



Sheila Vasques Leandro Argolo

**Validação metrológica de um método para
determinação de vanádio em soro humano**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Metrologia. Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Calixto de Campos

Rio de Janeiro
Abril de 2010



Sheila Vasques Leandro Argolo

**Validação metrológica de um método para
determinação de vanádio em soro humano**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação da PUC – Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Reinaldo Calixto de Campos
Orientador PUC – Rio

Prof^a. Alessandra Licursi M. C. Cunha
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Josino Costa Moreira
FIOCRUZ –Rio

Prof^a. Maria de Fátima Ramos Moreira
FIOCRUZ - Rio

Prof. José Eugenio Leal
Coordenador Setorial de Pesquisa e Pós-Graduação
do Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 14 de abril 2010

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Sheila Vasques Leandro Argolo

Graduou-se em Farmácia Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1985). Atualmente é Coordenadora do Setor de Química e Toxicologia, da área de Metrologia e Produção de Reagentes do Laboratório Sérgio Franco Medicina Diagnóstica.

Ficha Catalográfica

Argolo, Sheila Vasques Leandro

Validação metrológica de um método para determinação de vanádio em soro humano / Sheila Vasques Leandro Argolo ; orientador: Reinaldo Calixto de Campos. – 2010.

87 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Centro Técnico Científico, 2010.

Inclui bibliografia

1. Metrologia – Teses. 2. Vanádio. 3. Soro. 4. GFAAS. I. Campos, Reinaldo Calixto de. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Metrologia para Qualidade e Inovação. III. Título.

CDD: 389.1

Aos meus familiares: meu pai Delfino pelo seu constante incentivo, minha mãe Dolores inesquecível pelo seu exemplo de força e determinação, meu marido Ubiratan pelo apoio incondicional neste período de estudos e aos meus amados filhos André Luis, Daniel e Ana Luzia pela compreensão e carinho.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Reinaldo Calixto de Campos, por seu incentivo, apoio e orientação.

Ao professor Maurício Frota, pelo seu incentivo, apoio e orientação.

A Dra Márcia Magalhães Marinho, pelo seu apoio.

A Dra Trude Dimetz, pelo seu incentivo.

Aos professores que participaram Comissão Examinadora.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação e do Departamento de Química da PUC-Rio pela colaboração.

Aos técnicos Ariana, Leonardo e Jaqueline pelo apoio no laboratório.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Resumo

Argolo, Sheila Vasques Leandro; Campos, Reinaldo Calixto de. **Validação metrológica de um método para determinação de vanádio em soro humano.** Rio de Janeiro, 2010. 87 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Janeiro.

Embora o papel do vanádio no organismo ainda não tenha sido bem definido, sabemos que ele inibe a atividade das ATPases em eritrócitos e células tubulares renais, afetando a função diurética dos rins, o metabolismo de leucócitos e macrófagos, a função do músculo cardíaco, causando efeitos insulina-like em doses farmacológicas. O vanádio é de grande importância para a indústria, é utilizado como catalisador, na produção de vidros e aço. Os trabalhadores em usinas de produção de aço e indústrias que utilizam combustíveis fósseis como fonte de energia, são expostos a quantidades significativas de vanádio, sendo importante o monitoramento dos seus níveis. No presente trabalho foi desenvolvido um método simples e direto para determinação de vanádio em soro usando a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, otimizado por um planejamento composto central. As temperaturas de pirólise e atomização foram de 1240 e 2600 °C, e calibração externa pode ser realizada com soluções de calibração preparadas em HNO₃ 2,5 % v/v, mostrando-se linear até, pelo menos, 3 µg L⁻¹. O pré-tratamento da amostra consistiu tão somente de uma diluição (2+1) no mesmo meio, e os limites de detecção e quantificação encontrados foram, respectivamente, 0,3 e 1,0 µg L⁻¹. A velocidade analítica foi de 8 amostras h⁻¹, para análises em triplicata. Nos estudos de recuperação foram obtidas valores médios de 97,2%; 99,2% e 105,3%, para concentrações de 1, 2 e 3 µg.L⁻¹, respectivamente. Houve excelente concordância entre os valores encontrados e o certificado na análise de um material de referência certificado. Nos estudos da repetitividade, o maior coeficiente de variação encontrado foi 10,3% na amostra adicionada de 1 µg L⁻¹. Nos estudos da precisão intermediária, o maior coeficiente

de variação foi 5,6% na amostra adicionada de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. As incertezas combinadas obtidas foram $1,65 \times 10^{-1}$; $2,72 \times 10^{-1}$ e $3,72 \times 10^{-1}$, para concentrações de 1, 2 e $3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O tempo de vida do tubo de grafite nas condições otimizadas foi de, aproximadamente, 150 ciclos. O método foi considerado adequado para a determinação rotineira de vanádio em soro em laboratórios clínicos.

