

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE
DIGESTÃO E ESPECIAÇÃO PARA AMOSTRAS
BIOLÓGICAS”**

WLADIANA OLIVEIRA MATOS

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

**São Carlos - SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M433dp

Matos, Wladiana Oliveira.

Desenvolvimento de procedimentos de digestão e
especiação para amostras biológicas / Wladiana Oliveira
Matos. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

111f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Preparação de amostra (Química analítica). 2.
Microondas. 3. Especiação química. 4. Selênio. 5. Bovino -
sêmen. I. Título.

CDD: 543.02 (20^a)

**“O mistério é a coisa mais nobre
que podemos ter experiência.
É a emoção que se concentra no
cerne da verdadeira ciência.”**

Albert Einstein

**A minha família e ao Jota, por todo o amor, apoio e torcida para a
realização desse trabalho, e por terem compreendido minha
ausência todos esses anos.**

Agradecimentos

Com certeza, essa parte da tese deve tomar um bom número de palavras, pois durante todos os anos dedicados a esse trabalho pude contar com várias pessoas especiais. A contribuição dessas pessoas para a execução desse trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal não envolveu apenas o aspecto científico. Muito mais do que conhecimento em química, me ensinaram a trabalhar em grupo, respeitar as diferenças, sobre amizade e ética.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, em especial:

Agradeço à Dra Ana Rita de Araújo Nogueira pela orientação, confiança, amizade, incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho, atenção e doçura com que sempre trata seus alunos!

À Profa Dra. Regina Vincenzi Oliveira pela co-orientação, por todos os ensinamentos sobre cromatografia, apoio e total disponibilidade em contribuir com o trabalho e a todos do Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE;

Ao Professor Dr. Joaquim A. Nóbrega pela disponibilidade em ajudar no que fosse necessário para que esse trabalho se concretizasse, pelas discussões, ideias e pela amizade;

Ao Professor Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pelas discussões e sugestões para o desenvolvimento do trabalho em reunião de grupo;

Ao Professor Dr. Rubens Paes de Arruda (USP-Pirassununga) e ao seu grupo de pesquisa pela coleta das amostras;

Aos Professores Francisco José Krug (CENA/USP), Valderi Luiz Dressler (DQ/UFSM), Gian Paulo Giovanni Freschi (UNIFAL) e Márcia Andreia Mesquita Silva Veiga (FFCLRP/USP), membros da Banca Examinadora, por todos os comentários e sugestões;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida;

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos recursos para pesquisa;

A todos os professores do DQ/UFSCar que contribuíram para minha formação acadêmica;

Aos funcionários do DQ/UFSCar, em especial aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção e dedicação;

À Embrapa Pecuária Sudeste pela infra-estrutura concedida para a realização de parte deste trabalho;

Aos funcionários e ex-funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, Gilberto, Cadu, Carlão, Cidinha, Cristina, Cristina Campanelli, Lourdes, Vitor, Marcão, Mariana, Natália, Gilbertinho, Natal pela ótima convivência em todos esses anos e por toda a ajuda;

Aos companheiros de trabalho e amigos que fazem ou fizeram parte do GAIA: Adriana, Alexandra, Amália, Amanda, Ana Beatriz, Andréa, Caio, Carla Bossu, Catarinie, Clarice, Dani, Érica, Edivan, Eveline, Fabiana, Fernanda, George, Gilberto, Kelber, Lilian, Luana, Luciana, Lucimar, Marcelo, Mário, Marquinhos, Miriam, Natália, Patrícia, Poliana, Renata, Roberto, Rodrigo, Rodolfo, Rosilene, Sherlan, Silmara, Silvia, Silvéria, Simone e Telma pela amizade, bom ambiente de trabalho, sugestões, troca de conhecimentos, momentos de alegria e por terem sido minha família aqui em São Carlos;

Gostaria de agradecer especialmente à Catarinie pelos ensinamentos sobre ICP-MS. Obrigada, Cat, você mal me conhecia e foi tão prestativa no momento que mais precisei! Aos amigos Carla Bossu (Carlinha), Caio, Ju, Silmara, Lúcio, George, Nice, Fabiana, Alexandra; e aos amigos mais recentes, mas não menos especiais, Clarice, Pedro e Cadu. Vocês são muito especiais e não importa a distância, vocês sempre estarão no meu coração!

Aos amigos Eveline e Rodolfo que acompanharam mais de perto toda a minha trajetória aqui em São Carlos, pela forte amizade, pelas conversas, discussões científicas, apoio incondicional e momentos de descontração. Amo vocês!

Aos professores companheiros de trabalho e amigos do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará (UFC) que fizeram todos os esforços possíveis para a conclusão deste trabalho: Sandro, Gisele, Elisane, Helena, Simone, Belmino, Adriana, Pierre, Gracinha, Ronaldo, Fátima, Mozarina, Antônio Carlos, Antoninho, Haroldo, Alcinéia, Goretti, Pedro.

Agradeço especialmente aos professores e aos grandes amigos Sandro e Gisele pelo apoio, incentivo, conselhos, risadas, ótima convivência. Sou grata também a todos os alunos do LEQA: Allan, Silmara, Ticiane, Thalita, Natália, Jeovan, Wellington, Luciana e Rouse pela convivência tranquila, pela ajuda no trabalho e pela torcida.

Aos meus queridos amigos de Fortaleza Eveline, João Wilkson, Veruschka, Marco, Nahyara, Eliana, Rosa, Flor, Filipa por fazerem a minha vida mais feliz, pelas vibrações positivas, torcida e muitos momentos de alegria.

Ao Jota, meu amor, pelo apoio e incentivo a minha carreira profissional mesmo quando isso significou ficarmos fisicamente distantes. Obrigada pela paciência e por entender minha ausência. Agradeço todo carinho, amor, pelo ombro nos momentos difíceis, pelos incontáveis momentos de felicidade e por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

À família do Jota, Sr. Nataniel, Dona Nenê, Nahyara e Nathercia. Vocês são também minha família. Obrigada por todo carinho, amor e pela torcida. Vocês são muito especiais na minha vida!

Aos meus pais Raimundo e Ana e aos meus irmãos Wilton e Wlailton. Vocês são maravilhosos! Obrigada por formarem essa família linda! Nossa educação é contínua. Todos os dias estamos aprendendo algo da vida,

mas a nossa essência, a base do nosso caráter vem de casa, vem da nossa família. Agradeço por terem me ensinado o amor, a alegria de viver, o bem, a beleza, o respeito.

E, finalmente, à Deus por tudo.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 4.1 - Comprimentos de onda empregados na análise de C, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES..... | 41 |
| TABELA 4.2 - Programa de aquecimento usado na digestão total de tecidos de carne em forno de micro-ondas com cavidade..... | 42 |
| TABELA 4.3 - Planejamento fatorial 2^{4-1} aplicado para escolher a melhor condição experimental do método de decomposição proposto.. | 44 |
| TABELA 4.4 - Teores de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de carnes comerciais obtidos após digestão total e pelo método proposto neste trabalho | 47 |
| TABELA 4.5 - Teores de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, and Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) em materiais de referência certificado (CRM) após digestão pelo método proposto (parcial) e total..... | 50 |
| TABELA 5.1 - Comprimentos de onda empregados na análise de Al, C, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES..... | 55 |
| TABELA 5.2 - Programa de aquecimento usado na digestão de amostras em forno de micro-ondas com cavidade..... | 56 |
| TABELA 5.3 - Planejamento fatorial $2^2 +$ ponto central aplicado para escolher a melhor condição experimental do método proposto..... | 58 |
| TABELA 5.4 - Determinação dos elementos Ca, Mg, Al, Cu, Fe, Mn e Zn por ICP OES em amostras de ração humana após digestão convencional em forno de micro-ondas com cavidade e digestão usando o sistema proposto (IR-MW)..... | 62 |
| TABELA 5.5 - Determinação dos elementos Ca, Mg, Al, Cu, Fe, Mn e Zn por ICP OES em amostras de café após digestão convencional em forno de micro-ondas com cavidade e digestão usando o sistema proposto (IR-MW)..... | 63 |

| | |
|--|----|
| TABELA 5.6 - Determinação de material de referência certificado (Apple Leaves - NIST 1515) por ICP OES após digestão usando o sistema IR-MW..... | 65 |
| TABELA 6.1 - Condições de operação do ICP-MS empregadas nas análises de selênio total..... | 70 |
| TABELA 6.2 - Programa de aquecimento usado na digestão total de sêmen em forno de micro-ondas com cavidade..... | 72 |
| TABELA 6.3 - Determinação de selênio total em amostra de sêmen.... | 77 |
| TABELA 6.4 - Valores médios dos componentes do plasma seminal... | 79 |
| TABELA 6.5 - Programa de aquecimento empregado na determinação de selênio em amostra de sêmen por GFAAS..... | 81 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 3.1 - Representação do mecanismo de migração iônica..... | 12 |
| FIGURA 3.2 - Representação do alinhamento de uma molécula de água com o campo elétrico..... | 13 |
| FIGURA 4.1 - Minifrascos de PTFE e esterilizador de mamadeiras..... | 40 |
| FIGURA 5.1 - Sistema de digestão combinando aquecimento com radiação infravermelha e micro-ondas (IR-MW)..... | 54 |
| FIGURA 6.1 - Esquema da extração de lipídeos da amostra de sêmen..... | 73 |
| FIGURA 6.2 - Esquema da extração de proteínas da amostra de sêmen..... | 74 |
| FIGURA 6.3 - Esquema da extração de compostos de baixo peso molecular da amostra de sêmen..... | 75 |
| FIGURA 6.4 - Curva de temperatura de pirólise e atomização para 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se em meio 0,1% v v ⁻¹ HNO ₃ com modificador químico 1000 mg L ⁻¹ Pd..... | 80 |
| FIGURA 6.5 - Frações de proteína e lipídeo na amostra de sêmen..... | 84 |
| FIGURA 6.6 - Fracionamento de selênio na amostra de sêmen..... | 84 |
| FIGURA 6.7 - Estrutura química das espécies de selênio inorgânicas e orgânicas..... | 85 |
| FIGURA 6.8 - Estrutura química do par iônico dihidrogênio fosfato de tetrabutilamônio (HTBA)..... | 87 |
| FIGURA 6.9 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C ₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ + HTBA + 1% metanol (pH 6,5) (a) 2,5 mmol L ⁻¹ HTBA; (b) 5,0 mmol L ⁻¹ HTBA e (c) 7,5 mmol L ⁻¹ HTBA..... | 88 |
| FIGURA 6.10 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C ₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ + 2,5 mmol L ⁻¹ HTBA + 1% metanol. (a) pH 5,5; (b) pH 6,5 e (c) pH 7,5..... | 90 |

- FIGURA 6.11 - Estrutura química do par iônico trifluoracético (TFA)..... 91
- FIGURA 6.12 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + 2,5 mmol L⁻¹ HTBA + 0,5 mmol L⁻¹ TFA + 1% metanol (pH 5,5)..... 91
- FIGURA 6.13 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + 2,5 mmol L⁻¹ HTBA + 0,5 mmol L⁻¹ TFA + 1% metanol (pH 6,0)..... 93

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO E FRACIONAMENTO PARA AMOSTRAS BIOLÓGICAS. Em geral, a etapa de preparo de amostras é a mais crítica em uma sequência analítica. O desenvolvimento de procedimentos de preparo rápidos, simples, de baixo custo e que produzam menos resíduos é necessário. Nesse trabalho foram desenvolvidos dois métodos de digestão para amostras biológicas empregando radiação micro-ondas. Um dos métodos de digestão proposto consiste na decomposição parcial de amostras de carne assistida por radiação micro-ondas usando minifrascos de PTFE. Nesse procedimento, empregaram-se 50 mg de amostra e 50 μL de HNO_3 concentrado. A digestão é feita em 7 min, aplicando-se potência de 650 W. Recuperações na faixa de 95-109% foram obtidas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn determinados por ICP OES, quando o método foi aplicado em materiais de referência certificado de fígado e músculo bovino. O segundo método de digestão proposto combina o uso da radiação infravermelha à radiação micro-ondas, o que permite a decomposição de 1 g de amostras de café e ração humana em forno de micro-ondas com cavidade. Recuperações na faixa de 80-100% foram obtidas para Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn determinados por ICP OES em material de referência certificado. Outra parte do trabalho da tese foi dedicada ao estudo do fracionamento de selênio e identificação de espécies orgânicas e inorgânicas desse elemento em amostras de sêmen de bovinos. O selênio apresenta papel essencial em diversas funções de animais mamíferos. A infertilidade de humanos e animais, incluindo bovinos, está relacionada à carência desse elemento. Nesse contexto, realizou-se o estudo da distribuição de selênio nas fases lipídica, proteica e de compostos de baixo peso molecular em sêmen de bovinos. Desenvolveu-se método de separação cromatográfica Se(IV), Se(VI), metilselenocisteína e selenometionina, a fim de identificar essas espécies em amostra de sêmen bovino.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DIGESTION PROCEDURES AND FRACTIONATION FOR BIOLOGICAL SAMPLES. In general, sample preparation is the most critical step in an analytical sequence. The development of faster, simpler, cheaper and greener procedures is required. In this work, two digestion methods for biological samples using microwave radiation have been developed. One of proposed digestion methods consist on the partial decomposition of meat tissues using PTFE micro vessels under microwave radiation. In this procedure, it was used 50 mg of sample and 50 μ L of concentrated HNO₃. Digestion is carried out in 7 min applying 650 W microwave power. Recoveries around 100% were obtained for determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn by ICP OES, when the method was applied to bovine liver and muscle certified reference materials. The second proposed digestion method combines the use of infrared radiation with microwave radiation, which allowed the decomposition of 1 g of human food and coffee samples by using microwave oven cavity. Recoveries around 80-100% were reached in the determination of Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn by ICP OES in certified reference materials. Another part of the thesis work was dedicated to the study of selenium fractionation and identification of its organic and inorganic species in samples of bovine semen. Selenium presents essential role in several biological functions of mammals. Infertility in humans and animals, including bulls, is related to the lack of this element. In this context, selenium distribution in lipids, proteins and low molecular weight compounds fractions of bovine semen was evaluated. Besides, a chromatographic separation method for Se(IV), Se(VI) and selenomethionine methylselenocysteine species was developed, in order to identify these species in a semen bovine sample.

