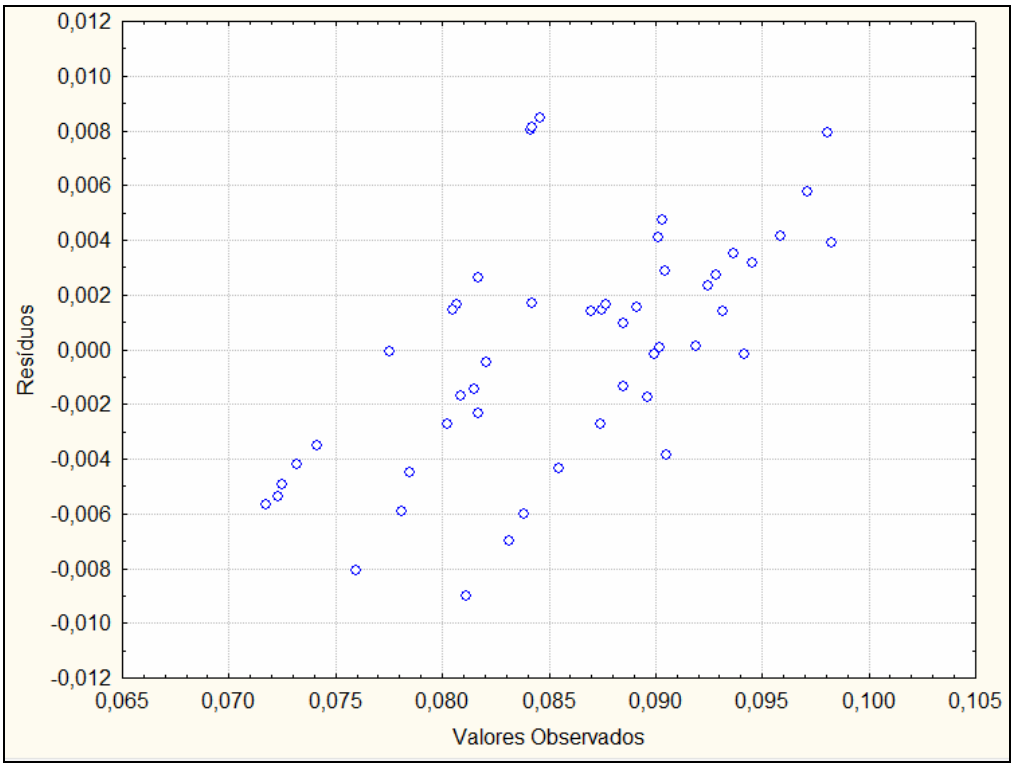


Figura 11. Valores observados x resíduos.

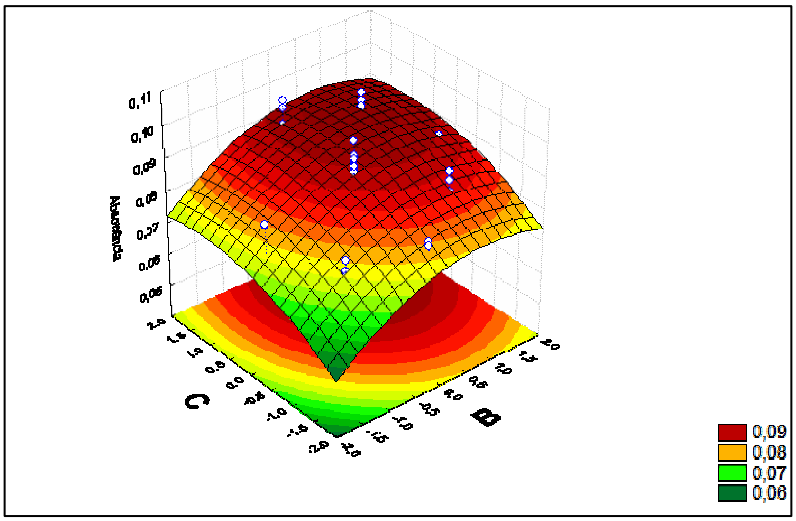
PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

A figura 12 representa a superfície de resposta tridimensional gerada a partir do modelo ajustado. Uma vez identificada a região que contém o ponto máximo, deve-se determinar quais os valores das variáveis independentes (efeitos) que levam ao máximo da variável de resposta, absorvância neste caso. Para tal, deriva-se o modelo de segunda ordem em relação a cada variável independente e iguala-se a zero. O ponto em que as variáveis independentes anulam essas derivadas é chamado de ponto crítico, estacionário ou de máximo, e estão mostrados na tabela 18, juntamente com as faixas dos valores estudados, que se mostraram adequadas por conter os valores críticos.

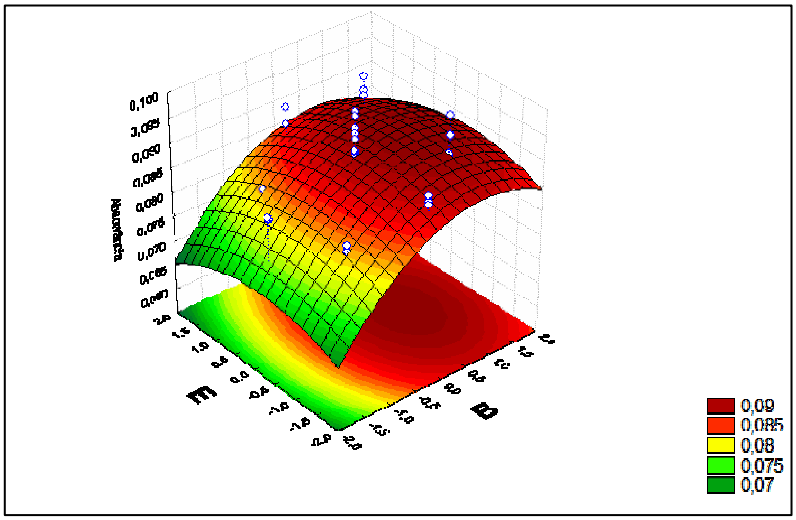
Uma outra técnica utilizada, para encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas, ou no mínimo as mantenha em faixas desejáveis, é usar o procedimento da otimização com restrição, utilizando métodos de programação não-linear. O programa Statistica 7.0 utiliza a função desejabilidade, que consiste em converter primeiro cada resposta y_i em uma função individual de desejabilidade d_i, que varia em uma faixa de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for aquela que se deseja, $d_i = 1$, e se a resposta estiver fora da região aceitável, $d_i = 0$. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global, que é a média geométrica das m desejabilidades individuais ($D = (d_1.d_2...dm)^{1/m}$).

Observando a figura 13, verifica-se que os três primeiros perfis são relativos à variação da absorvância com cada fator, mantendo fixo os outros no valor crítico. O quarto perfil mostra a desejabilidade da absorvância, ou seja, a faixa da resposta de desejabilidade aceitável ($0< d_i \leq 1$). Quanto maior o valor de D, mais conveniente é a resposta do sistema, ou seja, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo de D é a condição otimizada do sistema. Os três últimos perfis mostram a desejabilidade individual para cada fator e a desejabilidade global igual a 0,84864.

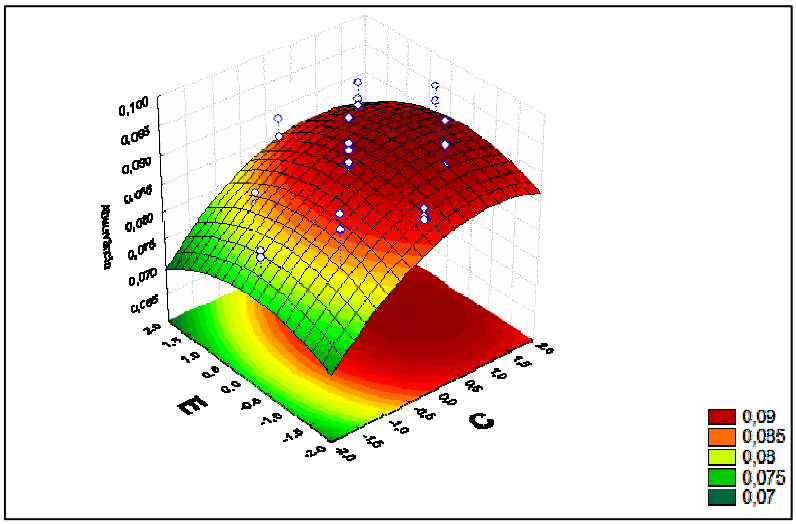
PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA



(a)



(b)



(c)

Figura 12. Superfície de Resposta: (a) BxC, E fixado no valor crítico; (b) BxE, C fixado no valor crítico e (c) CxE, B fixado no valor crítico.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 18. Faixa dos valores estudados e o valor crítico

	Mínimo		Crítico		Máximo	
	Real	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado
B (%v/v)	0,14	-1,68	0,40	1,0683	0,46	+1,68
C (ºC)	2400	-1,68	2487	1,2336	2500	+1,68
E (ºC/s)	1790	-1,68	1807	-0,5214	1840	+1,68

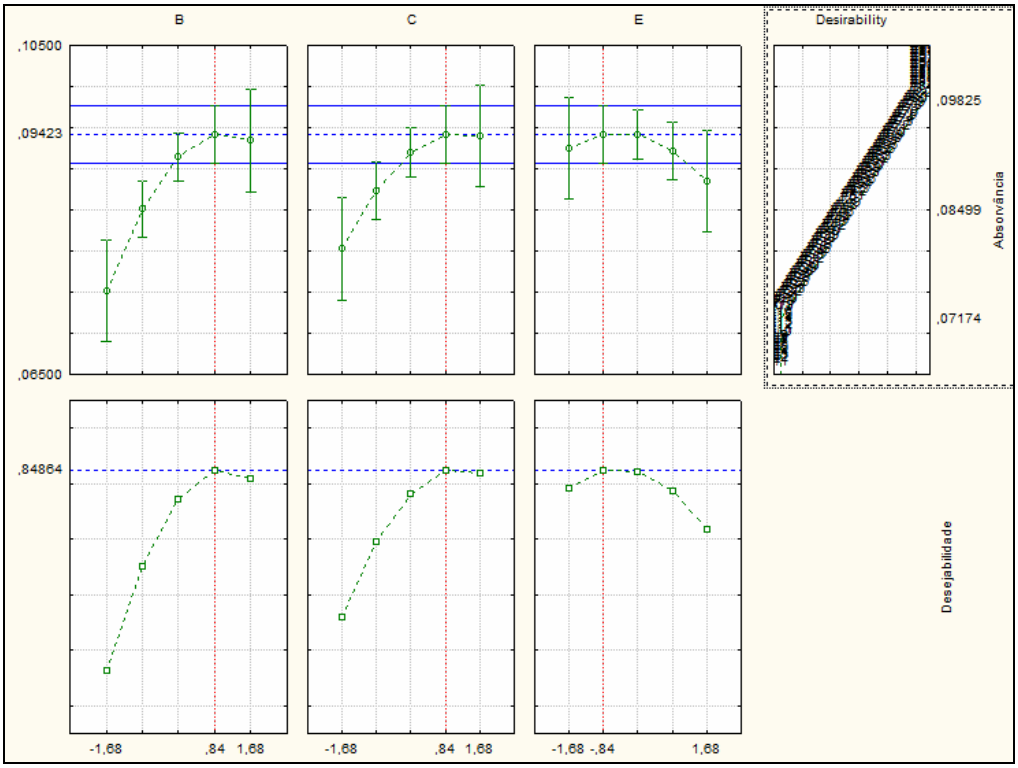


Figura 13. Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento composto central.

