

2 Referencial Teórico

2.1

Métodos utilizados para dosagem do vanádio

O vanádio está presente em fluidos biológicos, em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$). Uma variedade de métodos tem sido usada para determinação do vanádio, incluindo espectrometria de UV visível, fluorimetria, voltametria, análise por ativação por nêutrons, eletrodo íon-seletivo, cromatografia gasosa, espectrometria fluorescência de raios X, espectrometria de emissão e espectrometria de absorção atômica³⁰. Destes métodos, poucos são adequados à rotina de um laboratório clínico ou possuem a sensibilidade adequada para análise de materiais biológicos. Foram relacionados aqui os métodos mais relevantes para análise de materiais biológicos.

2.1.1

Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

A espectrometria de absorção atômica tem sido usada para determinação do vanádio em diferentes materiais. Entretanto, em função dos baixos níveis de vanádio em fluidos biológicos, cuidados tem que ser tomados em relação à contaminação durante a coleta, armazenamento, preservação e tratamento das amostras.

Outra dificuldade na determinação do vanádio é a formação de carbetos refratários durante os ciclos de aquecimento, gerando uma perda de sensibilidade e redução da vida útil do forno³¹. Um estudo sobre a vaporização do vanádio em tubos revestidos piroliticamente foi realizado, utilizando vanádio radioativo (^{48}V), e demonstrou que a radioatividade começa a diminuir e a absorvância, a aumentar, na temperatura de 2000°C. Além disso, observou que, na temperatura de atomização com máximo de absorvância (aproximadamente 2650°C), a radioatividade residual ainda era muito alta (40% do valor inicial). Em injeções

posteriores, foi observado que cerca de 20% da radioatividade inicial permanecia na leitura do tubo, não decrescendo apesar de múltiplos ciclos de aquecimento²⁶. Alguns procedimentos foram propostos para atenuar este resultado tais como injeção em tubo pré-aquecido³⁰, injeção de água entre as amostras¹⁸ e o uso de uma outra fonte de carbono (ácido cítrico ou CO₂)³². Entretanto, nenhum dos autores conseguiu eliminar o efeito.

Procedimentos foram descritos envolvendo pré-concentração antes da determinação, tais como coluna trocadora de íons, complexação e extração com solvente orgânico ou pré-concentração direta no forno de grafite, como descrito abaixo. Assim, Heinemann e colaboradores descreveram um método em que o vanádio foi determinado em soro após uma etapa de liofilização, seguida por digestão ácida, à alta pressão. O produto da digestão foi concentrado a um pequeno volume por evaporação. O vanádio concentrado foi complexado com cupferron, extraído e seco. O resíduo foi reconstituído com ácido fórmico, concentrando cerca de 15 vezes a amostra original. Foram feitas seis injeções de 40 µL. O nitrato de paládio foi usado como modificador, obtendo-se uma massa característica de 28 pg, limite de detecção de 11 ng L⁻¹ e limite de quantificação de 17 ng L⁻¹. O estudo do valor de referência para o método foi realizado com 117 pacientes saudáveis, e encontrou valores entre 17-118 ng L⁻¹ na população estudada¹⁸.

Stroop e colaboradores descreveram um método em que o vanádio foi determinado após diluição do soro com ácido sulfúrico (1+1) e a determinação da concentração foi realizada pelo método de adição de analito, com a injeção de 50 µL de amostra diluída. Desta forma, o autor conseguiu limite de detecção de 30 pg e limite de quantificação de 3 µg L⁻¹. O estudo do valor de referência para o método foi realizado com 117 pacientes saudáveis e encontrou valores entre 2,22 – 3,94 µg L⁻¹³³.

Ishida e colaboradores desenvolveram um método para determinação em soro ou urina, em que, após uma etapa de digestão, o vanádio foi extraído por um solvente orgânico com um agente quelante (N-benzoil-N-(o-toluil)hidroxilamina em benzeno). O extrato foi evaporado

e reconstituído com ácido acético, duas alíquotas de 30 μL foram injetadas no forno. A massa característica obtida foi de 26 pg, com limite de detecção de 80 ng L^{-1} . A pesquisa do valor de referência para o método foi realizado com 64 pacientes saudáveis, e encontrou valores entre 0,08 – 0,24 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a população estudada³⁴.

Apostoli e colaboradores desenvolveram método para quantificação do vanádio na urina, utilizando “cupferron” e extração com solvente orgânico, sendo que, após a extração, nenhuma etapa de concentração foi realizada e 40 μL do material foram injetados no forno de grafite, a uma temperatura de 150°C. O método de padronização foi o de adição padrão. O limite de detecção obtido foi de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o método desenvolvido³⁵.

Fernandes e colaboradores propuseram um método para quantificação de vanádio em urina usando injeção à quente e pré-concentração dentro do tubo de grafite. O modificador químico usado foi uma mistura de fluoreto de bário e o surfactante triton X-100. O limite de detecção encontrado foi 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$, o limite de quantificação foi de 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a massa característica encontrada foi de 46,8 pg³¹.