SUMÁRIO

| | |
|---|----------|
| 1 – Introdução..... | 2 |
| 1.1 - Apresentação..... | 2 |
| 1.2 - Preparo de amostras para determinação total de constituintes inorgânicos..... | 2 |
| 1.3 - Fracionamento e especiação de selênio em amostras de sêmen de bovinos..... | 4 |
| 2 - Objetivos..... | 7 |
| 3 - Revisão Bibliográfica..... | 9 |
| 3.1 - Preparo de amostras usando radiação micro-ondas para análise de teor total de elementos inorgânicos..... | 9 |
| 3.1.1 - Nutrientes inorgânicos..... | 9 |
| 3.1.2 - Preparo da amostra..... | 10 |
| 3.1.3 - Digestão de amostras assistidas por radiação micro-ondas..... | 11 |
| 3.1.4 - Uso de minifrascos de decomposição em digestões assistidas por micro-ondas..... | 16 |
| 3.1.5 - Radiação infravermelha..... | 18 |
| 3.1.6 - Métodos de preparo de amostra assistidos por radiação micro-ondas que possibilitam decomposição de massas maiores de amostra..... | 20 |
| 3.2 - Fracionamento e especiação de selênio..... | 22 |
| 3.2.1- Fracionamento e especiação química..... | 22 |
| 3.2.2 - Selênio..... | 24 |
| 3.2.3 - Determinação de selênio em sêmen..... | 27 |
| 3.2.4 - Determinação de selênio empregando ICP-MS..... | 29 |
| 3.2.5 - Acoplamento entre HPLC e ICP-MS..... | 31 |
| 3.2.6 - Separação das espécies de selênio usando cromatografia de fase reversa com pareamento iônico | 33 |
| 3.2.7 - Preparo de amostra para fracionamento e especiação de selênio..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 4 - Determinação de elementos inorgânicos em tecido animal após decomposição parcial assistida por radiação micro-ondas usando minifrascos..... | 39 |
| 4.1 - Materiais e Métodos..... | 39 |
| 4.1.1 - Amostras, reagentes e padrões..... | 39 |
| 4.1.2 – Instrumentação..... | 39 |
| 4.1.3 – Preparo de amostra..... | 41 |
| 4.1.4 - Planejamento Fatorial..... | 42 |
| 4.2 – Resultados e Discussão..... | 45 |
| 4.2.1 - Avaliação dos parâmetros experimentais da digestão parcial..... | 45 |
| 4.2.2 - Aplicação do método de digestão proposto em amostras de tecido bovino..... | 45 |
| 4.2.3 – Exatidão e precisão do método proposto..... | 48 |
| 4.3 - Conclusões..... | 51 |
| 5 - Avaliação do uso de radiação infravermelho combinada à radiação micro-ondas para quantificação de elementos inorgânicos usando ICP OES em amostras orgânicas..... | 53 |
| 5.1 - Materiais e Métodos..... | 53 |
| 5.1.1 - Amostras, reagentes e padrões..... | 53 |
| 5.1.2 - Instrumentação..... | 54 |
| 5.1.3 - Preparo de amostra em forno de micro-ondas com cavidade..... | 56 |
| 5.1.4 - Preparo de amostra empregando IR-MW..... | 56 |
| 5.1.5 - Planejamento Fatorial..... | 57 |
| 5.2 - Resultados e Discussão..... | 59 |
| 5.2.1 - Avaliação dos parâmetros experimentais do método de digestão proposto..... | 59 |
| 5.2.2 - Aplicação do método proposto em amostras de café e ração humana..... | 60 |
| 5.2.3 - Exatidão do método proposto..... | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3 – Conclusões..... | 66 |
| 6 - Fracionamento e especiação de selênio em sêmen de bovinos..... | 68 |
| 6.1 - Materiais e Métodos..... | 68 |
| 6.1.1 - Amostras, reagentes e padrões..... | 68 |
| 6.1.2 - Instrumentação..... | 69 |
| 6.1.3 - Preparo da amostra para determinação total de selênio..... | 71 |
| 6.1.4 - Fracionamento de selênio: extração de lipídeos, proteínas e compostos de baixo peso molecular..... | 72 |
| 6.1.5 - Otimização da separação cromatográfica das espécies de selênio..... | 75 |
| 6.2 - Resultados e Discussão..... | 76 |
| 6.2.1 - Determinação de teor total de selênio..... | 76 |
| 6.2.2 - Fracionamento de selênio em amostra de sêmen..... | 81 |
| 6.2.3 - Otimização da separação cromatográfica das espécies de selênio..... | 84 |
| 6.3 - Conclusões..... | 94 |
| Referências..... | 96 |

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Apresentação

Esta tese descreve os resultados de três trabalhos: (1) Determinação de elementos inorgânicos em tecido animal após decomposição parcial assistida por radiação micro-ondas usando minifrascos; (2) Avaliação do uso de radiação infravermelha combinada à radiação micro-ondas para quantificação de elementos inorgânicos usando ICP OES em amostras orgânicas; (3) Fracionamento e especiação de selênio em sêmen de bovinos.

Os dois primeiros trabalhos consistem no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras em forno de micro-ondas com cavidade para a determinação total de constituintes inorgânicos, e o terceiro trata do fracionamento e especiação de selênio em amostras de sêmen de bovinos. Dessa maneira, o capítulo de revisão bibliográfica (capítulo 3) relata trabalhos da literatura sobre esses dois tópicos.

O procedimento experimental, resultados e discussão e conclusões de cada trabalho foram descritos em três capítulos diferentes (capítulos 4, 5 e 6).

1.2. Preparo de amostras para determinação total de constituintes inorgânicos.

O preparo da amostra consiste em converter ou extrair o analito em um meio adequado, para sua posterior identificação e/ou quantificação. Comumente, técnicas espectrométricas requerem que a amostra se encontre na forma líquida. A técnica de ICP OES, por exemplo, requer ainda que a solução contendo o analito tenha baixos teores de compostos orgânicos, pois esses provocam interferências de transporte e instabilidade do plasma.

De todas as etapas de uma análise química, em geral, o preparo da amostra é a etapa que demanda maior tempo e é também onde há maiores riscos de contaminação e perda de analito. Em contrapartida, técnicas analíticas

rápidas, que determinam vários elementos em uma mesma análise, sensíveis, exatas e precisas têm sido desenvolvidas. Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que sejam compatíveis com essas técnicas modernas de análise, ou seja, procedimentos de pré-tratamento de amostras que sejam rápidos, simples, exatos, precisos e que gerem poucos resíduos.

Nesse contexto, dois métodos de digestão foram desenvolvidos nesse trabalho. Um dos métodos consiste na digestão parcial de amostras de carnes assistida por radiação micro-ondas usando minifrascos de PTFE. O emprego de minifrascos permite aplicar a ideia de frasco único, no qual pesagem, digestão e diluição da amostra, além da determinação dos analitos são realizadas em um único frasco. Esse fato diminui a manipulação de amostras, reduzindo os riscos de contaminação. Digestão em minifrascos também requer menores volumes de ácidos gerando, dessa maneira, menos resíduos e valores de brancos analíticos menores.

O segundo método de preparo de amostra reportado nesse trabalho associa a radiação infravermelha com a radiação micro-ondas, permitindo assim que massas maiores de amostra sejam digeridas em fornos de micro-ondas com cavidade, uma vez que a oxidação de parte da matéria orgânica é realizada usando radiação infravermelha, antes da decomposição da amostra em forno de micro-ondas. Esse procedimento potencializa o emprego de sistemas de micro-ondas com cavidade, melhorando a eficiência de análises de amostras heterogêneas e possibilitando a detecção de analitos em baixas concentrações. Pode ser também promissor na digestão de amostras que contenham altos teores de matéria orgânica.

1.3. Fracionamento e especiação de selênio em amostras de sêmen de bovinos

Selênio é essencial para o organismo de diversos animais por apresentar relação com funções vitais, tais como reprodução, crescimento, prevenção e proteção da integridade muscular. A baixa concentração desse elemento no sêmen tem sido relacionada com a infertilidade de homens e animais, incluindo bovinos.

O Brasil é um grande produtor de carne bovina, contudo os níveis de selênio no solo de áreas de criação de gado brasileiras são baixos. Uma vez que a concentração de selênio no solo reflete os níveis desse elemento nas plantas, áreas de criação de gado com solos pobres em selênio têm pastos com deficiência desse nutriente. Para contornar a deficiência de selênio e garantir a qualidade da fertilidade do gado, suplementos de selênio têm sido aplicados na dieta de bovinos. O consumo diário de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ Se proporciona uma margem de segurança satisfatória contra as variações alimentares encontradas no pastejo. Em geral, a suplementação de selênio é realizada pela adição de selênio na forma inorgânica (selenito ou selenato), contudo existem estudos com carneiros que demonstram a maior absorção de selênio por esses animais quando selênio é adicionado na forma orgânica.

Alguns trabalhos na literatura reportam o desenvolvimento de métodos para determinação de selênio total em amostras de sêmen e plasma seminal de bois para monitorar a influência desse elemento na reprodução desses animais. Porém, não foram encontradas na literatura informações quanto às formas em que esse elemento se encontra e como está distribuído no sêmen. Essas informações poderiam ajudar a compreender melhor o papel desse elemento na fertilidade de bovinos.

Dessa maneira, neste trabalho fez-se um estudo da distribuição de selênio nas frações lipídica, proteica e de baixo peso molecular no sêmen de bovinos. A determinação de selênio foi realizada por ICP-MS, em função da alta

sensibilidade da técnica e suas características favoráveis em relação ao acoplamento com técnicas cromatográficas. Além disso, realizou-se o desenvolvimento de separação das espécies Se(IV), Se(VI), seleno-L-metionina e Se-metil-selenocisteína por cromatografia em fase reversa com pareamento iônico, para a identificação dessas espécies em amostras de sêmen.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

As propostas deste trabalho são:

- 1) Desenvolvimento de procedimentos de digestão assistidos por radiação micro-ondas para diferentes amostras biológicas;
- 2) Estudo da distribuição de selênio em amostra de sêmen de bovinos e identificação de espécies de selênio usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (HPLC-ICP-MS).

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Preparo de amostras usando radiação micro-ondas para análise de teor total de elementos inorgânicos

3.1.1. Nutrientes inorgânicos

Alguns elementos inorgânicos são importantes para o bom funcionamento do organismo e têm como principal fonte os alimentos. Esses elementos são, comumente, classificados em macro e micronutrientes de acordo com a quantidade requerida para o funcionamento adequado do organismo. Dentro dessa classificação cálcio, magnésio, potássio e sódio se enquadram como macronutrientes; enquanto que os demais, tais como cromo, cobalto, cobre, ferro, molibdênio, níquel, selênio, zinco etc., são considerados micronutrientes.¹

As funções dos nutrientes inorgânicos no organismo estão relacionadas, principalmente, com a constituição de ossos e dentes; ao controle da composição das células e fluidos do corpo, quando esses elementos estão na forma de sais solúveis; e ao bom funcionamento de enzimas e proteínas funcionais. Ferro e cobre, por exemplo, ocorrem no grupo prostético de várias enzimas relacionadas a processos de oxidação e redução celular.²

Além das funções já citadas, alguns elementos também são encontrados em outros importantes componentes funcionais do organismo, incluindo hormônios e vitaminas. Zinco, por exemplo, está envolvido na produção e estocagem do hormônio insulina em células beta do pâncreas. E cobalamina, ou vitamina B₁₂, contém cobalto.²

Dessa maneira, a avaliação dos níveis de macro e micronutrientes inorgânicos em diferentes amostras biológicas é importante.