A seguir, tem-se na tabela 19 a condição final otimizada para o programa de temperatura otimizado, informando-se também os valores ótimos para os outros fatores.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 19. Programa de temperatura otimizado[(a)].

Etapa	Temperatura (ºC)	Rampa (ºC/s)	Permanência (s)	Vazão do gas
Secagem	90	20	10	max
Secagem	120	15	15	max
Pirólise	900	100	10	max
Pirólise	1600	200	10	max
AZ	1600	0	6	stop
Atomização	2480	1800	5	stop
Limpeza	2600	1000	3	max

(a) Amostra diluída 1+1 com ácido nítrico, 0,40%v/v; volume injetado, 20 µL.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.1.2.
Procedimentos de calibração

Utilizando-se as condições otimizadas, realizaram-se os testes para definição do procedimento de calibração. Para cada curva de calibração foram calculados os seus respectivos coeficientes de correlação e angulares, pelo método dos mínimos quadrados. Embora estas análises não tenham sido realizadas num mesmo dia, ficando sujeitas às flutuações instrumentais, tomou-se o cuidado de se normalizar os resultados em relação a uma curva de calibração aquosa obtida sempre nas mesmas condições, a partir de soluções de calibração preparadas com Pt^{2+} em HNO_3 0,2 %v/v, tornando todos os resultados comparáveis pela razão de inclinação entre os coeficientes angulares das curvas obtidas em relação à curva de referência.

Dez diferentes amostras de urina foram estudadas, sendo coletadas de indivíduos com diferentes idades e sexo. Verificou-se que, mesmo nas condições otimizadas, a sensibilidade no meio aquoso foi significativamente maior que em urina (figura 14). No entanto, as diferentes formas de platina estudadas apresentaram mesma sensibilidade em urina, como pode ser observado na figura 15 e na tabela 20. Visando contornar o efeito multiplicativo de matriz observado, foram adicionados à amostra 5µL de solução de Triton X-100 0,5%

v/v, diretamente no forno de grafite, antes da injeção da amostra. Tal teste foi realizado com cinco diferentes amostras daquelas previamente analisadas. Na tabela 21 apresentam-se os resultados da razão de inclinação das curvas de calibração aquosa (HNO_3 0,2% v/v) e de adição de analito em urina, sendo a platina adicionada na forma de Pt^{2+}. Comparando com os resultados obtidos na ausência de Triton X-100, essa nova variante não apresentou ganho de sensibilidade e não reduziu o efeito de matriz.

Assim, verificou-se que mesmo nas condições ótimas, com ou sem adição de Triton X-100, os resultados indicavam a opção pelo uso da calibração por adição de analito. Não foi observada diferença significativa na sensibilidade obtidas utilizando-se soluções de calibração preparadas a partir de diferentes espécies de platina, um indicativo de que as curvas de adição de analito podem ser feitas pela adição de um sal inorgânico de platina, ainda que para a medição de derivados de platina, como cisplatina e carboplatina.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

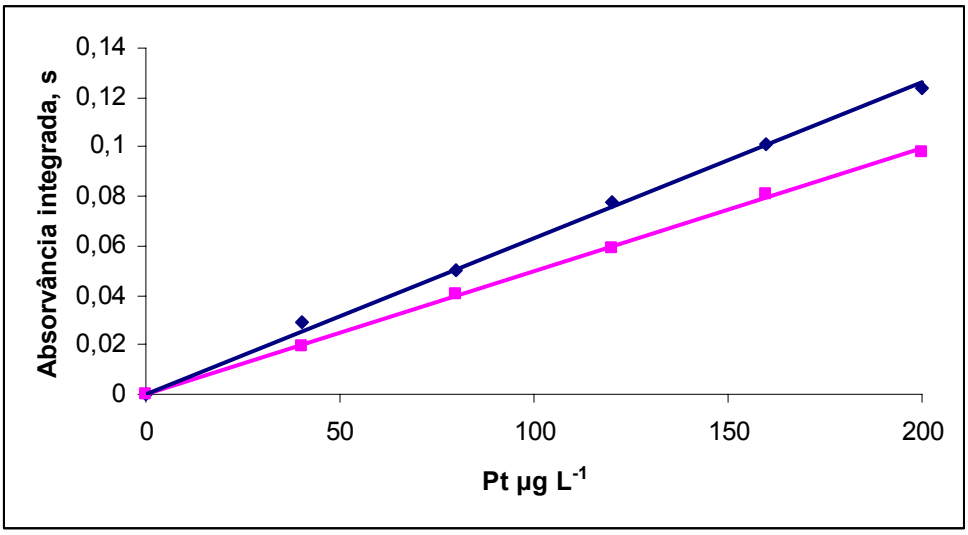


Figura 14. Curvas de calibração de platina na forma de Pt^{2+} em água (♦) e em urina com solução de HNO_3 (■). Condições de análise conforme tabela 19.

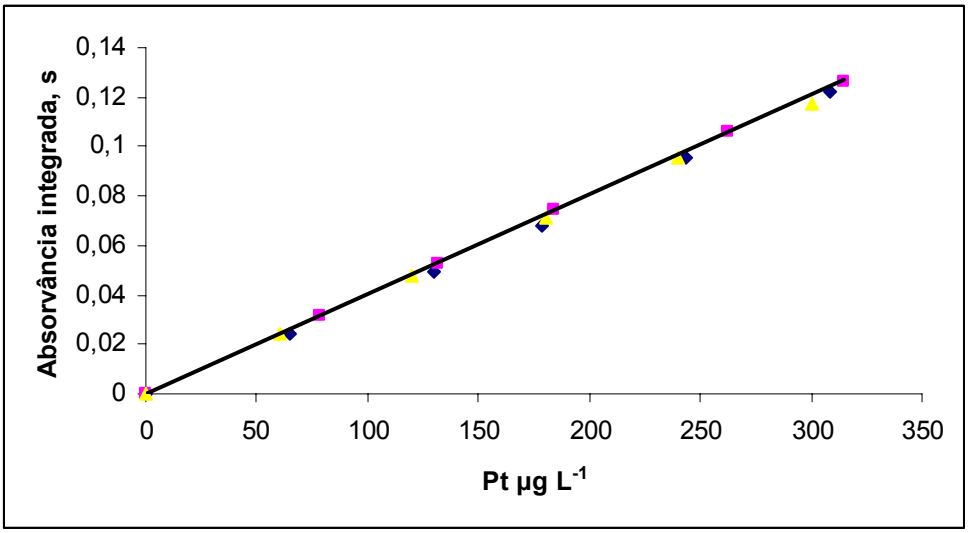


Figura 15. Curvas de adição de analito em urina, com Pt na forma de $PtCl_2$ (♦), carboplatina (■) e cisplatina (▲). Condições de análise conforme tabela 19.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

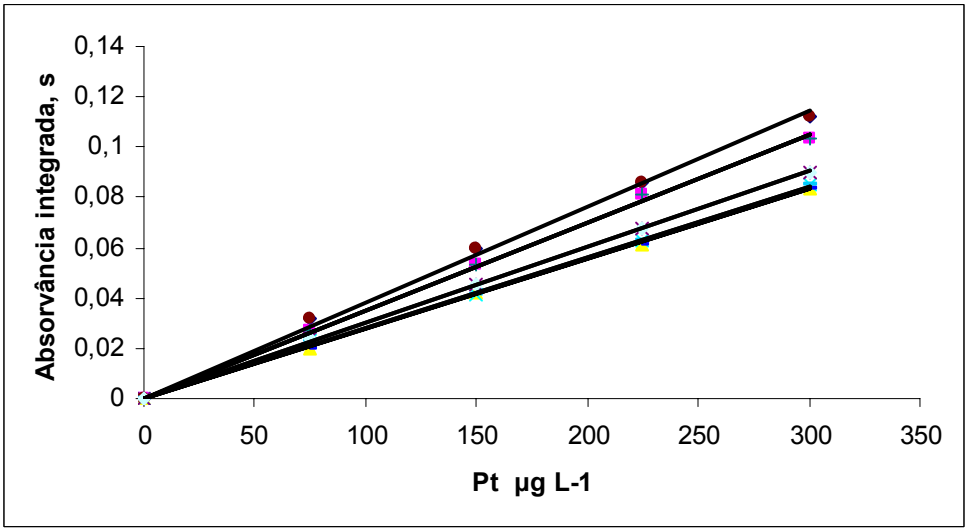


Figura 16. Curvas de adição de analito em diferentes amostras de urina, com a platina adicionada na forma de Pt^{2+}; (♦) urina 1, (■) urina 2, (▲) urina 3, (x) urina 4, (*) urina 5, (♦) urina 6 , (▷) urina 7, (-) urina 8, (--) urina 9 e (▲) urina 10. Condições de análise conforme tabela 19.

