

# INCERTEZA DE MEDIÇÃO ASSOCIADA NA DETERMINAÇÃO DE ULTRATRAÇO EM AMOSTRAS DE SORO HUMANO POR MEIO DA TÉCNICA DE HRICP-MS

Renata Medeiros Lobo Müller, Jorge Eduardo de Souza Sarkis, João Cristiano Ulrich

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, Brasil, [rmuller@ipen.br](mailto:rmuller@ipen.br), [jesarkis@ipen.br](mailto:jesarkis@ipen.br), [jculrich@ipen.br](mailto:jculrich@ipen.br)

## Resumo

Neste trabalho, a concentração da solução padrão diluída, a concentração na alíquota, o peso da amostra e o estudo de recuperação foram identificados como as mais importantes fontes de incerteza, usando a técnica HRICP-MS. A contribuição destas fontes para a incerteza padrão expandida na concentração de Cu, Zn e Se nas amostras de soro humano foi avaliada e analisada alíquota foi identificada como a maior contribuição.

**Palavras-chave:** soro, ultratraços, HR-ICPMS.

## 1. INTRODUÇÃO

Os metais são elementos importantes na manutenção da vida, participam de processos fisiológicos essenciais para o metabolismo protéico e lipídico, reações enzimáticas e são componentes essenciais de muitas enzimas [1], as chamadas metalo-enzimas, que estão envolvidas na síntese, na regeneração e na degradação de moléculas biológicas, assim como na liberação e no reconhecimento de certas moléculas sinalizadoras biológicas e, por fim, na transferência de pequenas moléculas e elétrons e processos cruciais como a respiração.

Assim sendo o preciso conhecimento dos níveis de alguns metais, tais como: cobre (Cu), zinco (Zn), e selênio (Se) em amostras de soro humano constitui-se num importante dado para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da doença. Por essa razão, é necessário validar o procedimento químico para a obtenção de dados confiáveis obtidos por meio de procedimentos claramente definidos e rastreáveis de acordo com os critérios estabelecidos pela ISO [2].

Entre os principais parâmetros a serem estudados, a incerteza de medição desempenha um papel importante para a identificação das fontes de dispersão em cada etapa do procedimento analítico.

Nos últimos anos, várias técnicas têm sido empregadas para determinar os elementos de interesse, entre os quais destacamos a espectrometria de absorção atômica (AAS), análise por ativação neutrônica (NAA), espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivo (ICPOES) e a espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICPMS), que surgiu como uma poderosa ferramenta para análise, porque é uma técnica muito sensível, tem várias vantagens. A principal vantagem é a capacidade de analisar vários elementos simultaneamente em diferentes níveis de concentração, e de simplificar o procedimento analítico [3-10].

A maior dificuldade na determinação desses elementos na matriz soro está no fato deles ocorrerem à nível de ultratraço ( $\text{ng g}^{-1}$ ), e perto do limite de detecção das principais técnicas analíticas disponíveis.

Nesse trabalho é discutido as principais fontes de incerteza na determinação de Cu, Zn e Se em soro humano por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado (HRICP-MS).

## 2. MÉTODOS E MATERIAIS

### 2.1 Instrumentação

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo modelo Element 1, fabricado pela Finnigan MAT, Bremen, Alemanha. Esse instrumento apresenta um sistema analisador de dupla focalização de íons, com geometria reversa (Nier-Johnson): um analisador magnético seguido de um analisador eletrostático. Esse tipo de instrumento pode operar em três modos nominais de resolução: 300, 3000 e 7500.

Os dados foram gerados, no equipamento, de modo sequencial, de tal forma que o resultado obtido para cada isótopo representa a média de 10 medições em modo de resolução média.

### 2.2 Reagentes e Padrões

As soluções padrão foram preparadas usando solução padrão elementar Spex® (Spex Industries, Edson, New Jersey, USA) dos elementos estudados.