3.1.2. Preparo da amostra

Uma sequência analítica envolve, basicamente, as seguintes etapas: amostragem, armazenagem, preparo da amostra (lavagem, secagem, moagem, separação de partículas, pré-concentração, separação de interferentes, decomposição de compostos orgânicos), determinação dos analitos de interesse, tratamento dos dados obtidos, interpretação dos dados e ação a ser tomada diante da conclusão final da análise.³ Os procedimentos a serem realizados dependem do tipo de matriz e do analito que se deseja avaliar.

A determinação de elementos inorgânicos por técnicas espectrométricas, como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), requer, na maioria dos casos, que a amostra esteja na forma líquida. Dessa maneira, procedimentos para a conversão de amostras que se encontrem no estado sólido em líquidas são necessários. Além disso, essas técnicas exigem também a remoção da matéria orgânica através de procedimentos de decomposição da amostra. A presença de compostos orgânicos pode conduzir a mudanças na tensão superficial da solução da amostra, provocando erros de transporte do analito até o plasma. Altas concentrações de matéria orgânica podem também afetar as condições de equilíbrio térmico do plasma e causar a formação de fuligem. Portanto, a eficiência de métodos de decomposição de amostra é geralmente avaliada através da análise da porcentagem de carbono residual (% RCC) na solução final, após o processo de digestão.⁴

Em geral, o preparo da amostra é a etapa considerada mais crítica em uma sequência analítica por produzir a maior porcentagem de erros.⁵ É também a etapa mais morosa,⁶ o que torna os procedimentos de tratamento de amostra incompatíveis com o desenvolvimento de técnicas de medidas rápidas e que determinam vários analitos em uma mesma alíquota aspirada da amostra,

como por exemplo, ICP OES e ICP-MS. Além disso, é a etapa onde há maiores riscos de perda de analito e de contaminação.

Procedimentos de decomposição de amostra assistidos por radiação micro-ondas em frascos abertos e fechados têm sido largamente utilizados para a digestão de amostras orgânicas, fato que contribui para a redução da lacuna entre o preparo de amostras e técnicas analíticas modernas.⁷ Contudo, o desenvolvimento de procedimentos de decomposição assistidos por micro-ondas que sejam rápidos, simples, de baixo custo e que estejam de acordo com a química verde ainda é necessário.

3.1.3. Digestão de amostras assistida por radiação micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas que possuem comprimento de onda entre 1 mm e 1 m e frequência que varia de 300 a 300000 Hz. Contudo, apenas as frequências 915, 2450, 5800 e 22125 são permitidas pela Comissão Federal de Comunicações e pelas Leis Internacionais de Rádio para uso industrial, científico e doméstico. É uma radiação não ionizante e, portanto, não possui energia necessária para quebrar as ligações químicas de moléculas. O emprego da radiação micro-ondas em decomposição de amostras baseia-se no aquecimento de materiais através da absorção direta dessa energia. Esses materiais aumentam de temperatura devido, principalmente, à interação entre a onda eletromagnética e os íons dissolvidos, que sofrem migração iônica, e o solvente presente, o qual sofre rotação de dipolos.⁸

A migração iônica resume-se ao movimento eletroforético dos íons em solução. O campo elétrico oscilante produzido pelas micro-ondas promove o deslocamento dos íons dissolvidos em direção aos pólos com cargas opostas. Esse deslocamento produz um fluxo de corrente cujo movimento sofre resistência devido às outras espécies que estão no fluxo oposto (Figura 3.1). A resistência ao deslocamento produz calor devido à perda de energia, elevando a temperatura da solução.⁹

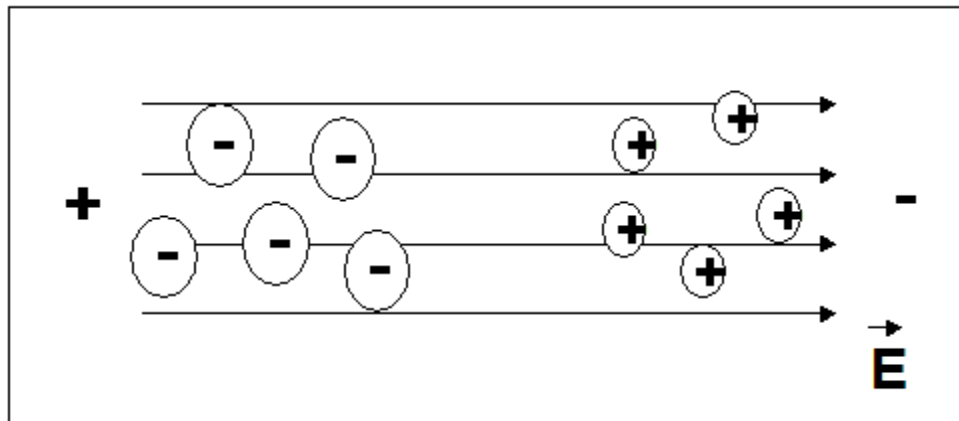


Figura 3.1- Representação do mecanismo de migração iônica.³

O fenômeno da rotação de dipolos consiste no alinhamento das moléculas contidas na amostra que possuem momento dipolar induzido ou permanente com o campo eletromagnético (Figura 3.2). Como as ondas eletromagnéticas geram campos elétricos positivos e negativos alternados, isso causa desordem e agitação das moléculas dipolares. Dessa maneira, a energia absorvida para o realinhamento das moléculas é transformada em calor.⁹

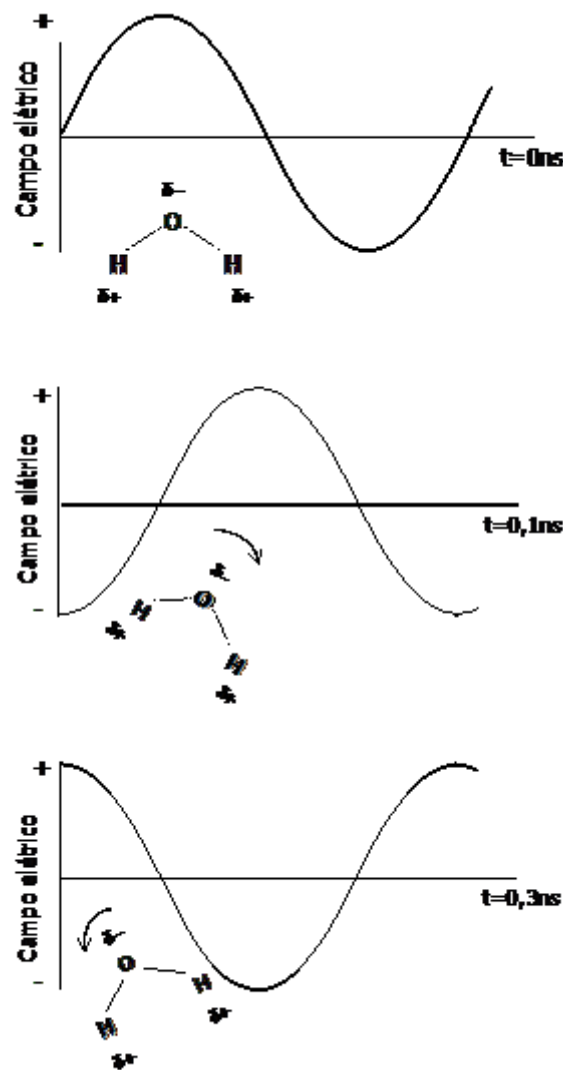


Figura 3.2 – Representação do alinhamento de uma molécula de água com o campo elétrico. [apud ref. 3]

Dependendo do tipo de material irradiado, a radiação micro-ondas pode: ser refletida, ou seja, o material não interage com a onda eletromagnética; atravessar o material sem causar nenhum efeito no mesmo (esse tipo de material é considerado transparente às micro-ondas); ou ser total ou parcialmente absorvida. Dos três tipos de interação citados, a absorção da radiação é o efeito explorado nas decomposições assistidas por radiação micro-ondas. Quando a energia é absorvida, transforma-se em energia térmica e a temperatura do meio reacional se eleva.¹⁰

Os primeiros experimentos de decomposição de amostra usando radiação micro-ondas foram realizados em 1975 usando frascos fechados em fornos de micro-ondas domésticos. Contudo, somente a partir do final da década de 80 o interesse nessa radiação para o preparo de amostras foi retomado. Dentre as principais vantagens apresentadas pela energia micro-ondas sobre aquecimento convencional estão o aquecimento direto, rápido, sem contato com a amostra e uso de menores quantidades de reagentes gerando, portanto, menos resíduos.¹¹

A fim de obter sistemas de decomposição mais seguros e que permitissem maior controle do processo de decomposição, fornos de micro-ondas para uso em laboratório foram desenvolvidos. Esses fornos permitem o monitoramento de pressão e temperatura nos frascos de decomposição, possuem sistemas de segurança contra eventuais explosões e frascos de decomposição com resistência mecânica que suportam elevadas pressões e temperaturas.¹⁰

Dois tipos de sistemas de fornos de micro-ondas foram desenvolvidos para uso em laboratório: sistema de decomposição abertos com radiação micro-ondas focalizada e sistemas de decomposição fechados em fornos de micro-ondas com cavidade. No primeiro caso, as decomposições são realizadas em frascos fechados, mas à pressão atmosférica. Em contrapartida, nos sistemas chamados de fechados a digestão da amostra é realizada a altas pressões.¹⁰

Os sistemas fechados de decomposição por micro-ondas empregam fornos contendo magnetron, guia de ondas, distribuidor de ondas, cavidade, frasco de decomposição e rotor. De uma maneira geral, a radiação é produzida pelo magnetron e conduzida até a cavidade do forno pelo guia de ondas. A radiação é então dispersa pelo distribuidor de ondas de maneira que a zona próxima ao centro da cavidade receba maior irradiação. O rotor (bandeja rotatória), onde estão posicionados os frascos de decomposição, permite com que esses frascos recebam a radiação de forma homogênea e reproduzível.³

Os frascos de decomposição empregados em decomposições em sistemas fechados possuem, em geral, volumes internos de 25 a 120 mL e são fabricados com material transparente à radiação micro-ondas. Os materiais mais empregados são PTFE (Teflon[®] é marca registrada da DuPont), PFA (perfluoroalcoxi) e TFM[®] (marca registrada da Hoechst para PTFE quimicamente modificado). PFA e TFM são preferidos por suportarem temperaturas mais altas, 260 °C. Além disso, PFA e TFM são menos porosos do que PTFE, o que evita contaminação e perdas de analito por adsorção. Frascos de quartzo também são utilizados em alguns fornos, o que possibilita o emprego de temperaturas e pressões mais elevadas no processo de decomposição. O quartzo suporta temperaturas e pressões de até 280 °C e 120 bar, respectivamente.¹¹

As vantagens do uso de sistemas fechados de decomposição assistidos por radiação micro-ondas são: alta temperatura e pressão no processo de decomposição, o que permite realizar digestões mais rápidas e com maior eficiência, inclusive de amostras mais difíceis de decompor; menores riscos de contaminação e perda de analitos voláteis; e menor consumo de reagentes produzindo, dessa maneira, menos resíduos. Em contrapartida, são sistemas que permitem decompor pequenas quantidades de amostra, em geral aproximadamente 250 mg.³ Apesar de modelos de fornos de micro-ondas com cavidade mais recentes permitirem a decomposição de até cerca de 1,0 g de amostra, a temperatura de decomposição é limitada a 180 °C. Visto que temperaturas acima de 200 °C são necessárias para uma rápida e efetiva oxidação da matéria orgânica, segundo investigações de Würfels *et al.*¹²⁻¹⁵, provavelmente amostras com teores mais elevados de matéria orgânica não seriam adequadamente decompostas quando maiores quantidades de amostras fossem empregadas nesses novos sistemas de decomposição.

3.1.4. Uso de minifracos de decomposição em digestões assistidas por radiação micro-ondas

Os frascos de decomposição normalmente empregados em sistemas de fornos de micro-ondas comerciais para uso em laboratório possuem volume interno superior a 25 mL. Porém, alguns estudos também avaliaram o uso de frascos com volumes menores que 4 mL (minifracos) em sistemas de decomposição por micro-ondas.