Tabela 20. Inclinações das curvas de adição de analito (μg L^{-1} s^{-1}) em urina e razões de inclinação entre estas curvas e a curva aquosa ($m_{amostra}/m_{aq}$)[(a)].

Amostra	Sensibilidade (m)			$m_{amostra}/m_{aq}$		
	$PtCl_2$	Carboplatina	Cisplatina	$PtCl_2$	Carboplatin a	Cisplatina
Urina 1	0,00031	0,00031	0,00030	0,73	0,71	0,71
Urina 2	0,00035	0,00036	0,00034	0,81	0,84	0,82
Urina 3	0,00036	0,00038	0,00036	0,85	0,88	0,85
Urina 4	0,00032	0,00033	0,00033	0,75	0,77	0,77
Urina 5	0,00031	0,00032	0,00030	0,72	0,74	0,70
Urina 6	0,00031	0,00033	0,00031	0,73	0,76	0,74
Urina 7	0,00030	0,00031	0,00029	0,70	0,72	0,68
Urina 8	0,00033	0,00034	0,00033	0,78	0,80	0,77
Urina 9	0,00034	0,00035	0,00034	0,79	0,80	0,81
Urina 10	0,00026	0,00027	0,00025	0,61	0,62	0,59
$x_{médio}$	0,00032	0,00033	0,00031	0,74	0,76	0,74
s	0,00003	0,00003	0,00003	0,07	0,07	0,08

(a) Condições de análise conforme tabela 19.

Tabela 21. Inclinações das curvas de adição de analito (μg L^{-1} s^{-1}) em urina e razões de inclinação entre estas curvas e a curva aquosa (m_{meio}/m_{aq}), utilizando Triton X-100.

Amostra	Sensibilidade (m)			$m_{amostra}/m_{aq}$		
	$PtCl_2$	Carboplatina	Cisplatina	$PtCl_2$	Carboplatina	Cisplatina
Urina 2	0,00035	0,00037	0,00036	0,82	0,84	0,86
Urina 4	0,00031	0,00032	0,00032	0,72	0,71	0,75
Urina 6	0,00030	0,00032	0,00030	0,69	0,71	0,70
Urina 8	0,00035	0,00036	0,00035	0,81	0,82	0,84
Urina 10	0,00025	0,00027	0,00025	0,57	0,60	0,59
$x_{médio}$	0,00031	0,00033	0,00032	0,72	0,74	0,75
s	0,00004	0,00004	0,00005	0,10	0,10	0,11

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.1.3.
Linearidade e limite de detecção

Linearidade é a capacidade de um método em produzir sinais analíticos que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear. Esta função é determinada a partir de dados experimentais, usualmente pelo método dos mínimos quadrados, apesar das limitações deste procedimento. O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático. Um coeficiente de correlação maior do que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um valor igual ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Neste trabalho, optou-se em considerar aceitáveis apenas valores de coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99. Na figura 17 pode-se observar a relação entre a concentração de platina (como Pt^{2+}) e a resposta analítica (absorvância integrada) na leitura de platina em urina, conforme as condições da tabela 19. Foi feita a ANOVA para o ajuste do modelo linear (tabela 22) aos dados que geraram a figura 17 e pode-se verifica que, para um nível de significância de 0,05, a regressão linear é altamente significativa ($F_{calculado} > F_{crítico}$) e não há evidências de falta de ajuste do modelo ($F_{calculado} < F_{crítico}$).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

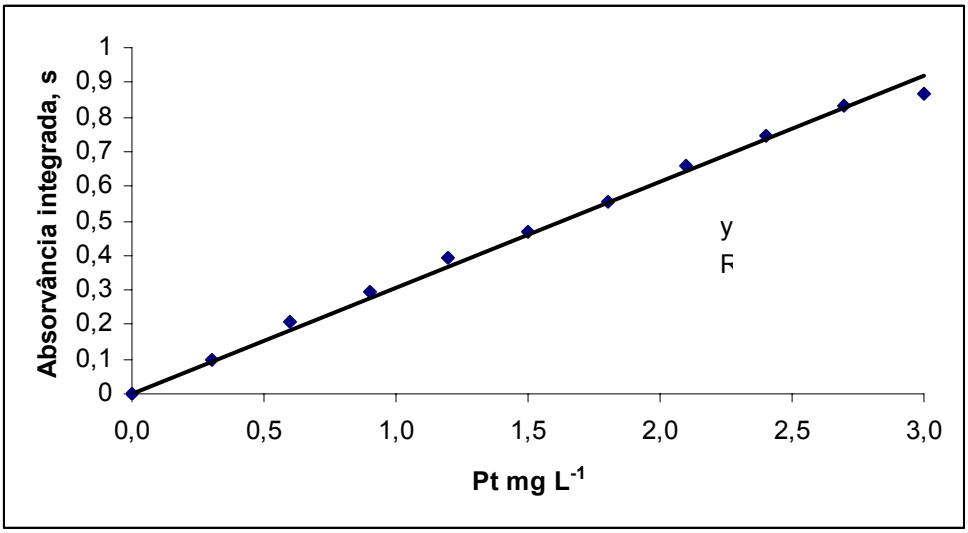


Figura 17: Variação da absorvância integrada com a concentração de platina (na forma de Pt^{2+}) em urina, utilizando GF AAS, nas condições descritas na tabela 19 (y = 0,3064, R^2 = 0,994).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 22. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados que geraram a figura 17.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	Teste F
Regressão	1,516989	1	1,516989	1. Significância da regressão
Resíduos	0,008799	19	0,000463	MQreg/MQres = 3275,68
Falta de Ajuste	0,004481	9	0,000498	2. Falta de Ajuste
Erro Puro	0,004318	10	0,000360	MQfaj/MQep = 1,15
Total	1,525788	20	0,076289	

% de variação explicada: 99,42

% máxima de variação explicável: 99,72

MQreg/MQres teórico = 4,38

MQfaj/MQep teórico = 3,02

O limite de detecção (LD) é o critério de sensibilidade mais utilizado. Segundo o INMETRO, ele representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, a partir

de um procedimento experimental. O limite de detecção é calculado utilizando-se a expressão:

$$LD = 3.s_b.S^{-1}$$

onde s_b é o desvio padrão estimado de 10 medidas do branco, i.e. de uma amostra contendo concentração zero do analito, S é a sensibilidade do método, definida como sendo a inclinação da curva de calibração analítica.

O LD do presente trabalho foi determinado considerando como branco uma amostra de urina com a menor resposta, dentre aquelas analisadas, diluída 1+1 com HNO_3 0,4%. O LD, nas condições ótimas, foi de 12 µg L^{-1}, na amostra original.

5.1.4.
Estudos de exatidão

Foram coletadas oito amostras de urina de um paciente submetido ao tratamento quimioterápico com cisplatina, visando a determinação da concentração de platina nestas amostras pelo método proposto e por procedimentos comparativos independentes (digestão da amostra seguida pela determinação por GF AAS e determinação direta por ICP OES). Alíquotas de 2 mL de urina foram digeridas com 1 mL de HNO_3 e 1 mL de H_2O_2, em tubos de teflon®, utilizando sistema fechado de alta pressão, com aquecimento por microondas. O programa de aquecimento empregado foi o sugerido pelo fabricante (300W – 5min, 500W – 10 min e 600W – 5 min para aquecimento e 0W – 10 min para resfriamento). As amostras foram avolumada a 5 mL com HCl 0,2 % v/v. A determinação de Pt foi realizada por GF AAS, utilizando-se calibração externa, com soluções de calibração preparadas com sal inorgânico de platina. As condições empregadas foram aquelas sugeridas pelo fabricante (comprimento de onda igual a 265,9 nm, largura da fenda igual a 0,2 nm, corrente da lâmpada igual a 6 mA, temperatura de pirólise igual a 1300 ºC, atomização a 2300 ºC por 8 segundos e rampa de atomização igual a 1400 ºC/s). As mesmas amostras também foram analisadas diretamente, sem diluição, por ICP OES (Ultima, Jobin-Yvon), segundo as condições sugeridas pelo fabricante (comprimento de onda igual a 214,42 nm, tempo de integração 0,3 s, pressão do nebulizador igual a 3 bar, vazão de argônio igual a 13 L h^{-1} e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

potência do plasma igual a 1200 W). A possibilidade de calibração aquosa foi confirmada por estudos de adição de analito. Os resultados da determinação de platina nas amostras de urina pela metodologia desenvolvida e pelas metodologias comparativas, estão mostrados na tabela 23. Foi feito um estudo utilizando o método estatístico ANOVA e verificou-se que os resultados obtidos pelo procedimento proposto não se mostraram estatisticamente diferentes, a um nível de significância de 0,05, daqueles obtidos pelos procedimentos comparativos (p = 0,57).

Tabela 23. Concentrações de platina total (mg L^{-1}) em amostras de urina de um paciente submetido ao tratamento quimioterápico com cisplatina, determinadas pela metodologia desenvolvida neste trabalho e por metodologias comparativas.