O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) grau analítico (Merck, Darmstadt, Germany) foi utilizado após purificação adicional por destilação sub-boiling em destilador de quartzo, para a diluição das amostras, preparação das soluções branco e da curva analítica, e água milli-Q (Millipore Milli-Q, Bedford, USA) com resistividade 18,2M $\Omega$  para a preparação da solução de ácido nítrico.

O material de referência certificado para soro, Serum Seronorm Trace elements (SERO, Norway) foi utilizado para a validação do método, sendo o mesmo submetido ao processo de reconstituição.

### 2.3 Preparação da amostra

Uma alíquota de 0,5g de cada amostra foi transferida para tubos de poliestireno graduados e o volume final de 10g foi obtido adicionando-se solução de  $\text{HNO}_3$  0,14M, até uma proporção final de 1:20. Solução do elemento Índio (In) foi utilizada como traçador nas determinações. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

### 2.4 Análise das amostras

As amostras foram analisadas no equipamento utilizando-se sistema de introdução de amostras composto por bomba peristáltica com fluxo controlado.

O cálculo das concentrações foi realizado através da interpolação dos dados obtidos da curva analítica (sinal de resposta versus concentração).

### 2.5 Análise e Quantificação das Incertezas

Com o objetivo de avaliar a incerteza envolvida no método de análises de soro humano por ICPMS foram estudados os seguintes parâmetros que afetam o resultado da determinação da concentração de cobre, zinco e selênio: a concentração da solução diluída do padrão estoque  $C_{dil}$ , que por sua vez produziu as soluções de calibração, a concentração do elemento na alíquota analisada,  $C_o$ , massa da amostra obtida por pesagem,  $m$  e o estudo de recuperação,  $R$ . Os componentes individuais da incerteza total são tratados na propagação de erros e a sua visualização gráfica, Figura 1, é mostrada no diagramas de causa e efeito [11].

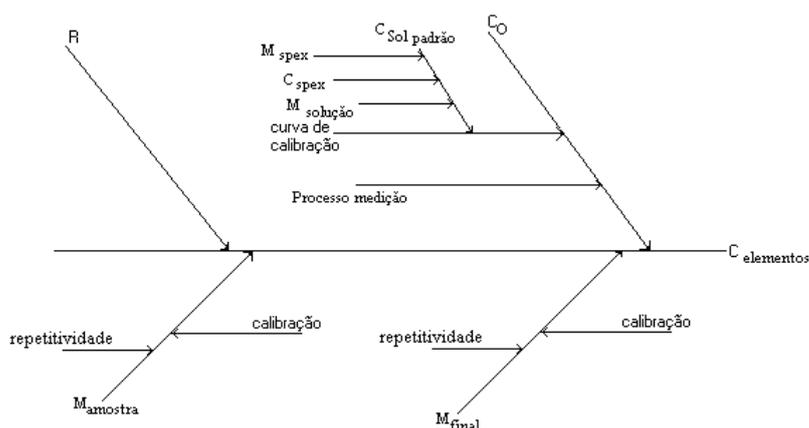


Figura 1. Diagrama de causa e efeito para o procedimento analítico na determinação dos elementos de interesse em amostras de soro humano

Nesse método, onde as amostras são diluídas, a concentração do analito é determinada pela seguinte equação [12]:

$$C_{Cu,Zn,Mn} = C_o \times \frac{M_f}{M_s} \times R \quad (1)$$

Onde:  $C_o$  = concentração de cada elemento na solução da amostra de soro;  $M_f$  = é a massa final após diluição;  $M_s$  = é a massa da amostra usada para a diluição;  $R$  = recuperação aparente [12], que corresponde  $C_{obs} / C_{ref}$ .  $C_{obs}$  = valor obtido durante a análise do material de referência,  $C_{ref}$  = valor do material de referência certificado.