Segundo esses estudos, o uso de minifracos de decomposição promoveu o aumento da frequência analítica devido ao rápido aquecimento fornecido pelas micro-ondas.¹⁶ Bocca *et al.* (2003)¹⁷ usaram mais de 80 minifracos em um rotor de micro-ondas caseiro e amostras de urina, soro e sangue foram digeridas em 40 min. Frascos de pequeno volume também foram adaptados para fornos de micro-ondas com sistema aberto.

Uma das grandes vantagens da aplicação de minifracos de decomposição é a possibilidade de usar o conceito de frasco único, no qual pesagem, decomposição, diluição e determinação dos analitos são realizados em um mesmo frasco. Isso diminui a manipulação de amostras e reduz os riscos de contaminação. Além desses fatores, a solução final da digestão não é excessivamente diluída, o que promove o aumento de sensibilidade do método.^{16,18,19}

Decomposição de amostras de cabelo em minifracos com aquecimento em forno de micro-ondas doméstico para posterior determinação de arsênio por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS) foi avaliada por Flores *et al.* (2001)²⁰. O procedimento envolve a oxidação da matéria orgânica usando ácido sulfúrico e ácido nítrico em combinação com ácido clorídrico, sendo este último adicionado em uma etapa específica do programa de aquecimento. O digerido final apresentou 55% de carbono residual. Apesar da decomposição não ter sido completa, a matéria

orgânica presente não interferiu nas determinações por HGAAS. Com esse procedimento foi possível decompor 80 amostras em uma hora e meia.

O uso de micro-ondas doméstico em decomposições não é recomendado devido aos riscos de explosões e a ausência de sistemas de segurança.¹⁶ Contudo, um aumento de pressão menos crítico é observado quando se emprega frascos de decomposição de pequeno volume em fornos de micro-ondas que não foram desenhados para uso em laboratórios.^{20,21} As vantagens de combinar o uso de fornos de micro-ondas doméstico com minifrascos de decomposição são simplicidade, baixo consumo de reagentes, menores diluições e possibilidade de decomposição de maior número de amostras.²¹

Outros procedimentos que empregam minifrascos para digestão de amostra são aqueles relatados para digestão em fase vapor usando ácidos inorgânicos. A digestão em fase vapor baseia-se no contato entre o vapor do ácido e as amostras, oferecendo a possibilidade de purificação do ácido, o que previne a introdução de impurezas na solução final, menores valores de brancos analíticos e menores limites de detecção.^{22,23,24,25} De acordo com Matusiewicz (1991)²², nenhuma transferência de impureza do reagente ocorre durante o processo de digestão em fase vapor assistido por radiação micro-ondas. O uso de menores massas de amostras nesses procedimentos é comum porque os recipientes de digestão têm volume pequeno, o que também favorece a interação do vapor com as partículas da amostra.

A digestão em fase vapor também foi testada em forno com micro-ondas focalizadas.^{25,26,27} A eficiência da decomposição da matéria orgânica diminuiu de acordo com a localização dos frascos, da base para o topo, do suporte onde eram posicionados os minifrascos. Isso mostra que a temperatura e a possibilidade de interação com as micro-ondas têm um efeito pronunciado da digestão em fase vapor.²⁸

3.1.5. Radiação infravermelha

A radiação infravermelha está posicionada no espectro eletromagnético entre as radiações visível e micro-ondas. O comprimento de onda na região do infravermelho varia entre 780 nm a 1000 μm e a frequência entre $3,0 \times 10^{11}$ a $3,8 \times 10^{14}$ Hz. Essa região pode ser dividida em três: infravermelho próximo (0,78-2,5 μm), infravermelho médio ou fundamental (2,5-50 μm) e infravermelho distante (50-1000 μm).²⁹

Assim como a radiação micro-ondas, a radiação infravermelha não é ionizante. Possui energia da ordem de 0,0012 a 1,5580 eV, a qual não é suficiente para o rompimento de ligações químicas, mas provoca aumento dos movimentos vibracionais e rotacionais das moléculas. As fontes de radiação infravermelha são constituídas por um sólido inerte que é aquecido eletricamente a uma temperatura compreendida entre 1500 e 2200 K.²⁹

No preparo de amostra, a radiação infravermelha tem sido pouco explorada.³⁰ O emprego dessa radiação mais comum é no processo de secagem de amostras sólidas que apresentam água em quantidade variável. As amostras são submetidas a aquecimento aplicando-se temperaturas relativamente amenas para evitar riscos de perda de analito por volatilização e degradação térmica da amostra.

Aquecimento usando radiação infravermelha também é aplicado em processos de purificação de ácidos usados em decomposições de amostras para análises de analitos em baixas concentrações, nas quais ácidos inorgânicos podem ser fontes de contaminação severas. O processo de purificação de ácidos inorgânicos realizado por destilação abaixo do ponto de ebulição do reagente foi proposto por Kuehner *et al.* (1972)³¹ e foi denominado de “*sub-boiling distillation*”. O processo consiste no aquecimento do ácido com radiação infravermelha através de uma resistência elétrica aquecida por efeito Joule, devidamente protegida por um invólucro de vidro ou quartzo. A superfície do reagente líquido é vaporizada sem entrar em ebulição e o vapor é condensado

em um dedo frio, em geral feito de quartzo de alta pureza, e o líquido condensado (reagente puro) é coletado. O reagente final obtido possui teores de impurezas semelhantes ou até menores do que os ácidos ultrapuros comerciais.

Alguns trabalhos também utilizam radiação infravermelha para dessolvatação de aerossol em análises por ICP OES e ICP-MS.^{32,33,34,35} A dessolvatação de aerossol ocorre em duas etapas: na primeira etapa é realizado o aquecimento do aerossol em que o solvente é parcial ou totalmente evaporado das gotículas de aerossol e na segunda etapa o vapor de solvente é removido do fluxo do aerossol. O aquecimento do aerossol pode ser realizado por radiação infravermelha. Os sistemas de dessolvatação reduzem a quantidade de solvente que alcança o plasma, amenizando interferências.³⁶

O aquecimento provocado por radiação infravermelha também pode ser empregado em sistemas de decomposição por combustão. Na combustão em frasco de Schöniger, a amostra é confinada em um envoltório, que pode ser um papel, o qual fica suspenso em um frasco fechado contendo um pequeno volume de uma solução absorvedora, adequada para reter todos os analitos de interesse. O ar contido no interior do frasco é substituído por oxigênio e a ignição da amostra é realizada por meio de uma lâmpada de infravermelho com auxílio de uma lente ou usando uma corrente elétrica. A amostra e o papel queimam na presença de atmosfera de oxigênio e, após resfriamento, o frasco é agitado vigorosamente. A análise é realizada na solução resultante.³⁷

Sistema de combustão dinâmico desenvolvido por Knapp *et al.*³⁸ que ficou conhecido como *Trace-o-Mat* utiliza a irradiação de duas lâmpadas de infravermelho para provocar a ignição da amostra no processo de combustão. Nesse método, a amostra é peletizada com uma prensa manual, posicionada em um suporte de quartzo juntamente com uma pequena tira de papel em uma câmara de combustão. A câmara de combustão é conectada a uma unidade de resfriamento preenchida com nitrogênio líquido. Oxigênio é introduzido na câmara de combustão e duas lâmpadas de infravermelho promovem a ignição da

amostra. Os produtos voláteis são retidos no condensador contendo nitrogênio líquido. Os elementos não voláteis são solubilizados em ácido.

Gouveia e colaboradores³⁰ desenvolveram procedimento de decomposição parcial de amostras submetidas à radiação infravermelha proveniente de três lâmpadas. A exatidão do método foi verificada pela análise de amostras certificadas de fígado bovino e folhas de macieira, sendo obtidas recuperações satisfatórias para Cu, Mn, Zn e Sr. O método foi aplicado em amostras de fígado bovino “in natura” e os teores dos elementos cobre e manganês foram comparados aos obtidos empregando decomposição assistida por forno de micro-ondas com cavidade. De acordo com o test *t de Student* com um nível de confiança de 95%, as concentrações obtidas dos dois elementos são concordantes para todas as amostras.

3.1.6. Métodos de preparo de amostra assistidos por radiação micro-ondas que possibilitam decomposição de massas maiores de amostra

Como já mencionado anteriormente, os métodos de digestão em forno de micro-ondas com cavidade apresentam várias vantagens sobre os métodos de decomposição convencionais e os que empregam fornos de micro-ondas focalizados, tais como menores riscos de contaminação, evitam a perda de elementos voláteis, são mais rápidos, consomem menores quantidades de reagente e, portanto, produzem menos resíduos. Porém, esses procedimentos, geralmente, se limitam a decompor até aproximadamente 250 mg de amostra. Essa limitação representa uma dificuldade quando se pensa em determinações de elementos em baixas concentrações em laboratórios que não possuem técnicas muito sensíveis, além de comprometer a exatidão e a precisão da análise, nos casos em que a amostra é pouco homogênea.

Fornos de micro-ondas com radiação focalizada permitem a digestão de maiores massas de amostra (cerca de 10 g) porque são sistemas

abertos de decomposição. Sistemas de decomposição assistidos por radiação focalizada operam à pressão atmosférica não apresentando, portanto, restrições associadas com aumentos de pressão encontrados nos sistemas fechados.³ Contudo, esses sistemas requerem grandes volumes de ácidos concentrados, o que pode gerar digeridos com elevadas concentrações ácidas, necessitando que sejam realizadas elevadas diluições antes de serem conduzidas à técnicas espectroanalíticas com sistemas de introdução de amostras convencionais para determinação dos analitos.³⁹

Técnica alternativa para a decomposição de maiores quantidades de massas de amostras foi proposta por Flores *et al.* (2007).⁴⁰ A técnica, que foi denominada de combustão iniciada por micro-ondas (MIC – Microwave Induced Combustion), associa as vantagens da digestão por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas e da combustão em sistemas fechados. O método consiste na combustão de amostras orgânicas em frascos fechados de quartzo pressurizados com oxigênio, sendo a ignição provocada por radiação micro-ondas. Depois de efetuada a combustão, os gases produzidos são absorvidos por uma solução apropriada e uma etapa de refluxo pode ser realizada para garantir a recuperação dos analitos. Ácidos diluídos podem ser empregados em MIC como solução absorvedora para muitos analitos.^{40,41} MIC é recomendada para digestão de carvão para posterior determinação de Cl^{42,43}, F⁴⁴ e Hg⁴⁵. Outras aplicações incluem a determinação de Br^{46,47}, Cl⁴⁷ e S^{48,49,50} em amostras de borracha e plásticos e determinação de S em materiais carbonáceos.⁵¹

As principais características da técnica MIC são: possibilita a combustão de aproximadamente 500 mg de amostra; os frascos de digestão por micro-ondas com cavidade são os mesmos daqueles utilizados no forno convencional, não havendo necessidade de nenhuma modificação no frasco, na parte do rotor ou no sistema do controle de pressão; fornece baixos valores de

brancos; e, ao contrário de outras técnicas de combustão, MIC permite uma etapa de refluxo que minimiza potenciais perdas de analitos por adsorção.⁴¹

Outro procedimento usando combustão em fornos de micro-ondas foi proposto. Nesse procedimento, a decomposição é baseada na combustão induzida por radiação micro-ondas focalizada (FMIC – focused microwave-induced combustion).⁵² Forno de micro-ondas focalizado comercial com suporte de amostras de quartzo confeccionados no laboratório e um frasco de vidro modificado foram usados no processo de combustão. As condições de operação foram avaliadas para a determinação de Al, Ba, Ca, Fe, Mg, Mn, Sr e Zn em amostras de plantas. A combustão é realizada em menos de dois minutos e a temperatura atinge valores superiores a 950 °C. Os resultados foram comparados com os obtidos por digestão em forno de micro-ondas focalizado e por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados de altas pressões. Com o procedimento proposto, 95-103% de recuperações foram obtidas quando materiais de referência certificados foram digeridos. Decomposição completa da amostra (teor de carbono residual menor que 0,5%) foi alcançado com baixo consumo de reagente (10 mL de ácido nítrico diluído). A nova técnica permitiu a decomposição de grandes massas de amostra (~ 1500 mg).