	ICP OES	GF AAS	
		Digestão por microondas	Método desenvolvido(*)
Urina 1	3,68 ± 0,01	3,68 ± 0,04	3,54 ± 0,16
Urina 2	5,62 ± 0,52	5,58 ± 0,05	5,87 ± 0,36
Urina 3	5,66 ± 0,46	5,80 ± 0,15	6,03 ± 0,39
Urina 4	5,56 ± 0,10	5,48 ± 0,10	5,80 ± 0,47
Urina 5	0,70 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,66 ± 0,06
Urina 6	1,74 ± 0,06	1,73 ± 0,05	1,62 ± 0,08
Urina 7	1,43 ± 0,06	1,49 ± 0,03	1,42 ± 0,04
Urina 8	1,44 ± 0,13	1,54 ± 0,05	1,41 ± 0,11

* sem digestão da amostra, com adição de analito; amostras 1 a 4 diluídas 1+9; amostras 5 a 8, diluídas 1+1; concentração ácida final das amostras igual a 0,2% v/v (HNO_3).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.1.5.
Efeito do uso da solução mista de NaCl e HCl

A partir de uma nova leitura da literatura, foi verificada a proposição da adição de uma mistura de NaCl e HCl à amostra, no forno de grafite, como forma de eliminar efeitos de matriz, embora, em tal trabalho[45], a forma com que a platina era adicionada à solução de calibração era a mesma com que se esperava encontrar na amostra. Portanto, no presente trabalho, a mesma estratégia foi investigada para tentar contornar os efeitos multiplicativos de matriz até aqui encontrados, que levaram à necessidade do uso de calibração por adição de analito. Assim, a solução de diluição passou a ser formada por uma solução mista de NaCl 0,30 mol L^{-1} e HCl 0,40 mol L^{-1}, ainda que fossem mantidos os mesmos valores em relação aos outros fatores anteriormente otimizados, ou seja, aqueles mostrados na tabela 19.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.1.5.1.
Estudos de calibração

Inclinações de curvas de calibração preparadas no mesmo meio que o branco e de adição de analito (figura 18) foram comparadas, utilizando-se tanto platina inorgânica ($PtCl_2$) como carboplatina e cisplatina. Utilizaram-se amostras de urina livres de platina, a solução diluente contendo NaCl e as condições de leitura mostradas na tabela 19. Foi realizado um teste de paralelismo através do programa GraphPad Prism 5 para verificar se estas curvas apresentavam inclinações que não fossem significativamente diferentes. Assim, observou-se que, para um nível de significância de 0,05, não existem evidências estatísticas para se rejeitar a hipótese de que as inclinações das curvas sejam iguais ($p = 0,65$), ou seja, as espécies de platina empregadas apresentavam mesma sensibilidade nos diferentes meios estudados.

Pode-se verificar que a adição de NaCl ao meio foi determinante para melhorar a sensibilidade e eliminar os efeitos de matriz. Calibração externa, com soluções analíticas preparadas no mesmo meio que o branco, utilizando platina na forma de Pt^{2+} mostrou-se possível, facilitando aplicação do método.

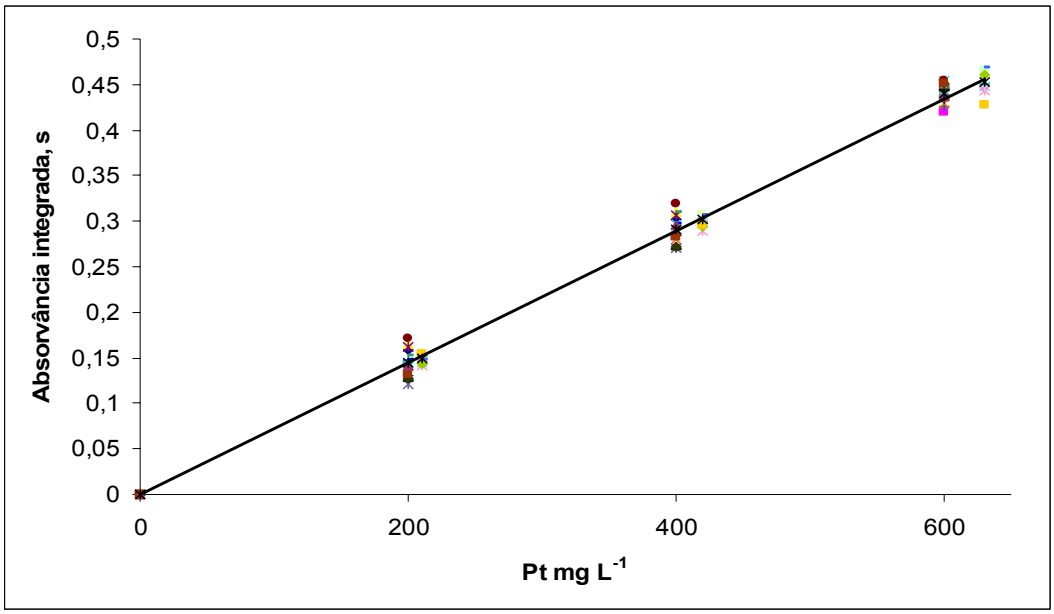


Figura 18. Curvas analíticas de platina em solução aquosa de NaCl 0,15 mol L^{-1} e HCl 0,20 mol L^{-1} e em diferentes amostras de urina diluídas 1+1 com NaCl 0,30 mol L^{-1} + HCl 0,40 mol L^{-1}: (♦) $PtCl_2$ em solução aquosa; (■) $PtCl_2$ na urina 1; (▲) $PtCl_2$ na urina 2, (x) $PtCl_2$ na urina 3, (□) $PtCl_2$ na urina 4, (♦) $PtCl_2$ na urina 5, (+) $PtCl_2$ na urina 6, (-) $PtCl_2$ na urina 7, (--) $PtCl_2$ na urina 8, (♦) $PtCl_2$ na urina 9, (■) $PtCl_2$ na urina 10, (▲) cisplatina na urina 1, (x) cisplatina na urina 2, (□) cisplatina na urina 3, (♦) cisplatina na urina 4, (+) cisplatina na urina 5, (-) cisplatina na urina 6, (--) cisplatina na urina 7, (■) cisplatina na urina 8, (▲) cisplatina na urina 9,(x) cisplatina na urina 10, (□) carboplatina na urina 1, (♦) carboplatina na urina 2, (+) carboplatina na urina 3, (-) carboplatina na urina 4, (--) carboplatina na urina 5, (■) carboplatina na urina 6, (▲) carboplatina na urina 7, (x) carboplatina na urina 8, (□) carboplatina na urina 9 e (♦) carboplatina na urina.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.1.5.2.
Estudos de recuperação

O estudo da recuperação consiste na fortificação da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguido pela determinação da concentração do analito adicionado. O ensaio de recuperação constitui, apesar de suas limitações, um dos métodos utilizados para validação de procedimentos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra.

Deve-se ressaltar que o processo de fortificação tenta simular condições reais, procurando não interferir significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. No presente caso, cinco amostras de urina, livres de platina, foram fortificadas com a urina 3 do paciente submetido ao tratamento quimioterápico, por ser a mais concentrada, o que implicou em um volume reduzido de solução de fortificação adicionado, promovendo uma menor alteração na amostra. Vale notar que este procedimento aproxima-se mais da situação real do que a adição de uma solução aquosa, mas que, por outro lado, considerando que a droga do tratamento era a cisplatina, as afirmações decorrentes podem ser asseguradas apenas para esta substância. Recuperações de 98±4 foram observadas para os diferentes níveis de concentração estudados. Vale notar que a inexistência de um material certificado de referência adequado impede o seu uso no presente processo de verificação da exatidão.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

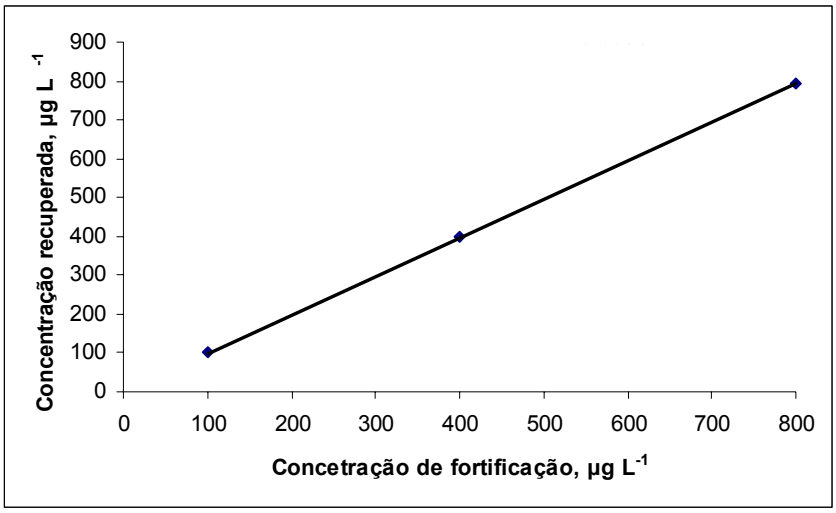


Figura 19. Relação entre as concentrações recuperada e de fortificação, para níveis entre 100 e 800 µg L^{-1} de Pt ($y = 0,993x$, $R^2 = 0,999$).

Pela regressão linear com os resultados obtidos (Fig 19), pode-se verificar que as recuperações apresentam distribuição linear em relação aos três níveis de fortificação, todas elas em torno de 100%. A não disponibilidade de uma urina de paciente tratado com outro derivado da platina, impediu a extensão destes estudos a outras drogas que não a cisplatina.

5.1.5.3.
Parâmetros analíticos de mérito

Considerando o aumento de sensibilidade causado pela presença de NaCl, resolveu-se recalcular os parâmetros analíticos de mérito para esta nova situação. A faixa linear de concentração de platina da curva de calibração foi de até 2,7 mg L^{-1}, como visto na figura 20. Os limites de detecção e quantificação encontrados para o método foram de 4 e 12 µg L^{-1}, respectivamente. A concentração característica encontrada foi de 130 µg L^{-1}, muito próxima daquela indicada pelo manual do equipamento para soluções aquosas (125 µg L^{-1}). Estes valores comparam-se favoravelmente com os anteriores, obtidos na ausência de NaCl.

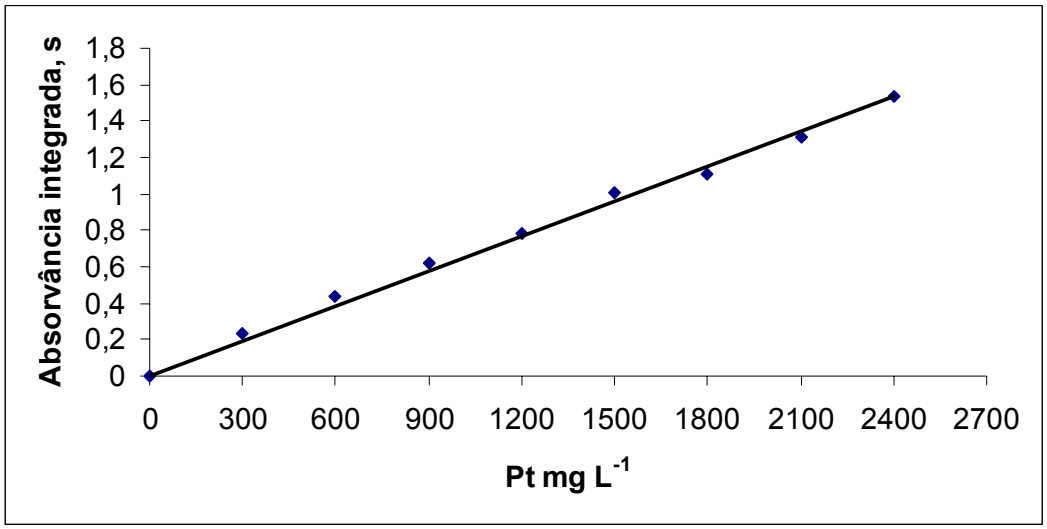


Figura 20. Faixa linear de platina em solução contendo NaCl 0,3 mol L^{-1} (y = 0,00064x, R^2 = 0,955).