A incerteza total foi calculada considerando as incertezas de cada fonte da equação 1. Para obter  $C_o$ , a regressão linear foi estabelecida pela análise em triplicata das soluções padrão contendo 0,5, 20, 40, 60, 80 e 100 ng g<sup>-1</sup> de cada analito. A incerteza no processo de medição foi calculada de acordo com a estatística clássica descrita por alguns autores [13,14].

Outra contribuição nesta fonte de incerteza ( $C_o$ ) é a incerteza associada com a concentração da solução padrão estoque. Esses componentes são associados e à incerteza combinada, do  $C_o$ , foi calculada.

A massa da amostra e a massa final foram obtidas por base peso, sendo assim, as fontes de incerteza a serem consideradas são aquelas aplicadas ao processo de pesagem, ou seja, a contribuição da incerteza informada no certificado de calibração da balança utilizada ( $u_1$ ), e os dados obtidos a partir de gráficos de controle do laboratório ( $u_2$ ).

$$u(m_s) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} \quad (2)$$

A incerteza associada com R,  $u(R)$ , é obtida através da combinação da incerteza no valor de referência com a média das observações [14].

$$u(R) = R \times \sqrt{\left(\frac{u(CRM)}{CRM}\right)^2 + \frac{s_{obs}^2}{n + C_{obs}^2}} \quad (3)$$

Onde:  $u(CRM)$  = incerteza padrão associada com a concentração da solução do material certificado;  $s_{obs}$  = desvio padrão obtido na análise das soluções replicata;  $n$  = número de replicata.

A incerteza padrão combinada é calculada a partir da raiz da soma dos quadrados dos componentes individuais, de acordo com as regras estabelecidas no Eurachem [11,15,16].

### 3. RESULTADOS AND DISCUSSÃO

A fim de avaliar a potencialidade da metodologia, inicialmente, um estudo de recuperação foi realizado com amostras de soro humano. Para este efeito, foi adicionada às amostras uma solução padrão multielementar de concentração 25, 50, 100, 150 e 200 ng Cu, Zn, Se / g na matriz estudada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 1.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 1, os analitos estudados apresentaram uma boa reprodutibilidade na faixa estudada. Isso foi considerado satisfatório para o objetivo do trabalho em virtude dos níveis dos analitos estarem de acordo com as faixas correspondentes aos elementos de interesse nos grupo de estudo.

$C_{add}$ ng.g <sup>-1</sup>	$C_{obs} \pm DP$ (ng g <sup>-1</sup> )		
	Cu	Zn	Se
25	30,0 ± 1,6	30,0 ± 3,9	28,5 ± 1,6
50	58,5 ± 2,0	61,5 ± 5,5	61 ± 2,0
100	115 ± 3,0	118 ± 5,0	125 ± 3,2
150	153 ± 7,6	151,5 ± 8,2	186 ± 4,3
200	228 ± 8,7	196 ± 9	262 ± 6,0

Tabela 1. Estudo de recuperação

Uma vez que as principais características da metodologia foram determinadas, o estudo de recuperação usando um material de referência certificado é conduzido. Todos os experimentos foram preparados em triplicata. Os resultados de medições, para cada elemento, são apresentados na Tabela 2.

Os resultados estão de acordo com os obtidos para esses elementos de interesse nas amostras adicionadas.

Material de Referência	Metal (ng g <sup>-1</sup> ) (média ± DP)	Valor Certificado (ng g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Cu	1104 ± 4,29	1300	84,91
Zn	1188,9 ± 4,88	1480	80,33
Se	79,65 ± 1,21	80	99,56

Tabela 2. Valores obtidos para o material de referência por HR-ICPMS

Os valores médios de concentração de três amostras de soro de voluntários, com seu respectivo desvio-padrão são apresentados na Tabela 3.

Elemento	Voluntário (1)	Voluntário (2)	Voluntário(3)
Cu	1001 ± 27	1111 ± 40	1423 ± 44,5
Zn	872 ± 30,3	987 ± 29	1084 ± 31,5
Se	40 ± 3,5	68,8 ± 4,3	90 ± 4,2

Tabela 3. Concentração dos analitos nas amostras de soro

Para uma melhor visualização dos valores de incerteza relativa de cada fonte de contribuição, são apresentados nas figuras 2 a 4, esses valores versus fontes de incerteza, para cada elemento determinado. Nestes gráficos, é possível visualizar qual fonte tem a maior contribuição para a incerteza total da metodologia.