3.2. Fracionamento e especificação de selênio

3.2.1. Fracionamento e especificação química

Nos últimos anos, pesquisas científicas envolvendo o desenvolvimento de procedimentos analíticos que forneçam informações sobre essencialidade e toxicidade, mobilidade, biodisponibilidade, função bioquímica e impacto ambiental de elementos inorgânicos são cada vez mais frequentes e necessárias. A análise apenas do teor total de elementos químicos na amostra, em muitas situações, não é suficiente para a obtenção de todas essas informações.⁵³

A diferença do nível de toxicidade das diversas formas químicas de um mesmo elemento é um exemplo de que a determinação apenas da concentração total de tais elementos pode não ser, em alguns casos, o mais adequado. O cromo, por exemplo, quando se encontra no estado de oxidação três, Cr(III), é considerado um nutriente essencial, pois está envolvido no metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas. Por outro lado, Cr(VI) é tóxico para homens, animais e plantas, por estar relacionado a diversos danos clínicos tais como câncer no pulmão, irritação e ulceração nasal, reações de hipersensibilidade e dermatite por contato. Para o arsênio, a maioria de seus compostos orgânicos são menos tóxicos do que suas espécies inorgânicas. Em contrapartida, as formas orgânicas dos elementos mercúrio, chumbo e estanho são mais tóxicas do que suas formas inorgânicas.⁵⁴

Dessa maneira, métodos analíticos envolvendo o fracionamento para análise do teor total de elementos nas frações e análise de especiação química, sendo esses dois procedimentos aplicados em conjunto ou não, têm sido focos de estudos a fim de adquirir mais conhecimento do papel dos diversos elementos químicos na natureza.

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)⁵⁵, fracionamento consiste em um processo de classificação de um analito ou grupo de analitos de uma amostra de acordo com características físicas (ex: tamanho, solubilidade) ou características químicas (ex: reatividade, tipo de ligação). E especiação elementar é a análise que possibilita determinar a distribuição das espécies químicas, ou seja, forma específica do elemento químico (estrutura molecular, composição isotópica, estado de oxidação etc.), de um elemento em uma amostra.

De maneira geral, as etapas de um processo de análise química envolvem basicamente a amostragem, o preparo das amostras, a detecção e o tratamento dos dados analíticos. Para a especiação, o preparo da amostra usando os métodos convencionais de decomposição total da amostra, não são aplicáveis.

Para esse tipo de análise, condições brandas, porém evasivas, que não degradem as formas químicas originais dos elementos químicos, são requeridas. Após o preparo da amostra, as espécies de interesse podem ser separadas por cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou eletroforese capilar antes da detecção. Por outro lado, em análise química empregando fracionamento, o preparo da amostra consiste em submeter à amostra a sucessivas etapas com reagentes de diferentes propriedades químicas (acidez, potencial redox, polaridade, propriedades complexantes etc.) obtendo várias frações, com características distintas, contendo o elemento de interesse. Após o preparo da amostra, a determinação do teor total do elemento nessas frações é realizada.

Obviamente, análises de especiação e de fracionamento necessitam de técnicas de detecção sensíveis, visto que essas análises implicam em quantificar frações do teor total do elemento, que por sua vez, geralmente, encontra-se em baixas concentrações.

3.2.2. Selênio

O selênio foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jakob Berzelius. Selênio tem número atômico 34, massa atômica 78,96 u.m.a. e é classificado como um semimetal. Está localizado no grupo VIA, entre os elementos enxofre e telúrio, e no 4º período, entre o arsênio e o bromo, na tabela periódica. Pode assumir os estados de oxidação -2, 0, +2, +4 e +6. Os cinco isótopos estáveis desse elemento e suas respectivas abundâncias são: 74 (0,87%), 76 (9,02%), 77 (7,58%), 78 (23,52%), 80 (49,82%), 82 (9,19%).⁵⁶

Selênio tem propriedades químicas similares às do enxofre com respeito ao tamanho do átomo, energia de ligação, potencial de ionização e afinidade eletrônica. Por possuir comportamento químico semelhante ao do enxofre, selênio compõe um grande número de compostos orgânicos (selenocisteína, selenometionina, selenocistina, selenoureia etc.) e apresenta grande importância bioquímica.⁵⁷ Uma alta proporção de selênio em plantas e

em tecidos animais está associada a proteínas, nas quais o átomo de selênio é incorporado à proteína substituindo o átomo de enxofre em um aminoácido, o que difere das metaloproteínas ou quelatos, nos quais ocorre simplesmente uma complexação com grupos funcionais das proteínas.⁵⁸

O selênio se encontra distribuído no planeta de maneira heterogênea. Os fatores geológicos, meteorológicos e químicos, principalmente o pH e a natureza da rocha originária dos solos, é que determinam a abundância relativa de selênio no solo em diferentes regiões. Em geral os solos contêm entre 1,0 e 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de selênio, com exceção de solos muito pobres em selênio (concentrações menores que 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ Se) e os solos com elevados níveis de selênio, chamados de seleníferos (concentrações superiores a 1,0 mg g^{-1} Se). Em solos ácidos, selênio é encontrado nos estados de oxidação 0 (selênio elementar), +2 (seleneto) e +4 (selenito), que são as formas menos solúveis e biodisponíveis. Já em solos com pH alcalino, o estado de oxidação do selênio predominante é +6 (selenato) que é mais solúvel e mais facilmente assimilável pelas plantas e animais.⁵⁹

Alimentos, suplementos e água são fontes de selênio para humanos. Mas a alimentação é a principal forma de obtenção desse elemento.⁵⁶ Os níveis de selênio em alimentos refletem o teor do elemento no solo, portanto um mesmo tipo de alimento proveniente de regiões diferentes pode ter distintas concentrações desse elemento. No Brasil, a castanha do Brasil é o alimento mais rico em selênio (0,20-253 mg kg^{-1} Se).⁶⁰

Selênio é um micronutriente cuja essencialidade e toxicidade estão em níveis muito próximos um do outro. A quantidade de selênio diária recomendada para homens e mulheres é de 55 μg e o nível máximo diário tolerável, sem riscos de intoxicação em adultos é de 400 μg .⁶¹

A essencialidade do elemento selênio em humanos não foi descoberta até 1979 e, até então, era considerado um elemento tóxico. A toxicidade crônica por selênio em humanos provoca uma doença denominada

selenose cujos sintomas são perda de cabelo, unhas frágeis, gosto metálico na boca, odor de alho exalado pelas vias respiratórias, distúrbios gastrointestinais, erupção cutânea, funcionamento anormal do sistema nervoso, alteração do sistema endócrino, infarto do miocárdio e falência renal.⁶²

A descoberta do selênio como um elemento com propriedades também essenciais ocorreu devido ao fato deste compor várias selenoproteínas, as quais possuem funções biológicas importantes. A enzima glutationala peroxidase, por exemplo, auxilia no mecanismo de defesa intracelular contra danos oxidativos, eliminando peróxidos de hidrogênios e hidroperóxidos transformando-os em água e alcoóis.^{63,64} Outra selenoproteína importante é a enzima iodotironina desidrase responsável pela síntese e controle metabólico dos hormônios T2, T3 e T4 produzidos pela glândula tireoide.^{65,66} A selenoproteína P é uma proteína do plasma sanguíneo e está associada à ação antioxidante extracelular.⁶⁷ A sintetase selenofosfato é necessária para a biosíntese de selenofosfato. Ainda, selênio está também associado à prevenção de câncer, potencialização do sistema imunológico, desintoxificação do organismo contra metais potencialmente tóxicos, estabilização do metabolismo do ácido araquidônico e favorece a síntese da metionina a partir da homocisteína, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares.

O primeiro caso de doença em humanos devido à deficiência de selênio ocorreu na China, em certas regiões onde o solo era pobre em selênio. A doença ficou conhecida como a doença de Keshan que é caracterizada por uma cardiomiopatia que afeta principalmente crianças e mulheres em idade fértil.⁶⁸ Ainda na China, outra doença relacionada à falta de selênio no organismo é chamada doença de Kashin-Beck que causa osteoartrite, degeneração da cartilagem articular, levando à deformação da estrutura óssea.⁶⁹

Assim como em humanos, a deficiência de selênio também causa complicações na saúde de animais. No gado, por exemplo, a deficiência provoca uma doença que conduz a distrofia muscular conhecida como doença do

músculo branco. Além de problemas no coração, falta de apetite, retardo no crescimento do animal, distúrbios na reprodução, tais como retenção de placenta, endometriose, ovário cístico e infertilidade.⁶²

A carne bovina é um dos itens mais importantes da dieta alimentar da população brasileira e apresenta um dos maiores potenciais de crescimento econômico.⁷⁰ A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio no nosso país, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano e oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos.⁷¹ Os solos brasileiros das regiões de criação de gado, em geral, têm deficiência de selênio e, portanto, os níveis desse elemento no pasto são insuficientes para cobrir a exigência nutricional do elemento para bovinos em qualquer fase de crescimento.⁷² Devido à importância econômica da pecuária no Brasil e aos já conhecidos danos causados pela deficiência do selênio em bovinos, medidas de suplementação de selênio, comumente na forma de sais (selenito e selenato), são tomadas para contornar a falta desse elemento no pasto.

Rodrigues⁷³, em estudos de análise de sêmen e plasma seminal de bois que recebiam suplemento nutricional de selênio, observou a associação entre a concentração de selênio no sêmen desses animais e a qualidade dos seus sêmens. Ou seja, quanto maior a concentração de selênio no sêmen, maior a motilidade dos espermatozoides e menores eram as deformações desses durante o processo de espermatogênese, o que reflete na melhor reprodutibilidade dos bois. Alguns trabalhos já haviam relacionado à presença de selênio à qualidade do sêmen em outros animais e também em humanos.⁷⁴⁻⁸¹

3.2.3. Determinação de selênio em sêmen

Sêmen é um fluido biológico produzido por machos de diferentes espécies de animais e responsável pelo transporte dos espermatozoides até o local de fertilização da fêmea. Contém em torno de 90% de água e é composto por duas frações: os espermatozoides, que compõem menos de 1% do volume

total do sêmen, e o plasma seminal. Possui um meio neutro e apresenta em sua composição diferentes compostos orgânicos (proteínas, frutose, sorbitol, ácido cítrico, ácido ascórbico etc.) e elementos inorgânicos (sódio, potássio, cálcio, selênio, zinco, magnésio, cloreto etc.).⁸²

Saeed e Thomassen⁸³ determinaram selênio em amostras de plasma seminal humano. Para isso, realizaram a precipitação de proteínas da amostra com ácido trifluoracético para separar o analito dos interferentes da matriz. A fração proteica foi digerida e o selênio determinado por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS).

Nève *et al.*⁸⁴ desenvolveram um método de determinação direta de selênio em plasma seminal humano diluído em Triton X-100 0,015% (m v⁻¹) e ácido nítrico 0,2% (m v⁻¹) por GFAAS. Procedimento de adição de analito foi empregado para a quantificação do elemento nas amostras.

Pleban *et al.*⁸⁵ determinaram Cd, Cu, Fe, Pb, Se e Zn nas frações de plasma seminal e espermatozoides humanos por GFAAS. Os teores médios de selênio encontrados nas amostras de plasma seminal variaram entre 21 a 191 µg L⁻¹.

Determinação de selênio em órgãos reprodutivos, soro sanguíneo e plasma seminal humano e bovino foi realizado por Saaranen *et al.*⁸⁶ empregando GFAAS. As amostras de plasma seminal foram apenas diluídas em Triton X-100 0,1% (v v⁻¹) e HNO₃ 0,2% (v v⁻¹). Os teores de selênio no plasma seminal humano foi de 19 e 47 µg L⁻¹ e no plasma seminal bovino foi de 349 e 565 µg L⁻¹. Com isso, os níveis de Se no plasma seminal bovino foi cerca de nove vezes superior ao encontrado no plasma seminal humano.

Lin *et al.*⁸⁷ também fizeram determinação direta de selênio em plasma seminal humano usando GFAAS. A diluição da amostra foi feita em meio Triton X-100 0,2% (v v⁻¹) e a compatibilização de matriz foi realizada para a determinação quantitativa de Se.

Poucos trabalhos na literatura tratam de métodos de determinação de selênio em amostras de sêmen de bovinos e pesquisas que forneçam informações sobre as formas que o selênio pode ser encontrado nesse tipo de amostra não foram encontradas durante esta revisão. Portanto, existe a necessidade de avaliar procedimentos para a análise de fracionamento e especiação de selênio em amostras de sêmen desses animais a fim de permitir melhor compreensão da relação desse elemento com a reprodução dos machos dessa espécie.

De acordo com a literatura comentada e segundo Eimann *et al.*⁸⁸ o teor médio de selênio no sêmen bovino é de 0,461 mg L⁻¹. Logo, a análise de fracionamento e especiação de Se em sêmen de bovinos significa a determinação de concentrações muito baixas, o que exige o emprego de técnicas analíticas sensíveis. Técnicas espectrométricas têm sido bastante empregadas na análise de fracionamento e especiação de elementos inorgânicos, especialmente a técnica de espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) devido à sua boa sensibilidade e fácil acoplamento com técnicas de separação.