Foi realizado o teste estatístico ANOVA para o ajuste do modelo linear (tabela 24) aos dados que geraram a figura 20 e pode-se verifica que, para um nível de significância de 0,05, a regressão linear é altamente significativa ($F_{calculado} > F_{crítico}$) e não há evidências de falta de ajuste do modelo ($F_{calculado} < F_{crítico}$).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 24. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados que geraram a figura 20.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3,434561	1	3,434561	1. Significância da regressão
Resíduos	0,019347	15	0,001290	MQreg/MQres = 2662,84
Falta de Ajuste	0,006833	7	0,000976	2. Falta de Ajuste
Erro Puro	0,012514	8	0,001564	MQfaj/MQep = 0,62
Total	3,453908	16	0,215869	

% de variação explicada: 99,44

% máxima de variação explicável: 99,64

MQreg/MQres teórico = 4,54

MQfaj/MQep teórico = 3,50

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.2.
Determinação de Pt por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua na chama

Considerando que amostras de urina do paciente sob tratamento apresentaram valores de concentração de platina acima de 3 mg L^{-1}, buscou-se investigar a possibilidade de análise destas amostras também pela técnica que utiliza a chama como atomizador. Dada a disponibilidade de um aparelho de fonte contínua, investigou-se seu desempenho, de modo a compará-lo não só com o do forno de grafite, mas também com a técnica de chama utilizando um equipamento de fonte de linhas. Estudos prévios mostraram a necessidade de diluição da amostra, para evitar a formação de resíduos sólidos no queimador, verificando-se que uma diluição 1+1 era suficiente para tal. Uma vez que não havia, evidentemente, interesse em maiores fatores diluições, partiu-se para a otimização de outros fatores, como a concentração ácida do diluente, e as condições de atomização na chama.

5.2.1.
Efeito da concentração do ácido

Os resultados apresentados na figura 21 demonstram que a sensibilidade da medição no meio aquoso foi significativamente menor que aquelas em urina. Além disso, diferentes sensibilidades foram observadas para as curvas de adição de analito em diferentes amostras de urina, quando se utilizou solução de HCl 1% v/v como diluente, o que implicaria na necessidade do uso de adição de analito para a calibração; no entanto (figura 22) com o aumento da concentração de HCl na solução diluente, verificou-se não só um pequeno aumento da sensibilidade nas urinas mas, principalmente, a tendência a uma mesma sensibilidade para todas as amostras de urina para um único valor. Foi feito um teste de paralelismo das curvas mostradas na figura 22, através do programa GraphPad Prism 5.0, e verificou-se que não há evidências estatísticas, para um nível de significância de 0,05, de que as curvas de adição de analito com as diferentes amostras de urina apresentem diferentes inclinações, quando se usa HCl 2% v/v como solução diluente. Com a aproximação de todas as sensibilidades a um único valor, poder-se-ia apontar para o uso de uma única

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

urina para preparar o meio de calibração para todos as outras amostras (*matrix-matched standards*).

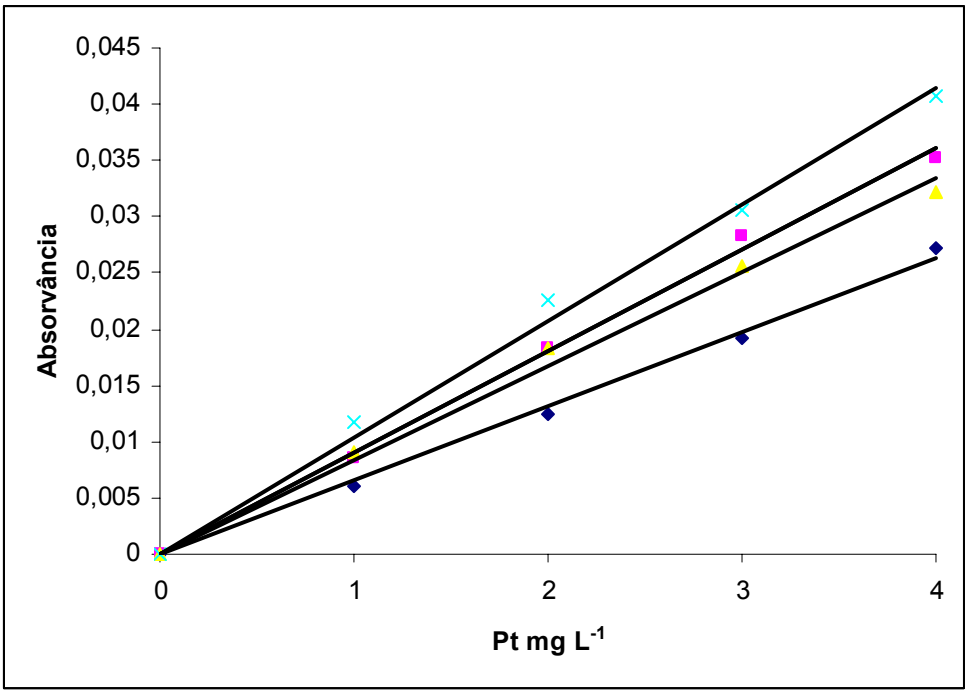
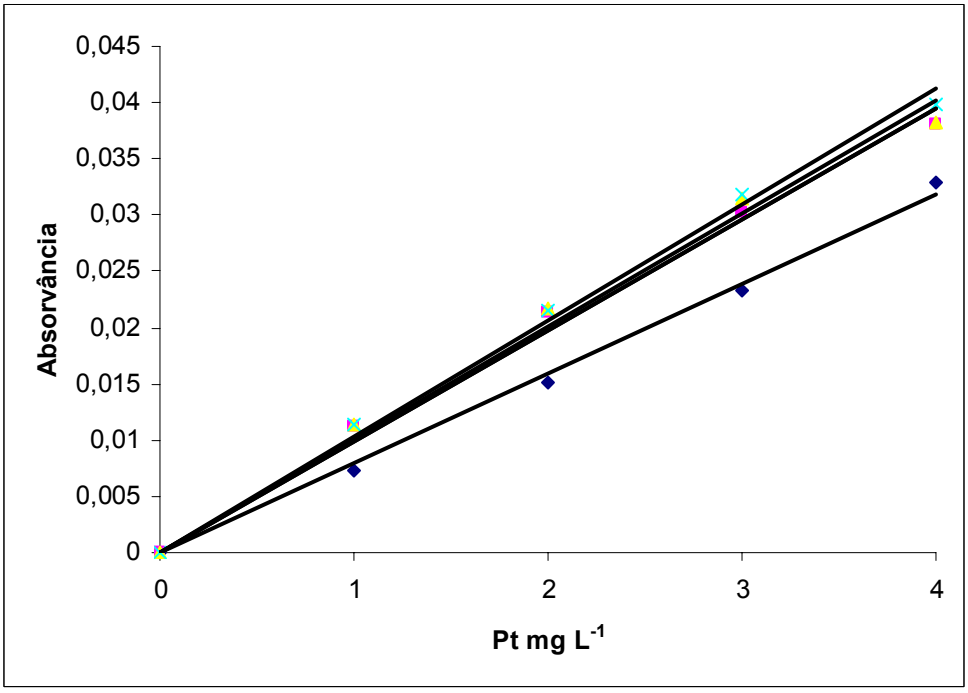


Figura 21. Curvas de calibração de platina inorgânica em água (♦) e em diferentes amostras de urina: urina 1 (■), urina 2 (▲) e urina 3 (x); diluente HCl 1% v/v.



PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Figura 22. Curvas de calibração de platina inorgânica em água (♦) e em diferentes amostras de urina: urina 1 (■), urina 2 (▲) e urina 3 (x); diluente HCl 2% v/v.

5.2.2.
Otimização multivariada

O próximo passo foi estudar a influência das condições da chama, tomando como fatores a sua estequiometria média, controlada pela vazão do acetileno, e a sua composição local, definida pela altura de observação. Assim, foi construída uma matriz de planejamento para uma primeira rodada de experimentos. Os valores reais e codificados dos níveis dos fatores estudados nesta primeira rodada estão contidos na tabela 25 e a matriz de experimentos a ela relativos encontra-se na tabela 26. O planejamento D-optimal dos dados contidos na tabela 26 foi realizado utilizando o programa de estatística Design Expert 7.0. Como tinha-se como objetivo tanto a melhor sensibilidade, como manter as sensibilidades tão próximas entre si quanto possível, utilizou-se tanto a soma como o desvio padrão relativo das inclinações das curvas de adição de analito em urina como resposta.

Tabela 25. Variáveis estudadas com os respectivos níveis na primeira rodada do planejamento D-optimal.

Variável	Descrição	Níveis		
		-1	0	+1
A	Vazão de acetilento (L/h)	65	70	75
B	Altura do queimador (mm)	12	13	14

Tabela 26. Combinações entre as variáveis e os respectivos resultados de absorbância na primeira rodada do planejamento d-optimal.