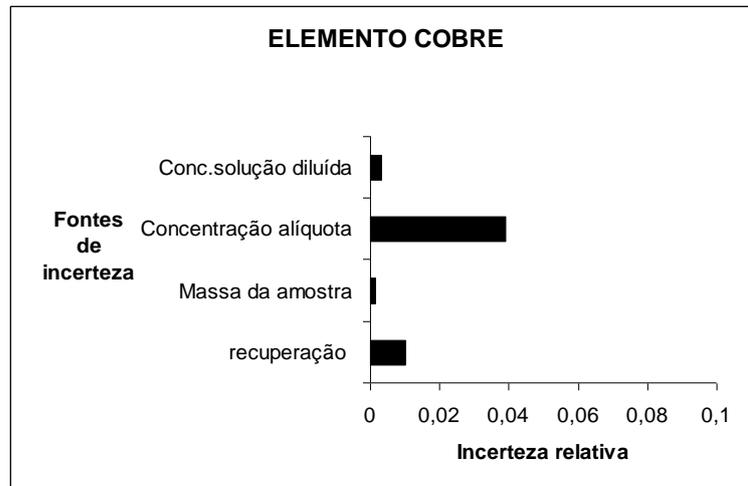


Figura 2. Contribuição individual para o elemento cobre

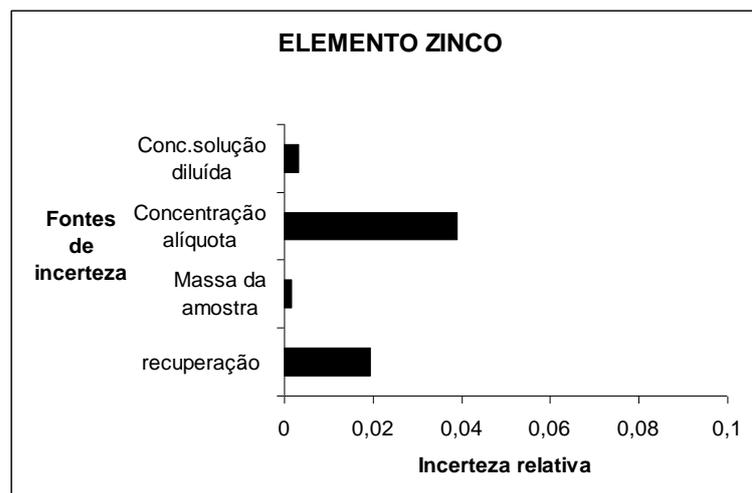


Figura 3. Contribuição individual para o elemento zinco

Como pode ser observado, a maior contribuição na incerteza total na determinação dos elementos cobre e zinco, foi a concentração na alíquota analisada. A incerteza expandida obtida para estes elementos foram em média 8% e 6%, respectivamente. Comparando os resultados para esses elementos, verifica-se que os mesmos apresentam concentrações aproximadas presentes na alíquota, e suas contribuições de incerteza em valores numéricos, são similares, isto significa que, segundo o método empregado, apresentaram características analíticas idênticas. Ou seja, nível de concentração compatível com a técnica e condições experimentais, como branco e curva.