Palavras-chave

Metrologia; vanádio; soro; GFAAS;

Abstract

Argolo, Sheila Vasques Leandro; Campos, Reinaldo Calixto de. **Metrological validation of a method for determination of vanadium in human serum.** Rio de Janeiro, 2010. 87 p. Msc. Dissertation – Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Janeiro.

Although the role of vanadium in the body has not been yet well defined, it is known that it inhibits the ATPase activity in erythrocytes and renal tubular cells, affecting the diuretic function of the kidneys, the metabolism of leukocytes and macrophages, the function of the heart muscle and causes insulin-like effects in pharmacological doses. Vanadium is of great importance to the industry, and is mostly used as catalyst, and in the production of glass and steel. Workers of the steel industries as well as those in plants that use large amounts of fossil fuels are potentially exposed to large amounts of vanadium, and it is important to monitor their serum levels. In the present study it was developed a simple and direct method for determination of vanadium in serum using graphite furnace atomic absorption spectrometry optimized by a central composite design. External calibration was possible, using calibration solutions prepared in 2 % v/v HNO₃. The sample was 2+1 diluted in the same medium and the calibration curve was found linear up to at least 3 µg L⁻¹. The limits of detection and quantification were respectively 0.3 and 1.0 µg L⁻¹, in the original sample. Average recoveries were 97.2%, 99.2% and 105.3% for concentrations of 1, 2 and 3 µg L⁻¹, respectively. Excellent agreement was found between found and certified values in the analysis of a certified reference material. The sample throughput was 8 h⁻¹ (n=3). In the study of repeatability, the largest coefficient of variation was 10.3% in the sample spiked with 1 µg L⁻¹ of

vanadium. In the study of the intermediate precision the higher coefficient of variation was 5.6% in the sample spiked with 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The combined uncertainties obtained were 1.65×10^{-1} , 2.72×10^{-1} and 3.72×10^{-1} , for concentrations of 1, 2 and 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The graphite tube life time in the optimized conditions was 150 cycles, approximately. The method was considered adequate to the routine determination of vanadium in serum in clinical laboratories.

Keywords

Metrology; vanadium; serum; GFAAS

Sumário

1	Introdução	16
1.1.	O Vanádio	19
1.2.	Objetivos gerais e específicos	23
1.3.	Metodologia	24
1.4.	Estrutura da dissertação	25
2	Referencial Teórico	26
2.1.	Métodos utilizados para dosagem do vanádio	26
2.1.1.	Espectrometria de Absorção Atômica em forno de grafite	26
2.1.2.	Análise por ativação por nêutrons	28
2.1.3.	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado	29
2.2.	Desenvolvimento do método	30
2.3.	Método proposto	31
3	Parte experimental - Material e métodos	32
3.1.	Equipamentos	32
3.2.	Reagentes	32
3.3.	Software	33
3.4.	Descontaminação do material	33
3.5.	Amostragem e armazenamento das amostras	34

4	Parte experimental - Desenvolvimento do Método	35
4.1.	Experimentos preliminares	35
4.1.1.	Determinação do limite de detecção sem o uso de modificador ou de múltipla injeção	35
4.1.1.1.	Procedimento	35
4.1.1.2.	Resultados	36
4.1.2.	Determinação do limite de detecção com uso de modificador	36
4.1.2.1.	Procedimento	36
4.1.2.2.	Resultados	37
4.1.3.	Determinação do limite de detecção sem modificador com múltipla injeção	37
4.1.3.1.	Procedimento	37
4.1.3.2.	Resultados	37
4.1.4.	Determinação do limite de detecção com modificador com múltipla injeção	38
4.1.4.1.	Procedimento	38
4.1.4.2.	Resultados	38
4.1.5.	Testes na presença da matriz	39
4.1.5.1.	Procedimento	39
4.1.5.2.	Resultados	39
4.1.6.	Conclusões parciais	40
4.2.	Otimização multivariada	41
5	Parte experimental - Validação analítica	58
5.1.	Estudos da calibração	58
5.2.	Linearidade	66
5.3.	Limite de detecção do método	68
5.4.	Limite de quantificação do método	68
5.5.	Faixa linear de trabalho	69
5.6.	Exatidão	69
5.6.1.	Estudos de recuperação	70

5.6.2. Análise de material de referência certificado	70
5.7. Precisão	71
5.7.1. Repetitividade	71
5.7.2. Reprodutibilidade intralaboratório	72
5.7. Robustez	72
5.8. Parâmetros analíticos de mérito	73
6 Parte experimental - Estudos da incerteza do método	74
6.1. Fontes de incerteza	74
6.2. Quantificando os componentes de incerteza	75
6.2.1. Repetitividade (u_r)	75
6.2.2. Reprodutibilidade (u_R)	76
6.2.3. Curva analítica (u_{curva})	76
6.2.4. Preparo de soluções críticas (u_s)	77
6.3. Incerteza combinada	78
7 Conclusão	82
8 Bibliografia	84