Ensaio	Vazão de acetileno (L/h)	Altura do queimador (mm)	Soma das inclinações	RSD%
1	-1	-1	0,01955	13,1
2	1	-1	0,02306	8,5
3	-1	1	0,02506	3,0

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

4	1	1	0,02692	1,9
5	0	1	0,02595	4,5
6	1	0	0,02656	7,6
7	0	-1	0,02279	10,2
8	-1	0	0,02283	4,8
9	0	0	0,02434	8,2
10	0	0	0,02443	10,9
11	0	0	0,02656	7,6

Pode-se verificar, das tabelas 27 e 28, que o modelo linear está bem ajustado, uma vez que apresenta valor de p menor que 0,05 e não evidências de falta de ajuste do modelo (p > 0,05).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 27. ANOVA para a primeira rodada de experimentos do planejamento D-optimal tomando-se a soma das inclinações das curvas de adição de analito em urina como resposta e ajustando o modelo linear.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo Linear	4E-05	2	2E-05	17,92373	0,0011
Vazão de acetileno (L/h)	1,38E-05	1	1,38E-05	12,37862	0,0079
Altura do Queimador	2,62E-05	1	2,62E-05	23,46884	0,0013
Resíduo	8,92E-06	8	1,11E-06		
Falta de ajuste	5,76E-06	6	9,6E-07	0,608217	0,7304
Erro Puro	3,16E-06	2	1,58E-06		
Total	4,89E-05	10			

Tabela 28. ANOVA para a primeira rodada de experimentos do planejamento D-optimal tomando-se o desvio padrão das inclinações das curvas de adição de analito em urina como resposta e ajustando o modelo linear.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo Linear	84,84383	2	42,42191	9,757567	0,0071
Vazão de acetileno (L/h)	1,386238	1	1,386238	0,318852	0,5878
Altura do Queimador	83,45759	1	83,45759	19,19628	0,0023
Resíduo	34,78073	8	4,347591		
Falta de ajuste	28,57592	6	4,762653	1,535147	0,4454
Erro Puro	6,204815	2	3,102408		
Total	119,6246	10			

Equação final Ajustada (para os valores reais)

Soma das inclinações = -0,024 + 0,0003A + 0,0021B

RSD% = 62,5 – 0,1A – 3,7B

Através das equações ajustadas para as duas respostas estudadas, pode-se verificar que à medida que se aumenta a vazão de acetileno e a altura do queimador, há um aumento da sensibilidade (visto que seus coeficientes são positivos na equação da soma das inclinações) e uma diminuição da diferença entre as inclinações (visto que seus coeficientes são negativos na equação do desvio padrão relativo das inclinações), o que é desejado. Na figura 23, tem-se representada a desejabilidade, onde os critérios selecionados foram valor máximo para soma das inclinações e valor mínimo para o desvio padrão relativo entre estas inclinações. Pode-se verificar que a o gráfico de desejabilidade realmente indica uma maior vazão de acetileno e altura do queimador e um caminho de máxima inclinação. O caminho de máxima inclinação saindo do ponto central do planejamento está indicado pela linha tracejada na figura 23, sendo a etapa seguinte o deslocamento ao longo deste caminho.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

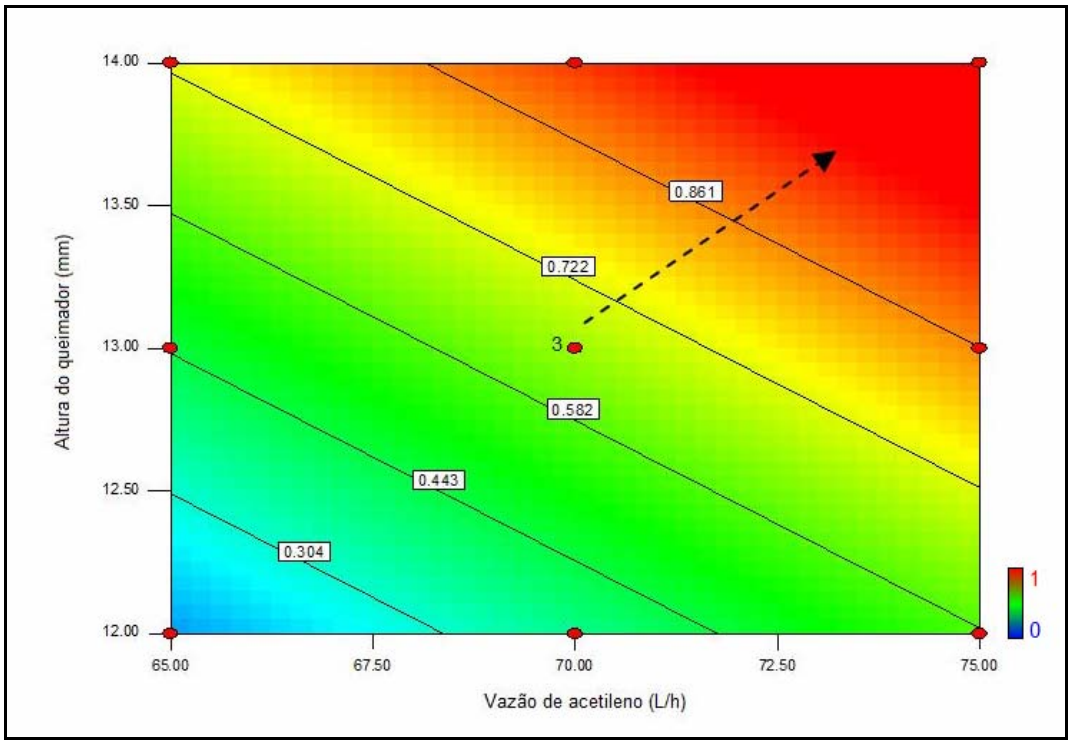


Figura 23. Gráfico de desejabilidade para a primeira rodado do planejamento D-optimal.

Uma segunda rodada de experimentos foi realizada, e a sua respectiva matriz de planejamento encontra-se na tabela 29, que mostra os valores reais e os codificados dos níveis dos fatores estudados. A matriz de experimentos realizada nesta rodada encontra-se na tabela 30.

Tabela 29. Variáveis estudadas com os respectivos níveis na segunda rodada do planejamento D-optimal.

Variável	Descrição	Níveis		
		-1	0	+1
A	Vazão de acetileno (L/h)	70	75	80
B	Altura do queimador (mm)	13	14	15

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 30. Combinações entre as variáveis e os respectivos resultados de absorbância na segunda rodada do planejamento D-optimal.

Ensaio	Vazão de acetilento (L/h)	Altura do queimador (mm)	Soma das inclinações	RSD%
1	-1	-1	0,02676	9,0
2	1	-1	0,02765	8,7
3	-1	1	0,02408	6,8
4	1	1	0,02591	9,6
5	0	1	0,02511	8,0
6	1	0	0,02709	2,0
7	0	-1	0,0276	8,5
8	-1	0	0,02573	7,4
9	0	0	0,02961	1,0
10	0	0	0,02985	1,0
11	0	0	0,02985	1,5

Tomando tanto a soma como o desvio padrão relativo das inclinações das curvas de adição de analito em urina como resposta, o melhor modelo ajustado foi o quadrático, e pode-se verificar nas tabelas 31 e 32 que este modelo apresentou significância estatística, uma vez que apresenta valor de p menor que 0,05. Porém, há indícios de falta de ajuste ($p > 0,05$). Os demais modelos estudados não apresentaram significância estatística, por isso o modelo quadrático foi o escolhido.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 31. ANOVA para a segunda rodada de experimentos do planejamento D-optimal tomando-se a soma das inclinações das curvas de adição de analito em urina como resposta e ajustando o modelo quadrático.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo Quadrático	3,22E-05	5	6,44E-06	5,231904	0,0467
A – Vazão de acetileno (L/h)	2,77E-06	1	2,77E-06	2,25429	0,1935
B - Altura do Queimador	7,96E-06	1	7,96E-06	6,466145	0,0517
AxB	2,21E-07	1	2,21E-07	0,179488	0,6894
A^2	7,55E-06	1	7,55E-06	6,130679	0,0561
B^2	8,03E-06	1	8,03E-06	6,527669	0,0510
Resíduo	6,15E-06	5	1,23E-06		
Falta de ajuste	6,12E-06	3	2,04E-06	106,1667	0,0093
Erro Puro	3,84E-08	2	1,92E-08		
Total	3,83E-05	10			

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 32. ANOVA para a segunda rodada de experimentos do planejamento D-optimal tomando-se o RSD% das inclinações das curvas de adição de analito em urina como resposta e ajustando o modelo quadrático.

	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo Quadrático	106,9093	5	21,38187	4,916868	0,0526
A – Vazão de acetileno (L/h)	1,520148	1	1,520148	0,349566	0,5801
B - Altura do Queimador	0,529283	1	0,529283	0,121711	0,7414
AxB	2,530072	1	2,530072	0,581803	0,4800
A^2	8,698539	1	8,698539	2,000273	0,2164
B^2	72,92217	1	72,92217	16,76882	0,0094
Resíduo	21,74338	5	4,348676		
Falta de ajuste	21,60756	3	7,202519	106,0587	0,0094
Erro Puro	0,135821	2	0,067911		
Total	128,6527	10			

Uma boa maneira de se visualizar os resultados é através das curvas de nível, resultantes da projeção da superfície de resposta em um plano. Essas curvas fornecem uma melhor análise da tendência de resposta da variável dependente, ou seja, definem melhor a região de máximo ou de mínimo. Cada linha tem um mesmo valor para a variável dependente (resposta). As curvas de nível dos efeitos vazão de acetileno e altura do queimador para as duas diferentes respostas estudadas encontram-se nas figuras 24 e 25.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