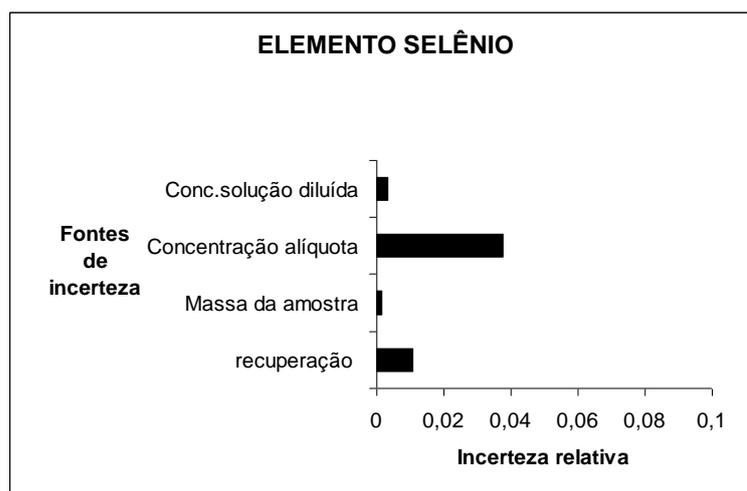


Figura 4. Contribuição individual para o elemento selênio

Para o elemento selênio, como observado na figura 4, a maior contribuição para incerteza expandida também foi a concentração na alíquota analisada e o estudo de recuperação. Mesmo neste nível de concentração, os resultados estão lineares com o desempenho do método, mas com maior grau de incerteza. Este elemento está presente em baixos níveis nas amostras analisadas (2,0; 3,4 e 4,5 ng g<sup>-1</sup>), valores estes próximos ao limite de quantificação (4 ng g<sup>-1</sup>), nas amostras em estudo.

Observa-se aqui uma característica importante e muito comum em trabalhos analíticos de rotina. A curva analítica (1,6 – 7,5 ng g<sup>-1</sup>) utilizada apresentou-se linear na faixa analítica de cobertura do elemento de interesse, mas também abaixo do limite de quantificação estabelecido pelo método. Isto significa que os pontos inferiores da curva, região de maior influência para o analito de interesse, apresentaram também uma precisão inferior aumentando o valor da incerteza na medição. Sendo assim, a repetitividade na curva analítica influenciou significativamente na determinação do elemento nas amostras. Uma alteração pode ser implantada na etapa de preparação das amostras com o objetivo de melhorar a estatística dos resultados obtidos na análise das alíquotas e assim melhorar a precisão das medidas (repetitividade) ou até mesmo aumentar a concentração deste elemento.

Neste caso, o analista poderia reduzir a incerteza padrão combinada ao fazer uma pré concentração da amostra, utilizar um sistema de introdução da amostra com melhor eficiência, ou reduzir o range da curva analítica. No entanto, todas estas ações irão apresentar mais esforços do laboratório e, certamente, trará outras fontes que possam contribuir para a incerteza padrão combinada.

#### 4. CONCLUSÃO

Os maiores fatores que influenciam no cálculo de incerteza consistem na concentração do analito e recuperação. Estes parâmetros podem variar dentro da rotina de um laboratório exigindo do analista uma avaliação contínua dos resultados obtidos em função das principais figuras de mérito da técnica e do procedimento analítico empregado, corrigindo cada etapa conforme a necessidade.

Verifica-se que algumas fontes de incerteza, como massa final, massa da amostra e concentração da solução diluída podem ser consideradas como insignificantes no processo de obtenção da incerteza expandida. Porém, elas devem ser consideradas e avaliadas, principalmente se houver mudança dos equipamentos utilizados ou do grupo envolvido na preparação das amostras.

Importante notar que, durante a rotina do laboratório seria difícil para o analista fazer o cálculo da incerteza para cada amostra analisada. Dessa forma, recomenda-se que o laboratório, além dos padrões certificados usualmente utilizados na validação das metodologias analíticas, disponha de amostra(s) de controle (QA/QC) que representem o material em estudo e que devem ser analisadas no início, meio e final de cada grande seqüência avaliando-se o comportamento instrumental e as incertezas durante o período de medição.

Finalmente cabe acrescentar que, conforme apresentado neste trabalho, o cálculo da estimativa de incerteza associada ao processo de medição é importante para a compreensão do procedimento analítico possibilitando assim melhorias ou ajustes. Cabe, portanto, ao analista decidir, em função dos objetivos da análise, se a introdução de etapas adicionais em seu

procedimento padrão poderá ser vantajosa ou não, levando em conta os objetivos da análise e influência da qualidade dos resultados obtidos na interpretação final dos dados.