2.1.2

Análise por ativação por nêutrons

Este método tem sido usado na determinação de vanádio, especialmente porque consegue detectar concentrações mínimas, na faixa de ng L^{-1} , mesma ordem de concentração do vanádio em fluidos biológicos. O fator limitante desta técnica é que o material não pode ser irradiado diretamente, devido ao risco de explosão, sendo necessário um pré-tratamento, que envolve a mineralização do material.

Simonoff e colaboradores propuseram um método em que, após uma etapa inicial de calcinação do soro a temperatura de até 500°C, o resíduo foi dissolvido em ácido clorídrico e novamente evaporado a temperatura de 200°C. O material então foi submetido à irradiação e quantificação. O estudo do valor de referência para o método foi realizado

com 23 pacientes saudáveis, e encontrou valores entre 260 – 1300 ng L⁻¹. A maior desvantagem deste método é o longo período de preparação da amostra (cerca de 70 horas) antes da determinação propriamente dita³⁶.

Mousty e colaboradores realizaram um estudo com trabalhadores expostos ao vanádio, utilizando a análise por ativação por nêutrons como uma das técnicas. Para a determinação em urina, primeiro foi realizada uma mineralização com ácido nítrico e pré-concentração com a coluna Chelex-100 e subsequente eluição do vanádio. O limite de detecção encontrado foi de 0,1 ng mL⁻¹. Os resultados dos trabalhadores expostos apresentou valores 4 vezes maiores (3,68 a 21,70 ng mL⁻¹) que o do grupo controle (0,76 a 4,32 ng mL⁻¹)²⁶.

2.1.3

Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

Este método é muito eficiente para determinação de elementos traço em amostras biológicas por sua alta sensibilidade e excelentes limites de detecção.

Yang e colaboradores descreveram um procedimento usando a espectrometria de massas por plasma, indutivamente acoplado de alta resolução. A amostra (urina ou soro) foi diluída (1+19) com ácido nítrico 0,3% (v/v), e a padronização foi realizada com apenas um padrão. O limite de detecção encontrado foi de 10 pg mL⁻¹, para ambos materiais. Neste trabalho, não foi divulgado o estudo para estabelecer o valor de referência, mas, em determinações realizadas, foram encontrados os seguintes valores: para o soro, de <10 a 760 pg mL⁻¹ e, para urina, de <10 a 1500 pg mL⁻¹ nas amostras estudadas³⁷.

Nixon e colaboradores descreveram um procedimento, utilizando a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado a uma célula de reação dinâmica, para determinação de cromo e vanádio em soro e urina. O uso da célula de reação dinâmica permitiu eliminar interferentes como ArC⁺ e OCl⁻¹. Foi usado como diluente HNO₃ 1% e como padrão interno foram usados o ítrio (Y) e o gálio (Ga). A curva de

calibração foi preparada na mesma matriz do material a ser dosado. O limite de detecção em soro foi de $0,028 \mu\text{g L}^{-1}$ no método desenvolvido³⁸.

2.2

Desenvolvimento do método

Foi utilizada como principal ferramenta para o desenvolvimento do método a otimização multivariada de experimentos ou planejamento fatorial. Para um reconhecimento inicial, foram realizados alguns experimentos para avaliação do comportamento de algumas variáveis, a fim de reduzir o número de variáveis no experimento principal e conhecer um pouco do comportamento do analito.

A otimização multivariada fornece uma maior quantidade de informações, e permite um melhor conhecimento das influências das variáveis estudadas, além das interações entre as variáveis, com um menor número de experimentos em relação à metodologia clássica, univariada.

Para este estudo, foi escolhido o planejamento chamado de composto central, usando o método da superfície de resposta. Este planejamento consiste de uma parte de um planejamento fracionário com corridas axiais e corridas centrais, o que torna o planejamento ortogonal e rotacionável. A vantagem deste planejamento é a possibilidade de verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão e a otimização do modelo. O objetivo, uma vez que todas as variáveis são quantitativas, é buscar a otimização do sistema com o menor número de experimentos possível.

2.3

Método proposto

O método selecionado para o desenvolvimento da dosagem foi a espectrometria de absorção atômica no forno de grafite em função de aspectos práticos e científicos, a saber:

- Esta técnica é a mais indicada para determinação de traços de metais em fluidos biológicos, por necessitar de pré-tratamento mínimo, aumentando a rapidez da análise, diminuindo os riscos de contaminação ou perda (que afetariam a exatidão), além de permitir uma determinação altamente automatizada.
- Tem alta sensibilidade e repetitividade, o que incorre em limites de detecção e quantificação adequados.
- É uma técnica robusta, capaz de contornar interferências.
- O laboratório já possui o equipamento instalado.