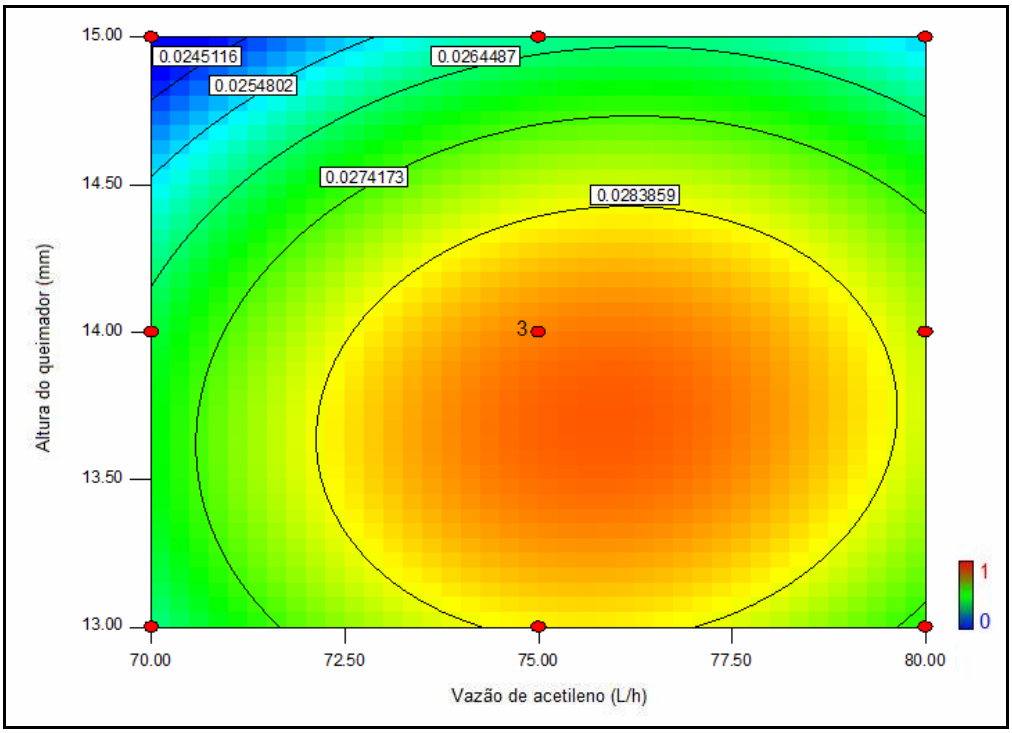


Figura 24. Curva de nível da soma das inclinações das curvas de adição de analito em função da vazão de acetileno e da altura do queimador para a segunda rodada de experimentos do planejamento D-optimal

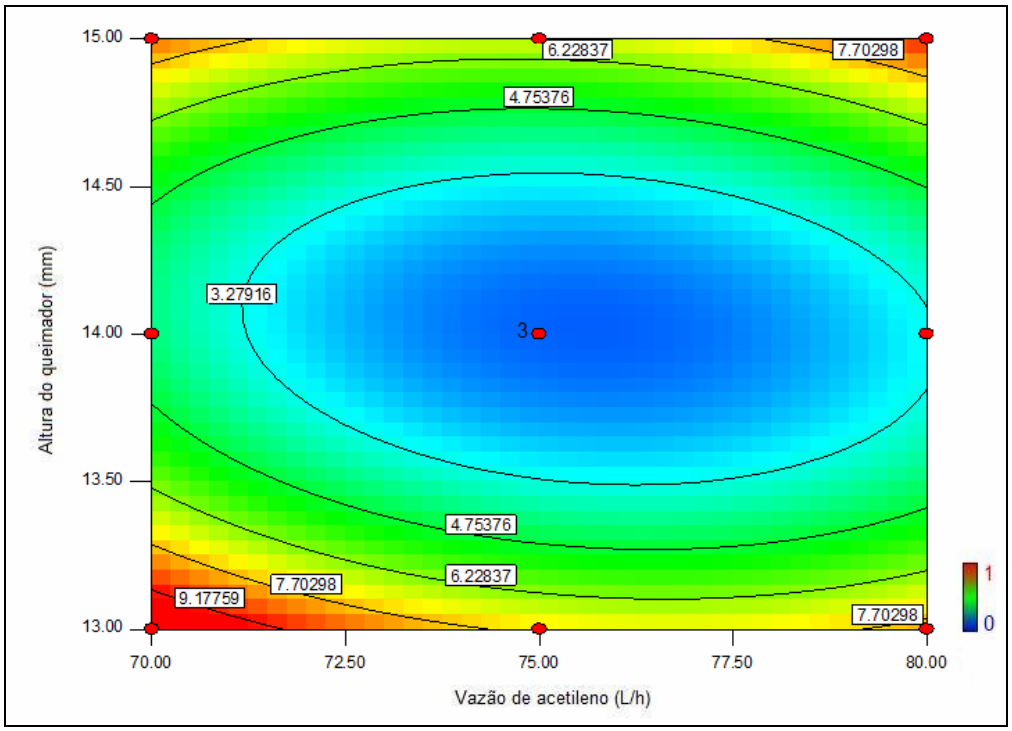


Figura 25. Curva de nível da soma das inclinações das curvas de adição de analito em função da vazão de acetileno e da altura do queimador para a segunda rodada de experimentos do planejamento D-optimal.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Na figura 26, tem-se representada a desejabilidade, onde os critérios selecionados foram o valor máximo para soma das inclinações e valor mínimo para o desvio padrão relativo entre estas inclinações. Nela, pode-se observar a região de maior desejabilidade, situada em vazão de acetileno igual a 75 L/h e altura do queimador igual a 14 mm, semelhante aos valores anteriormente localizados, o que define o fim do presente procedimento de otimização.

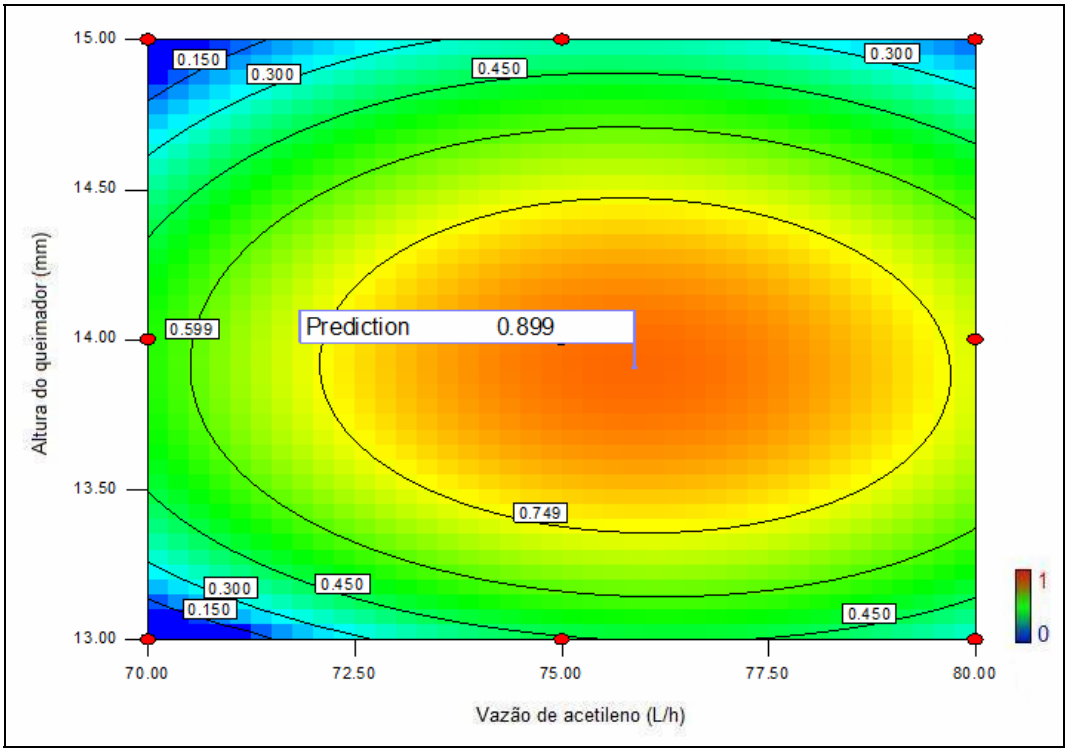


Figura 26. Gráfico de desejabilidade para a segunda rodada de experimentos do planejamento D-optimal.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.2.3.
Procedimentos de calibração

Dez diferentes amostras de urina foram estudadas, sendo coletadas de diferentes indivíduos com idades e sexo também diferentes. Verificou-se que, nas condições ótimas, a sensibilidade em solução de HCl 1% v/v foi significativamente menor que em urina (figura 27). No entanto, as diferentes formas de platina estudadas apresentaram mesma sensibilidade em diferentes urinas, como pode ser observado na figura 28. Foi realizado um teste estatístico de paralelismo, através do programa GraphPad Prism 5.0, e verificou-se que, nas condições ótimas, não foi observada diferença significativa, para um nível de significância de 0,05, na sensibilidade das diferentes espécies de platina estudadas nas diferentes urinas e, portanto, calibração externa, com soluções de calibração preparadas em urina livre de Pt, utilizando sal inorgânico de platina ($PtCl_2$) foi possível, facilitando a aplicação do método.

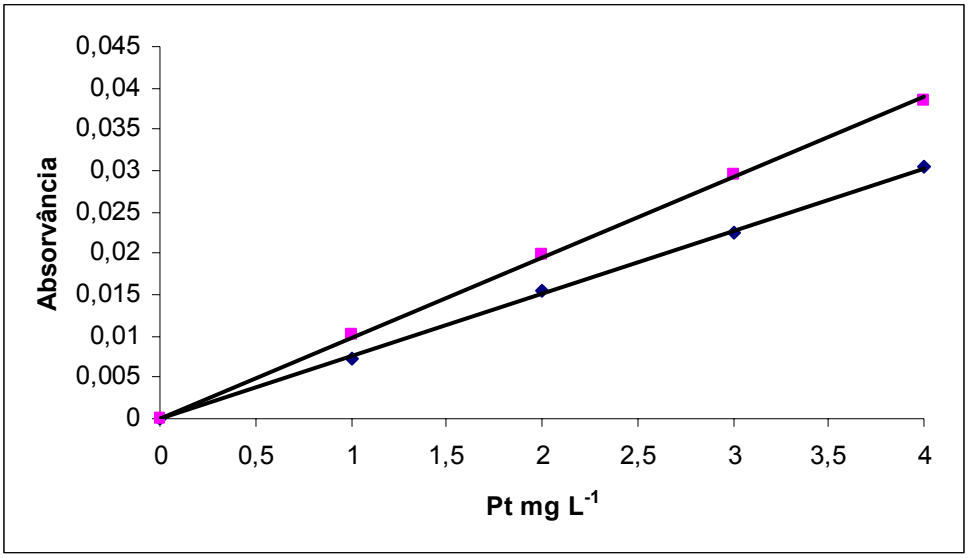


Figura 27. Curvas de calibração de platina inorgânica solução de HCl 1% v/v (♦) e em urina diluída 1+1 com HCl 2% (■).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