Lista de figuras

Figura 1. Desenho da pesquisa, seus componentes e métodos	24
Figura 2. Diagrama de Pareto do experimento	46
Figura 3. Valores observados <i>versus</i> previstos	48
Figura 4. Valores observados <i>versus</i> resíduos	49
Figura 5. Valores previstos <i>versus</i> resíduos	49
Figura 6. Superfície de resposta: relação sinal ruído em função da temperatura de pirólise (A) e da massa do modificador (B); C, D e E fixos nos respectivos valores críticos	51
Figura 7. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da temperatura de pirólise (A) e do volume de amostra (C); B, D e E fixos no valor crítico	51
Figura 8. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da temperatura de pirólise (A) e do fator de diluição da amostra (D); B, C e E fixos no valor crítico	52
Figura 9. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da temperatura de pirólise (A) e da concentração do HNO ₃ (E); B, C e D fixos no valor crítico	52
Figura 10. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da massa do modificador (B) e do volume de amostra (C); A, D e E fixos no valor crítico	53
Figura 11. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da massa do modificador (B) e do fator de diluição da amostra (D); A, C e E fixos no valor crítico	53
Figura 12. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da massa do modificador (B) e da concentração de HNO ₃ (E); A, C e D fixos no valor crítico	54
Figura 13. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função do volume de amostra (C) e do fator de diluição da amostra (D); A, C e E fixos no valor crítico	54
Figura 14. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função do volume da amostra (C) e da concentração de HNO ₃ (E); A, B e D fixos no valor crítico	55

Figura 15. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função do fator de diluição da amostra (D) e da concentração de HNO ₃ (E); A, B e C fixos no valor crítico	55
Figura 16. Curvas de calibração do vanádio em meio de HNO ₃ 2,5 % v/v (●) e na presença da matriz (■), utilizando o programa de temperatura otimizado	59
Figura 17. Evolução da massa característica com o aumento do tempo de atomização e leitura (T _{at} = 2600 °C)	60
Figura 18. Curvas de calibração do vanádio em meio de HNO ₃ 2,5 % v/v (▲) e na presença da matriz (—), usando o programa de temperatura otimizado, temperatura de atomização 2600 °C e tempo de integração 12 segundos	61
Figura 19. Estudo da temperatura de pirólise com a amostra (3 µg L ⁻¹ de V) diluída 2+1 em HNO ₃ 2,5% (v/v), T _a = 2600 °C, t _{int} = 7 s	62
Figura 20. Curvas de calibração do vanádio em meio de HNO ₃ 2,5 % v/v (■) e na presença da matriz (●), usando programa de temperatura otimizado, temperatura de atomização 2600 °C e diluição 2+1 da amostra com HNO ₃ 2,5% (v/v)	63
Figura 21. Curvas de adição de analito a diferentes amostras de soro: amostra A (■), amostra B (—), amostra C (■), amostra D (▲), amostra E (▲) e solução de calibração em HNO ₃ 2,5% v/v (●).	64
Figura 22. Perfil dos sinais de absorção e fundo na presença da matriz	65
Figura 23. Sobreposição dos sinais de absorção e fundo na ausência da matriz. Soluções em HNO ₃ 2,5% v/v nas concentrações de : 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 µg L ⁻¹	66
Figura 24. Curva de calibração do vanádio em meio de HNO ₃ 2,5% v/v, usando o programa e condições da tabela 9	67
Figura 25. Diagrama de causa e efeito para o método	74
Figura 26. Esquema do procedimento	75
Figura 27. Gráficos da contribuição das fontes de incerteza do método para determinação de vanádio em soro fortificado com 1, 2 e 3 µg.L ⁻¹ respectivamente.	80

Lista de tabelas

Tabela 1. Resultados de experimentos preliminares	40
Tabela 2. Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento fatorial	41
Tabela 3. Combinação entre as variáveis (valores reais)	42
Tabela 4. Combinação entre as variáveis (valores codificados) com os respectivos resultados	43
Tabela 5. Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento do composto central	45
Tabela 6. Tabela ANOVA	47
Tabela 7. Faixa de valores testados e os valores críticos	56
Tabela 8. Procedimento e programa de temperatura ao final da otimização	56
Tabela 9. Procedimento e programa de temperatura após modificações	63
Tabela 10. Inclinações das curvas de adição de analito e razões de inclinação entre estas curvas e a curva aquosa ($m_{\text{matrix}}/m_{\text{aquosa}}$)	65
Tabela 11. Análise de variância dos dados que geraram o gráfico da figura 24 para o ajuste do modelo linear	68
Tabela 12. Resultados dos estudos de recuperação	70
Tabela 13. Resultados dos estudos de precisão (repetitividade)	72
Tabela 14. Resultados dos estudos de reprodutibilidade (precisão intermediária)	72
Tabela 15. Resultados dos estudos da robustez do método	73
Tabela 16. Resultados da estimativa da incerteza da medição de vanádio em soro, avaliadas em diferentes concentrações	79