3.2.4. Determinação de selênio empregando ICP-MS

A técnica de ICP-MS une a alta eficiência de atomização e formação de íons do plasma acoplado indutivamente (ICP) com a seletividade e a sensibilidade do espectrômetro de massa. O ICP é uma fonte de alta energia de ionização atingindo temperaturas de 5000 a 10000 K à pressão atmosférica. O plasma de argônio é gerado quando uma descarga elétrica é aplicada a um fluxo de argônio em uma tocha de quartzo. O gás argônio é parcialmente ionizado e os elétrons livres produzidos são acelerados por um campo magnético induzido. A energia dos elétrons e átomos de argônio excitados é usada para converter os outros átomos e moléculas ao estado excitado. O plasma é mantido pela energia fornecida por uma fonte de radio-frequência de 27 ou 40 MHz. A amostra, em

geral líquida, é bombeada até um nebulizador que produz um aerosol, líquido finamente disperso, antes de ser conduzida até o plasma. Os íons gerados no plasma são direcionados ao analisador de massas onde o analito é seletivamente, de acordo com sua razão massa/carga, orientado para o detector.^{89,90}

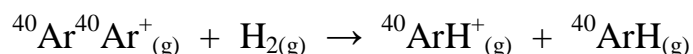
A técnica de ICP-MS tem se tornado importante na análise de especiação e fracionamento de diversos elementos químicos por ser uma técnica sensível, ter ampla faixa linear, permitir a análise de vários isótopos dos elementos e possibilitar acoplamento com técnicas de separação. Contudo, a determinação de selênio usando essa técnica pode sofrer algumas interferências espectrais.⁹¹

Uma vez que o gás utilizado para a geração do plasma na técnica de ICP-MS é o argônio, formação de íons poliatômicos com a mesma razão massa/carga dos isótopos do selênio é comum. A principal interferência é a formação do dímero $^{40}\text{Ar}_2$ que sobrepõe o sinal do isótopo mais abundante do selênio, ^{80}Se (49,8%). Portanto, a determinação de selênio por ICP-MS, é, em geral, realizado através do monitoramento de outros isótopos de selênio, que sofrem menos interferências poliatômicas, tais como ^{82}Se (9,2%), ^{78}Se (23,5%) e/ou ^{77}Se (7,6%).⁹¹

Um das estratégias para remoção de interferências poliatômicas no ICP-MS é através da utilização de interface de colisão/reação ou cela de colisão/reação, dependendo do fabricante do equipamento. Essa estratégia consiste em destruir íons moleculares interferentes por meio de reações ou colisões. Na configuração de colisão, os íons poliatômicos interferentes colidem com um gás inerte para dissociá-lo e modificar sua energia cinética. Quando em configuração de reação, empregam-se gases que reagem com as espécies interferentes produzindo espécies de razão massa/carga diferentes do analito.⁹⁰

Com o objetivo de contornar ou amenizar as interferências espectrais sofridas pelo selênio na determinação por ICP-MS, gases como hidrogênio^{92,93}, deutério⁹⁴, hélio⁹⁵, xenônio⁹⁶, óxido nitroso⁹⁵, metano⁹⁷⁻⁹⁹ e a

combinação de gases, como por exemplo, hidrogênio e hélio^{100,101}, têm sido empregados em celas de colisão/reação. Dos gases estudados, hidrogênio é o que tem proporcionado melhores resultados com melhor eficiência na remoção da interferência causada por $^{40}\text{Ar}_2$.⁹⁶ Isso se deve provavelmente porque o uso de hidrogênio pode promover a seguinte reação¹⁰²:



3.2.5. Acoplamento entre HPLC e ICP-MS

O acoplamento entre ICP-MS e técnicas cromatográficas tem sido comumente empregado para especificação de elementos químicos. Dentre as técnicas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência tem se destacado para ser utilizada na separação de espécies de selênio. Em geral, a técnica de HPLC (do inglês: High Performance Liquid Chromatography) é acoplada à técnica de ICP-MS para que se obtenha a separação prévia dos analitos de interesse, seguida pela detecção *on line* das bandas cromatográficas.

A técnica de cromatografia líquida (LC) tem como vantagens: a separação de espécies de selênio não voláteis, que inclui a maioria das espécies de selênio de interesse; a necessidade mínima de preparo de amostra; versatilidade, devido às inúmeras possibilidades de fases móveis e estacionárias que podem ser empregadas e a possibilidade de realizar as análises cromatográficas à temperatura ambiente, o que é apropriado para analitos termolábeis.¹⁰³ Porém, para o acoplamento da HPLC à ICP-MS deve haver um compromisso entre as condições cromatográficas e as características da técnica de ICP-MS para que se obtenha uma análise eficiente.

As fases móveis empregadas em HPLC podem conter altas concentrações de sais ou altas concentrações de solventes orgânicos, sendo assim incompatíveis com a técnica de ICP-MS. O sal contido na fase móvel pode causar instabilidade do plasma, além de erosão e entupimento do nebulizador e dos cones da interface. Esses fatores podem resultar em elevados

ruídos e diminuição da intensidade do sinal do elemento. A presença de solventes orgânicos na composição da fase móvel também afeta a estabilidade do plasma e pode gerar fuligens.

Para minimizar o efeito de solventes orgânicos nas análises por ICP-MS, a remoção desses reagentes pode ser realizada através da dessolvatação do aerossol da amostra antes desse atingir o plasma ou pela redução da temperatura da câmara de nebulização. Gás oxigênio pode também ser adicionado ao fluxo do gás de nebulização.⁵³ Alternativamente, a redução da introdução de solventes orgânicos no plasma pode ser feita com sistemas de baixo fluxo, ou seja, microcolunas de cromatografia líquida (colunas com diâmetro interno de 0,5 – 2 mm) associadas à micronebulizadores, que produzem um aerossol menos disperso e mais fino obtendo-se eficiente efeito de transporte.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Além dos cuidados já citados, o acoplamento HPLC-ICP-MS exige também um sistema de nebulização apropriado. Sistemas de nebulização dos tipos pneumático, concêntrico e de fluxo cruzado são os mais comumente empregados para conectar essas duas técnicas. Normalmente, a vazão da fase móvel utilizada nas colunas cromatográficas varia entre 0,2 a 1,5 mL min⁻¹, que é compatível com a maior parte dos sistemas de nebulização convencionais que utilizam nebulizador concêntrico ou de fluxo cruzado. O tubo que conecta a coluna ao sistema de nebulização do ICP-MS deve ter o menor comprimento possível para minimizar possíveis alargamentos de picos.⁹¹

No acoplamento de HPLC com ICP-MS o modo de eluição isocrática é preferível ao modo de eluição por gradiente, pois as condições do ICP-MS otimizadas para uma composição de fase móvel pode não ser a mesma para outro tipo de composição. Somado a isso, eluição por gradiente pode causar instabilidade no plasma.⁵³

Os métodos de cromatografia líquida comumente usados para separação de espécies de selênio e que têm sido associados ao ICP-MS são

aqueles empregando troca iônica (IC), fase reversa (RP), pareamento iônico (IPC) e exclusão por tamanho (SEC).

3.2.6. Separação das espécies de selênio por cromatografia de fase reversa com pareamento iônico

Devido ao caráter ionizável das espécies de selênio, a cromatografia de troca iônica e de fase reversa com pareamento iônico são as mais utilizadas para a separação das espécies não-voláteis de selênio.¹⁰⁷ Contudo, cromatografia de fase reversa com pareamento iônico tem-se mostrado superior no que se refere à separação cromatográfica obtida, à facilidade de interfaceamento com espectrômetro de massa e aplicação em diferentes tipos de amostras.¹⁰⁸

A cromatografia de fase reversa consiste no uso de uma fase estacionária com característica apolar e uma fase móvel líquida polar. A separação cromatográfica ocorre por um processo físico-químico, onde a amostra é particionada de acordo com a afinidade entre a fase móvel polar e a fase estacionária apolar. As diferenças entre as estruturas químicas dos componentes da amostra, assim como, suas propriedades físico-químicas conduzem a diferentes tempos de retenção na coluna, o que proporciona a separação dos compostos.¹⁰⁹

O emprego de pareamento iônico é uma variação do modo da fase reversa para separar compostos iônicos ou ionizáveis. Nesse método, um pareamento iônico é formado entre o soluto iônico e um íon apropriado de carga oposta, um contraíon, presente na fase móvel. O pareamento iônico forma um composto com características hidrofóbicas, o qual será particionado entre a fase móvel polar e a fase estacionária apolar assim como na fase reversa convencional. Dessa maneira, a técnica de pareamento iônico usa o mesmo tipo de coluna e fase móvel empregada na fase reversa, sendo a única diferença o emprego de um contraíon na fase móvel para formar um par iônico hidrofóbico que pode ser adequadamente retido na fase estacionária.¹¹⁰

O mecanismo pelo qual o pareamento iônico ocorre ainda não é totalmente compreendido e existem modelos propondo como a retenção ocorre neste sistema. Alguns modelos consideram que o pareamento iônico com o analito ocorre no processo cromatográfico, ou seja, o par iônico se forma entre o analito ionizado e hidrofílico com o contraíon, formando uma molécula hidrofóbica que pode ser retida na fase estacionária apolar. Outros modelos afirmam que o contraíon é adsorvido na fase estacionária e seguidamente o analito ionizado é retido, por mecanismo de troca iônica, na fase estacionária.¹¹¹

A técnica de fase reversa com pareamento iônico é uma importante alternativa a cromatografia de troca iônica, visto que tem como vantagens o uso de colunas convencionais de fase reversa, reprodutibilidade entre as repetidas injeções e permite obter separações eficientes para uma mistura de compostos iônicos. Além disso, tem como característica única a possibilidade de separar misturas de compostos iônicos e neutros em uma mesma corrida.

Bird *et al.*¹¹² empregaram cromatografia com pareamento iônico para separar as espécies selenato, DL-selenometionina, DL-selenoetionina, DL-selenocistina, Se-metil-DL-selenocisteína, Se-*n*-propil-DL-selenocisteína, Se-alil-DL-selenocisteína, DL-selenoetionina usando como fase móvel água-metanol (98:2) com 0,1% v v⁻¹ de ácido trifluoracético (TFA) e uma coluna C₈ Zorbax SB-C8 como fase estacionária. A separação foi aplicada na análise de especiação em amostras de leveduras. A mesma fase móvel foi empregada na análise de especiação de amostras de alho.¹¹³

Kotrebai *et al.*¹⁰⁷ adequaram a mesma fase móvel anterior à coluna C₈ Symmetry Shield RP8 para separar as mesmas espécies de selênio. A fase móvel que proporcionou melhor separação foi água-metanol (99:1) com 0,6% v v⁻¹ TFA (pH 2,0).

O composto acetato de tetrabutilamônio (TBAA) foi usado como par iônico na fase móvel constituída por 30 mmol L⁻¹ formiato de amônio + 10 mmol L⁻¹ TBAA + 5% v v⁻¹ metanol (pH 5,0). A composição obtida se mostrou

eficiente na separação de selenito, selenato, selenometionina, selenocistina e selenoetionina em uma coluna C₁₈. O método de separação foi aplicado em amostras de suplementos alimentares comerciais por Marchante-Gayón *et al.* que avaliaram essa mesma composição de fase móvel para separação de espécies orgânicas e inorgânicas de selênio.¹¹⁴

Zheng *et al.* conseguiram separar o ácido selênico, ácido selenoso, iodeto de trimetilselênio, selenocistina, selenometionina, selenoetionina e selenocistamina com a mistura 10 mmol L⁻¹ ácido 1-butanossulfônico + 4 mmol L⁻¹ hidróxido de tetrametilamônio + 4 mmol L⁻¹ ácido malônico + 0,05% v v⁻¹ metanol (pH 4,5), em que 1-butanossulfônico atua como par iônico aniônico e hidróxido de tetrametilamônio como par iônico catiônico. A separação foi realizada em coluna C₁₈.¹¹⁵ Essa mesma mistura de pares iônicos e ácido malônico como tampão, mudando apenas as concentrações dos compostos foi usada também por Zheng¹¹⁶⁻¹¹⁹ em outros trabalhos na separação de espécies de selênio em coluna C₁₈. Nesses trabalhos a composição da fase móvel foi 2,5 mmol L⁻¹ 1-butanossulfonato de sódio + 8 mmol L⁻¹ hidróxido de tetrametilamônio + 4 mmol L⁻¹ ácido malônico + 0,05% v v⁻¹ metanol (pH 4,5). Composição de fase móvel similar usando hidróxido de tetrametilamônio como par iônico foi avaliada por Pan *et al.*¹²⁰ (13 mmol L⁻¹ hidróxido de tetrametilamônio + 1,3% v v⁻¹ metanol (pH 5,7-5,8) para separação de seis diferentes espécies de selênio.