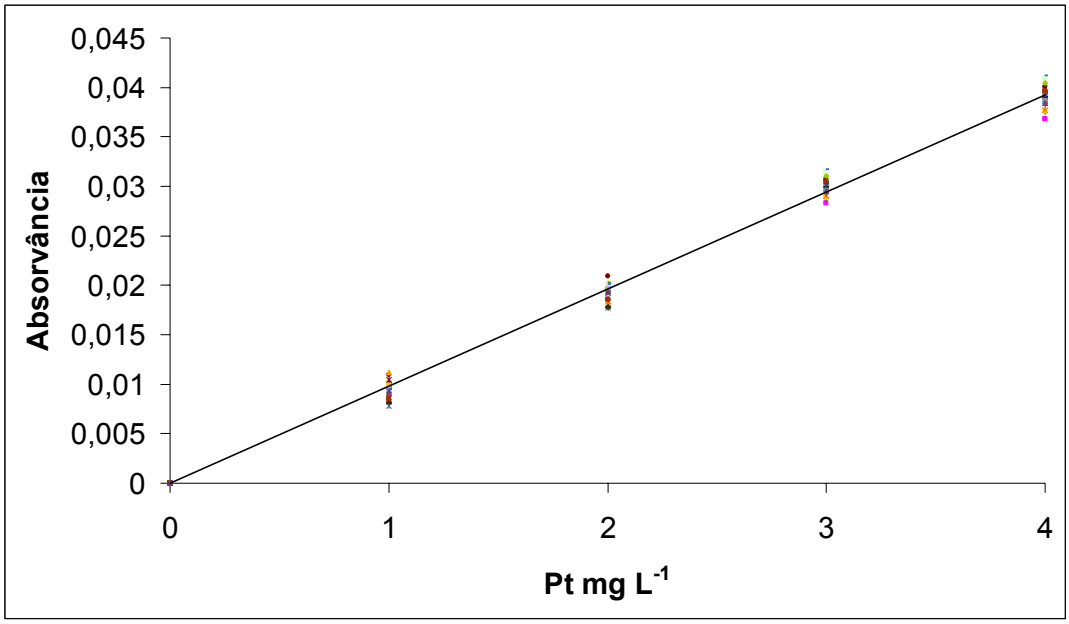


Figura 28. Curvas analíticas das três espécies de platina em diferentes amostras de urina. (♦) $PtCl_2$ na urina 1 (■) $PtCl_2$ na urina 2, (▲) $PtCl_2$ na urina 3, (x) $PtCl_2$ na urina 4, (□) $PtCl_2$ na urina 5, (♦) $PtCl_2$ na urina 6, (+) $PtCl_2$ na urina 7, (-) $PtCl_2$ na urina 8, (--) $PtCl_2$ na urina 9, (♦) $PtCl_2$ na urina 10, (■) cisplatina na urina 1, (▲) cisplatina na urina 2, (x) cisplatina na urina 3, (□) cisplatina na urina 4, (♦) cisplatina na urina 5, (+) cisplatina na urina 6, (-) cisplatina na urina 7, (--) cisplatina na urina 8, (■) cisplatina na urina 9, (▲) cisplatina na urina 10, (x) carboplatina na urina 1, (□) carboplatina na urina 2, (♦) carboplatina na urina 3, (+) carboplatina na urina 4, (-) carboplatina na urina 5, (--) carboplatina na urina 6, (■) carboplatina na urina 7, (▲) carboplatina na urina 8, (x) carboplatina na urina 9 e (□) carboplatina na urina 10.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.2.4.
Parâmetros analíticos de mérito

O comportamento linear da curva de calibração foi até 80 mg L^{-1} (figura 29). Os limites de detecção e quantificação encontrados para o método foram de 55 e 180 µg L^{-1}, respectivamente, na amostra original. Vale notar que concentrações de platina de 0,7 a 5,8 mg L^{-1} foram encontradas na urina do paciente sob tratamento quimioterápico, indicando a adequação do presente método, pelo menos para estas amostras. Ao serem feitas as mesmas estimativas com um equipamento de fonte de linhas, verificou-se um comportamento linear até 120 mg L^{-1} de Pt em urina (figura 29); no entanto, esta maior linearidade se deu às expensas da diminuição da sensibilidade, o que de fato contribuiu para o empobrecimento dos limites de detecção e quantificação

encontrados na amostra original, que foram de 0,6 e 1,9 mg L^{-1}, respectivamente, ou seja, praticamente uma ordem de grandeza piores que aqueles encontrados no equipamento de fonte contínua.

Análise da variância (ANOVA) foi realizada para o ajuste do modelo linear (tabelas 33 e 34) aos dados que geraram a figura 29 e pode-se verifica que, para um nível de significância de 0,05, em ambos os casos a regressão linear é altamente significativa ($F_{calculado} > F_{crítico}$) e não há evidências de falta de ajuste do modelo ($F_{calculado} < F_{crítico}$).

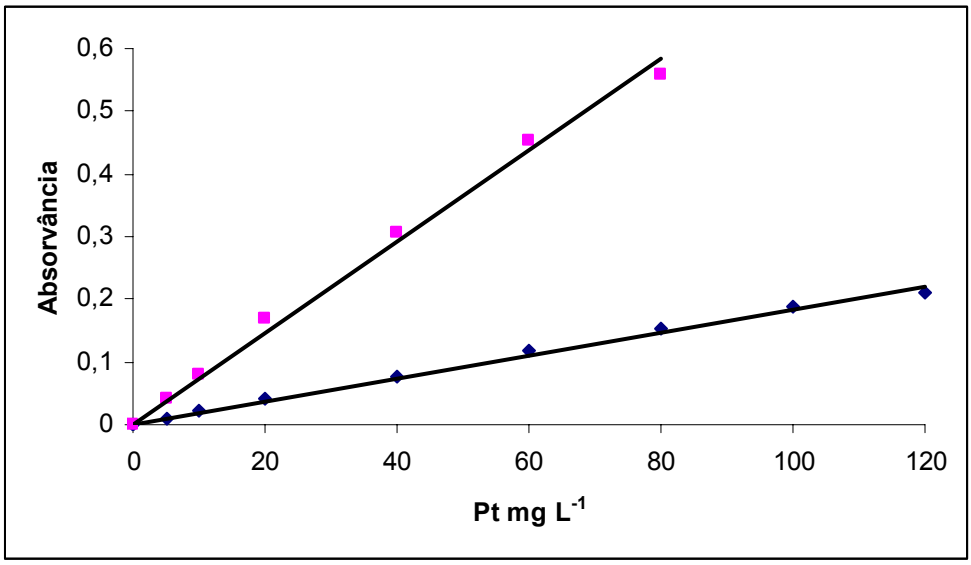


Figura 29. Variação da absorvância com a concentração de platina (na forma de Pt^{2+}) em urina utilizando: HR-CS AAS (■) e LS AAS (♦).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

Tabela 33. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da variação da absorvância com a concentração de platina em urina utilizando o equipamento de HR-CS AAS.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,489944	1	0,489944	1. Significância da regressão
Resíduos	0,002651	11	0,000241	MQreg/MQres = 2032,74
Falta de Ajuste	0,001392	5	0,000278	2. Falta de Ajuste
Erro Puro	0,001260	6	0,000210	MQfaj/MQep = 1,33
Total	0,492595	12	0,041050	

% de variação explicada: 99,46

% máxima de variação explicável: 99,74

MQreg/MQres teórico = 4,84

MQfaj/MQep teórico = 4,39

Tabela 34. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da variação da absorvância com a concentração de platina em urina utilizando o equipamento de LS AAS.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,090460	1	0,090460	1. Significância da regressão
Resíduos	0,000357	15	0,000024	MQreg/MQres = 3801,25
Falta de Ajuste	0,000179	7	0,000026	2. Falta de Ajuste
Erro Puro	0,000178	8	0,000022	MQfaj/MQep = 1,15
Total	0,090816	16	0,005676	

% de variação explicada: 99,61

% máxima de variação explicável: 99,80

MQreg/MQres teórico = 4,84

MQfaj/MQep teórico = 3,50

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA

5.2.5.
Estudos de exatidão

As mesmas oito amostras de urina do paciente submetido ao tratamento quimioterápico com cisplatina foi analisada pelo método proposto. Os resultados da determinação de platina nas amostras de urina pela metodologia desenvolvida e pelas metodologias comparativas, estão mostrados na tabela 35. Pela metodologia proposta, foi feita calibração externa, com soluções de calibração em urina livre de Pt, utilizando sal inorgânico de platina ($PtCl_2$). Fez-se um estudo utizando o método estatístico ANOVA e verificou-se que os resultados obtidos pelo procedimento proposto não se mostraram significativamente diferentes ($p = 0,65$) daqueles obtidos anteriormente por procedimentos comparativos independentes (GF AAS e ICP OES).

Tabela 35. Concentrações de platina total (mg L^{-1}) em amostras de urina de um paciente submetido ao tratamento quimioterápico com cisplatina determinadas pela metodologia desenvolvida neste trabalho e pelas metodologias comparativas.

	ICP OES	GF AAS		HR-CS F AAS Método Desenvolvido
		Digestão por microondas	Determinação direta*	
Urina 1	3,68 ± 0,01	3,68 ± 0,04	3,54 ± 0,16	3,67 ± 0,08
Urina 2	5,62 ± 0,52	5,58 ± 0,05	5,87 ± 0,36	5,62 ± 0,07
Urina 3	5,66 ± 0,46	5,80 ± 0,15	6,03 ± 0,39	5,85 ± 0,07
Urina 4	5,56 ± 0,10	5,48 ± 0,10	5,80 ± 0,47	5,63 ± 0,07
Urina 5	0,70 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,66 ± 0,06	0,72 ± 0,09
Urina 6	1,74 ± 0,06	1,73 ± 0,05	1,62 ± 0,08	1,74 ± 0,09
Urina 7	1,43 ± 0,06	1,49 ± 0,03	1,42 ± 0,04	1,39 ± 0,09
Urina 8	1,44 ± 0,13	1,54 ± 0,05	1,41 ± 0,11	1,44 ± 0,09

* sem digestão da amostra, com adição de analito.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0521432/CA