## REFERÊNCIAS

- [1] Thompson, K.H.; Bhanot, S.; Mcneill, J.H. Essential trace elements of potential importance in management of diabetes mellitus. *Nutrition Research*, v. 14 (4), 1994, 593-604.
- [2] ISO (1995) Guide to the expression of uncertainty in measurement, International Organization of Standardization, Geneva (ISO GUM).
- [3] Hegde M.L.; Shanmugavelu P.; Vengamma B; Rao T.S.S.; Menon R.B; Rao R.V; Rao K.S.J. Serum trace element levels and the complexity of inter-element relations in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2004, 18,163-171.
- [4] Valkonen, S.; Aitio, A. Analysis of aluminium in serum and urine for the biomonitoring of occupational exposure. *Sci Total Environ*.1997,199 (1-2), 103- 110.
- [5] Ekmekcioglu, C.; Prohaska, C.; Pomazal, K.; Steffan, I; Scherthaner, G; Marktl,W. Biol. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 diabetes as compared to healthy controls. *Trace Elemen. Res.* 2001, 79 (3), 205-219.
- [6] Holcombe, D. G.; Neidhart, B.; Radvila, P.; Steck, W.; Wegscheider, W. Quality assurance good practice for research and development and non-routine analysis. *Anal Chim. Acta*.1999, 393,157-165.
- [7] Hill, S.J.; Arowolo, T.A.; Butler, O.T.; Cook, J.M.; Cresser, M.S.; Harrington, C; Miles, D.L. Atomic Spectrometry Update. *Environmental Analysis. J.Anal. Chem.* 2003, 18, 170 – 202.
- [8] Moens, L.; Verrept, P.; Dams, R.; Greb, U.; Gerhard, J.; Laser, B. New high-resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Technology Applied for the Determination of V, Fe, Cu, Zn and Ag in Human Serum. *J. Anal. At. Spectrom.*1994, 9, 1074 – 1078.
- [8] Riondato, J.; Vanhaecke, F.; Moens, L.; Dams, R. Determination of Trace and Ultratrace Elements in Human Serum With a Double Focusing Magnetic Sector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 933 – 937.
- [9] Scharamel, P.; Wendler, I. Capabilities of double focussing magnetic sector-ICP-MS for the determination of trace elements in body fluids (blood, blood serum, urine) at the example of control materials. *Anal.Bioanal. Chem.*1998, 361, 487.
- [10] Bocca, B.; Ammonti, A.; Petrucci, F.; Violante, N.; Sancesano, G.; Fone, G.; Serotome, O. Quantification of trace elements by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry in urine, serum, blood and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Spectrochim. Acta, Part B* 2004, 59 (4), 559 – 566.
- [11] EURACHEM/ CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2<sup>nd</sup> ed., 2000.
- [12] Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures – (IUPAC recommendations 2002). *Pure Appl. Chem.* 2002, 74 (11), 2201 – 2205.
- [13] Bjorn, E.; Nygren, Y.; Nguyen, T.T.T.N.; Ericson,C.; Nojd, M; Naredi, P. Determination of platinum in human subcellular microsamples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2007, 363 (1), 135 – 142.
- [14] Bettinelli, M. ICP-MS determination of Pt in biological fluids of patients treated with antitumor agents: evaluation of analytical uncertainty. *J.Microchem.* 2005, 79, 357 – 365.
- [15] Barwick, V.J.; Ellison, S.L.R.; Fairman, B. Estimation of uncertainties in ICP-MS analysis: a practical methodology. *Anal. Chim. Acta* 1999, 394, 281 – 291.
- [16] Chui, Q.S. H. Uncertainties related to linear calibration curves: A case study for flame atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 2007, 18 (2), 424 – 430.