Separação de espécies de selênio e arsênio numa mesma corrida cromatográfica foi otimizada aplicando-se planejamento experimental com fosfato de tetrabutilamônio (TBA) como par iônico. A condição ótima encontrada da fase móvel para essa separação foi 4,0 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 3,0–4,0 mmol L⁻¹ TBA com pH entre 5,5 e 6,5.¹²¹

Gammelgaard *et al.* usaram ácido heptafluorobutanoico (HFBA) como par iônico para separação de espécies de selênio em coluna C₈ em

amostras de urina. A fase móvel era composta de 10 mmol L⁻¹ HFBA + 20% v v⁻¹ metanol.¹²²

3.2.7. Preparo de amostra para fracionamento e especificação de selênio

Métodos de extração sólido-líquido são comumente empregados no tratamento de amostras para análise de fracionamento e especificação. Diferentes extratores têm sido usados para extrair espécies orgânicas e inorgânicas de selênio de amostras biológicas.

Espécies de selênio solúveis e fracamente ligadas à matriz são lixiviadas com extratores aquosos e misturas de solventes aquosos e orgânicos. O uso de água¹²³⁻¹³², água-metanol^{128,133}, tampão^{128,134,135} têm sido reportados na literatura para extração desse tipo de espécies de selênio em amostras biológicas. Comumente, baixas recuperações são alcançadas com esses extratores, visto que em amostras biológicas a maior parte das espécies de selênio está fortemente ligada a proteínas.

Para extração de espécies de selênio que estão fortemente ligadas a proteínas, a hidrólise proteica é aplicada no preparo das amostras. Esse tipo de procedimento é necessário, pois o selênio se acumula ou é absorvido por organismos vivos também na forma de selenoaminoácidos. A hidrólise de proteínas pode ser feita com solução de ácido clorídrico, porém, apesar de ser comumente utilizada em procedimentos bioquímicos, esse reagente rompe de forma incompleta as ligações peptídicas de alguns aminoácidos hidrofóbicos, o que conduz a perda de alguns aminoácidos lábeis (cistina, tirosina etc.) e pode converter metionina em sulfóxido de metionina. Portanto, solução de ácido clorídrico não se apresenta como o extrator mais adequado no preparo de amostras para especificação.^{107,136-138} Enzimas proteolíticas que catalisam processos específicos e bem conhecidos são as mais frequentemente usadas em procedimentos de extração de selenoaminoácidos.¹³⁸

Gilon *et al.* foram os primeiros a usarem enzimas no processo de hidrólise de proteínas para extração de espécies de selênio. No caso, pronase foi a enzima escolhida para extração das espécies de selênio de amostras biológicas.¹⁴⁰ Protease¹³³, proteinase K¹²⁶, tripsina^{124,130,141} e misturas proteolíticas^{125,128,130,135,142} têm sido empregados para extrair as espécies de selênio que compõem proteínas. Em extrações enzimáticas o controle de temperatura e de pH são de fundamental importância para o sucesso da extração. O pH e a temperatura da solução extratora devem ser mantidos na faixa específica de atividade da enzima empregada. Geralmente, temperatura fisiológica (37 °C) é a mais adequada para evitar desnaturação dessas proteínas. Apesar de ser largamente empregada para extração de selênio, extração com enzimas não é suficiente para total extração de espécies de selênio em amostras orgânicas. Isso ocorre, provavelmente, por existir espécies de selênio que não estão associadas a aminoácidos e/ou por procedimentos que antecedem a extração, como secagem e descongelamento, produzirem uma estrutura proteica que não é degradada por enzimas proteolíticas. Além disso, a parede celular pode bloquear a passagem das enzimas proteolíticas para o interior das células. Enzimas não proteolíticas, tal como a driselase^{125,128,135}, também têm sido empregadas para a recuperação de compostos de selênio presos na parede celular.^{128,143}

Outro importante reagente para extração de selenoproteínas é o dodecil sulfato sódico (SDS)^{128,131,133}. Esse reagente é capaz de desnaturar proteínas e, através da formação de pares iônicos, torna-as solúveis em água.¹²³ Ácido metanosulfônico também tem sido aplicado para o mesmo propósito.¹³⁸

Capítulo 4

“Determinação de elementos inorgânicos em tecido animal após decomposição parcial assistida por radiação micro-ondas usando minifrascos.”

4. Determinação de elementos inorgânicos em tecido animal após decomposição parcial assistida por radiação micro-ondas usando minifrascos.

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Amostras, reagentes e padrões

Diferentes amostras de tecido bovino foram obtidas no comércio local. Com o objetivo de checar a exatidão do método proposto, dois materiais de referência certificados (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) foram usados: *bovine muscle powder* (NIST 8414) e *bovine liver* (NIST 1577b).

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm) de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os recipientes de vidro e polipropileno foram descontaminados em banho 10% v v⁻¹ HNO₃ (Merck, Darmstadt, Alemanha) por no mínimo 24 h e enxaguados com água ultrapura antes de serem usados nos experimentos.

Nas digestões totais e parciais, ácido nítrico concentrado 65% m m⁻¹ (Merck) e peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Merck) foram empregados. Soluções de referência multielementares foram preparadas através de diluições sucessivas das soluções estoque 1000 mg L⁻¹ de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn (Tritisol[®], Merck, Alemanha). As soluções de referência de carbono foram preparadas a partir de solução estoque 1000 mg L⁻¹ de ureia (Synth, São Paulo, Brasil).

4.1.2. Instrumentação

A digestão parcial foi realizada usando minifrascos de PTFE confeccionados no laboratório²⁵, um recipiente comercial usado para esterilizar mamadeiras e um forno de micro-ondas doméstico (Prosdócimo-Electrolux, São

Carlos, Brasil). Os minifrascos de PTFE tem um volume interno de 4 mL, 39,5 mm de altura e 12,7 mm de diâmetro interno. A Figura 4.1 mostra os minifrascos de PTFE e o esterilizador de mamadeiras usados nos experimentos de digestão parcial. Os minifrascos foram presos por suportes de PTFE nos orifícios internos do esterilizador. O recipiente esterilizador de mamadeiras foi utilizado por ser um material comercialmente disponível, de baixo custo e no qual os minifrascos foram facilmente adaptados.



Figura 4.1 – (a) minifrascos de PTFE e (b) esterilizador de mamadeiras. Minifrascos foram presos por um suporte de PTFE existente nos orifícios internos do esterilizador.

Para digestão total, um forno de micro-ondas (Multiwave[®], Anton Paar, Graz, Áustria), equipado com seis frascos de perfluoroalcoxi (PFA) e sensor de temperatura, foi utilizado.

Um espectrômetro de emissão óptica com visão radial (VISTA PRO-CCD, Varian, Australia) foi empregado para determinar C, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Nebulizador V-groove e câmara de nebulização Sturman-Masters foram usados para introdução das amostras. Os parâmetros instrumentais foram:

gerador de frequência de 40 MHz; 1,2 kW de potência; vazão do gás do plasma de 15 L min⁻¹; vazão do gás auxiliar de 1,5 L min⁻¹; vazão do gás nebulizador 0,9 L min⁻¹; e vazão de amostra de 0,8 L min⁻¹. Uma tocha com tubo central de diâmetro interno de 2,4 mm foi empregada. Os comprimentos de onda dos elementos utilizados nas análises são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Comprimentos de onda empregados na análise de C, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES.

| Elemento | Comprimento de onda (nm) |
|-----------------|---------------------------------|
| C(I) | 193,025 |
| Ca(I) | 422,673 |
| Cu(I) | 327,395 |
| Fe(II) | 238,204 |
| Mg(II) | 279,553 |
| Mn(II) | 259,372 |
| Zn(II) | 202,548 |

4.1.3. Preparo de amostra

Todas as amostras de carne bovina foram liofilizadas (E-C Micromodulo, NewYork, EUA) por 48 h após congelamento dessas amostras com nitrogênio líquido. As amostras liofilizadas foram moídas em moinho criogênico (Marconi MA 775, Piracicaba, Brasil) aplicando-se o seguinte programa: 2 min de pré-congelamento, 2 min de etapa de moagem e 1 min para congelamento.

No método proposto, as amostras de tecido bovino foram diretamente pesadas nos minifrascos de PTFE e a mistura HNO₃ concentrado e

100 µL H₂O₂ foi adicionada. Os frascos destampados foram posicionados dentro do recipiente esterilizador, contendo 500 mL de água e colocados dentro do forno de micro-ondas. A potência da radiação micro-ondas, o volume de ácido nítrico, o tempo de exposição à radiação micro-ondas e a massa da amostra foram avaliados através de um planejamento fatorial 2⁴⁻¹. Após digestão, as amostras e os brancos analíticos foram diluídos no próprio minifrasco de digestão para um volume final de 3,0 mL. A determinação dos analitos e da porcentagem de carbono residual (% RCC) foram feitas por ICP OES.

O método de digestão total das amostras em forno de micro-ondas com cavidade foi empregado para comparar com o método de digestão proposto. Para tanto, 100 mg de amostra foram digeridas usando 2 mL de 7 mol L⁻¹ HNO₃ e 1 mL de 30% m m⁻¹ H₂O₂. Após digestão, as soluções resultantes foram diluídas para 10 mL com água. O programa de aquecimento empregado no forno de micro-ondas está apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Programa de aquecimento usado na digestão total de tecidos de carne em forno de micro-ondas com cavidade.

| Etapa | Potência (W) | Tempo (min) |
|-------|--------------|-------------|
| 1 | 300 | 2,0 |
| 2 | 0 | 3,0 |
| 3 | 650 | 4,0 |
| 4 | 850 | 5,0 |
| 5 | 1000 | 5,0 |
| 6 | Vent. | 15,0 |

4.1.4. Planejamento Fatorial

Planejamento fatorial com quatro variáveis independentes foi realizado com o objetivo de maximizar a eficiência do método de decomposição parcial proposto. Um planejamento 2⁴⁻¹ foi considerado para a escolha dos parâmetros

experimentais baseado na % RCC como resposta para cada experimento. A Tabela 4.3 apresenta os experimentos realizados usando o material de referência *bovine muscle powder* (NIST 8414). Quatro variáveis foram levadas em consideração: (1) potência da radiação, (2) tempo de exposição à radiação micro-ondas, (3) volume do ácido nítrico e (4) massa da amostra.

Todos os experimentos foram realizados em dois níveis (normalizados em -1 e +1). Os valores de potência da radiação, tempo, volume do ácido e massa da amostra avaliados foram, respectivamente: 325 (nível mínimo, -1) e 625 W (nível máximo, +1); 3 (nível mínimo, -1) e 7 min (nível máximo, +1); 50 (nível mínimo, -1) e 350 μ L (nível máximo, +1); 50 (nível mínimo, -1) e 100 mg (nível máximo, +1). Os experimentos foram realizados em triplicata de maneira aleatória.

Tabela 4.3 - Planejamento fatorial 2^{4-1} aplicado para escolher a melhor condição experimental do método de decomposição proposto.

| Experimento | Potência ^a | Tempo ^b | Volume de ácido ^c | Massa da amostra ^d | RCC (%) |
|-------------|-----------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | * |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 1 | * |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 1 | * |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1,1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 1 | * |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1,4 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1,2 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2,2 |

^a Potência = 650 W (+1) e 325 W (-1) ^c Volume de ácido = 350 µL (+1) e 50 µL (-1)

^b Tempo = 7 min (+1) e 3 min (-1) ^d Massa da amostra = 100 mg (+1) e 50 mg (-1)

* Amostra não digerida.

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Avaliação dos parâmetros experimentais da digestão parcial

De acordo com os resultados apresentados pelo planejamento fatorial, no qual a % RCC foi considerada como resposta para definir a melhor condição de digestão e todos os valores diferente de zero foram incluídos nos cálculos estatísticos, todas as variáveis avaliadas se mostraram importantes fatores na extração do analito durante a digestão parcial. Valores inferiores de % RCC foram obtidos quando se aplicou maior potência, maior tempo de exposição à radiação micro-ondas, menor volume de ácido e menor massa de amostra. Na Tabela 4.3 pode-se observar que as condições experimentais dos testes 1, 2, 3, e 5 não foram adequadas para a digestão das amostras. Nos testes 6, 7 e 8, apesar de resultarem em baixos valores de % RCC, ocorreu a presença de maior teor de resíduo sólido quando comparado com o teste 4. Dessa maneira, as condições utilizadas no teste 4 foram estabelecidas como as mais adequadas para a continuidade do experimento: potência aplicada de 650 W, tempo de exposição à radiação micro-ondas de 7 min, 50 µL de ácido e 50 mg de amostra. Sob essas condições, baixo valor de % RCC foi obtido (1,1%). Além de ter apresentado visualmente menos resíduo sólido do que o experimento 7, no experimento 4 utilizou-se menor volume de ácido. Digeridos que apresentam menor acidez residual são mais recomendados para sistemas de introdução de amostra pneumática, como nebulizador V-groove e câmara de nebulização Sturman-Masters.

4.2.2. Aplicação do método de digestão proposto em amostras de tecido bovino

Após a escolha das condições adequadas para o método de digestão proposto, diferentes tipos tecidos de bovinos foram submetidos ao procedimento de digestão parcial. Com o objetivo de comparar os resultados com um método

já bem estabelecido, as mesmas amostras foram digeridas em frascos fechados usando micro-ondas com cavidade. Após a etapa de digestão, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn foram determinados por ICP OES. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

De acordo com teste *t de Student*, não há diferença significativa entre as concentrações de todos os elementos avaliados na digestão total com os da digestão parcial em um nível de confiança de 95%. É importante enfatizar que para a maioria das amostras, resíduos sólidos e coloração amarela foram observados no digerido final devido à digestão apenas parcial. Contudo, a utilização de nebulizador do tipo V-groove, que permite concentração maior de sólidos dissolvidos, possibilitou a introdução das amostras no ICP OES sem que ocorressem entupimentos.

Tabela 4.4 – Teores de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de carnes comerciais obtidos após digestão total e pelo método proposto neste trabalho (parcial; n = 3).

| Amostra | Digestão | Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|--------------------|-----------------|---|---|---|---|---|---|
| Contra-filé | Total | 174 ± 12 | 3,1 ± 0,1 | 92,3 ± 2,6 | 1010 ± 28 | 2,8 ± 0,1 | 121 ± 5 |
| | Parcial | 176 ± 13 | 3,6 ± 0,3 | 94,4 ± 2,9 | 1025 ± 38 | 2,9 ± 0,2 | 132 ± 16 |
| Fraldinha | Total | 139 ± 7 | 2,0 ± 0,5 | 72,5 ± 1,2 | 792 ± 17 | 2,2 ± 0,2 | 146 ± 5 |
| | Parcial | 141 ± 5 | 1,4 ± 0,1 | 69,7 ± 1,8 | 797 ± 10 | 2,6 ± 0,1 | 153 ± 3 |
| Músculo | Total | 201 ± 11 | 2,1 ± 0,1 | 70,7 ± 3,6 | 929 ± 13 | 2,0 ± 0,1 | 169 ± 3 |
| | Parcial | 211 ± 3 | 2,2 ± 0,2 | 67,8 ± 5,0 | 959 ± 25 | 2,0 ± 0,2 | 180 ± 8 |

Além disso, embora as digestões tenham sido apenas parciais, a extração foi adequada para disponibilizar os analitos que em geral são fortemente ligados com a matéria orgânica em solução, tal como ferro. Supõe-se, dessa maneira, que as amostras sofrem uma pré-digestão quando ácido nítrico concentrado é adicionado. A condensação do vapor de forma gradual dentro dos minifrascos durante o procedimento conduz a um eficiente processo de extração. Em função de sua capacidade dielétrica, água é melhor absorvedora de radiação micro-ondas do que qualquer ácido mineral e conseqüentemente ácidos diluídos absorvem mais radiação micro-ondas do que ácidos concentrados. O mesmo experimento de digestão parcial foi realizado sem a presença da água no recipiente do esterilizador. Nesse caso, as amostras não foram digeridas. Esses resultados mostram a importância da fase vapor para reforçar a eficiência da digestão.

O procedimento proposto tem várias vantagens. Os sinais do branco e os limites de detecção foram similares para a maioria dos analitos quando o método proposto foi comparado com o procedimento com forno de micro-ondas com cavidade. As exceções foram Ca, com melhor LOD pelo procedimento de digestão convencional, e Fe, com melhor LOD pelo procedimento proposto. Sinais do branco para o elemento Fe foram quase 30% menores quando os minifrascos foram usados, provavelmente devido a pequenos volumes de ácido empregado e, conseqüentemente, menores riscos de contaminações devido a reagentes. O procedimento proposto é comparável ao convencional em se tratando de sensibilidade, precisão e exatidão.

4.2.3. Exatidão e precisão do método proposto

As amostras de material de referência certificadas (músculo e fígado bovino) foram digeridas em frascos fechados empregando forno de micro-ondas com cavidade e também pelo procedimento de digestão parcial

proposto. A Tabela 4.5 lista os valores de concentração encontrados para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em ambos os métodos de digestão.

De acordo com a Tabela 4.5, boa concordância entre ambos os métodos e os valores certificados podem ser observados. As recuperações de todos os elementos foram em torno de 100% para ambas as amostras e para os dois métodos de decomposição. Manganês não foi encontrado na amostra referência de músculo bovino (NIST 8414) devido à baixa concentração na amostra original ($0,37 \pm 0,09 \mu\text{g g}^{-1}$).

Por outro lado, teores similares aos valores certificados foram obtidos para Mn na amostra certificada de fígado bovino para ambos os métodos de decomposição, com coeficientes de variação menores que 10%. Nesse caso, a concentração de Mn na amostra original é maior ($10,5 \pm 1,7 \mu\text{g g}^{-1}$). Esse resultado mostra que a extração de Mn da amostra foi eficiente quando a decomposição parcial foi empregada.

Os resultados obtidos revelaram que o método de digestão parcial proposto pode ser aplicado com sucesso para diferentes tipos de tecido bovinos, proporcionando a mesma eficiência da digestão completa em frascos fechados usando micro-ondas com cavidade para os elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn.

Tabela 4.5 – Teores de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, and Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) em materiais de referência certificados (CRM) após digestão pelo método proposto (parcial) e total (n = 3 para os procedimentos em micro-ondas e 95% de confiança para o CRM).

| Amostra | Decomposição | Ca | Cu | Fe | Mg | Mn | Zn |
|------------------------------|----------------------|------------------------|-----------|------------|----------|------------|----------|
| | | $(\mu\text{g g}^{-1})$ | | | | | |
| Bovine Liver (NIST 1577b) | Parcial | 111 ± 12 | 149 ± 6 | 173 ± 11 | 583 ± 18 | 9,6 ± 0,3 | 124 ± 4 |
| | Total | 117 ± 9 | 154 ± 2 | 182 ± 2 | 613 ± 6 | 9,9 ± 0,3 | 122 ± 1 |
| | Valores certificados | 116 ± 4 | 160 ± 8 | 184 ± 15 | 601 ± 28 | 10,5 ± 1,7 | 127 ± 16 |
| Bovine Muscle (NIST 8414) | Parcial | 152 ± 15 | 2,7 ± 0,3 | 68,4 ± 1,4 | 967 ± 19 | < LOD* | 143 ± 4 |
| | Total | 149 ± 12 | 3,2 ± 0,1 | 67,6 ± 2,1 | 941 ± 19 | < LOD* | 141 ± 1 |
| | Valores certificados | 145 ± 20 | 2,8 ± 0,4 | 71,2 ± 9,2 | 960 ± 95 | 0,4 ± 0,1 | 142 ± 14 |

*LOD: 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$

4.3. Conclusões

O procedimento de decomposição parcial em minifrascos usando o conceito de frasco único proposto nesse trabalho para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de carne bovina apresentou resultados similares quando comparado com o método de digestão total em frascos fechados usando forno de micro-ondas com cavidade. A presença de água no recipiente do esterilizador de mamadeiras que continha os minifrascos foi fundamental para a eficiência da digestão, pois a condensação do vapor de água dentro dos minifrascos contribuiu para uma maior absorção das micro-ondas. O método de decomposição proposto é simples, seguro, de baixo custo e alternativo para a digestão de pequenas quantidades de amostras de carne. O procedimento requer apenas um forno de micro-ondas caseiro, um recipiente comercial de esterilizar mamadeiras e minifrascos de PTFE. Além dessas qualidades, pequenas quantidades de resíduos são geradas, em função dos pequenos volumes de reagentes utilizados. Baixos valores de branco também são obtidos, visto que a pesagem da amostra, a digestão, a diluição e a determinação são realizadas no mesmo frasco.

Capítulo 5

**“Avaliação do uso de radiação infravermelha
combinada à radiação micro-ondas para
quantificação de elementos inorgânicos usando
ICP OES em amostras orgânicas”**

5. Avaliação do uso de radiação infravermelha combinada à radiação micro-ondas para quantificação de elementos inorgânicos usando ICP OES em amostras orgânicas

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Amostras, Reagentes e Padrões

O método de decomposição desenvolvido foi aplicado em amostras de pó de café e em amostras de ração humana comerciais. Ração humana é usada como um complemento alimentar para uma dieta saudável. Essa amostra consiste de uma mistura de linhaça, farelo de trigo, germe de trigo, castanha de caju, soja, gergelim, açúcar mascavo e aveia.

A exatidão do método foi avaliada através da análise do material de referência certificado *apple leaves* NIST 1515 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA).

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm) obtida por um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os frascos de vidro e polipropileno foram descontaminados em banho 10% v v⁻¹ ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) por no mínimo 24 h e enxaguados com água ultrapura antes de serem utilizados.

Para a digestão das amostras, ácido nítrico concentrado 65% m m⁻¹ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Vetec) foram empregados. Soluções de referência multielementares foram preparadas a partir de sucessivas diluições de soluções estoque de concentração 1000 mg L⁻¹ de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn (Acros Organics, Bélgica). As soluções de referência de carbono foram preparadas a partir de solução estoque 1000 mg L⁻¹ de ureia (CH₄N₂O; Vetec).

5.1.2. Instrumentação

Para digestão total das amostras, utilizou-se um forno de micro-ondas com cavidade (Multiwave[®], Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com seis frascos fechados de quartzo e sensor de temperatura. Uma lâmpada de infravermelho de potência 250 W, diâmetro de 127 mm e comprimento de 180 mm (E-27 - 5.000h, EMPALUX, Curitiba-PR, Brasil) foi empregada quando se aplicou o procedimento de digestão ácida combinando aquecimento das radiações infravermelha e micro-ondas (IR-MW), Figura 5.1.

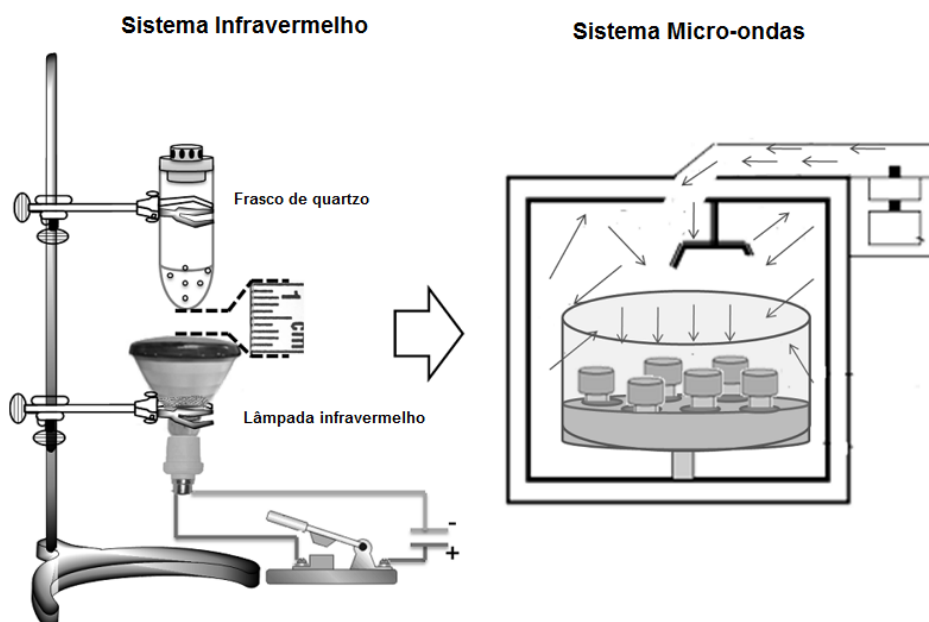


Figura 5.1 – Sistema de digestão combinando aquecimento com radiação infravermelha e micro-ondas (IR-MW).

O sistema IR-MW foi idealizado usando um simples arranjo com uma lâmpada de infravermelho disponível comercialmente, comumente usada para secar ou manter alimentos aquecidos em restaurantes. O frasco que contém a amostra durante o aquecimento com a lâmpada de infravermelho é o mesmo frasco de quartzo do sistema de forno de micro-ondas com cavidade. Durante a

pré-digestão a lâmpada é presa a um suporte e o frasco de quartzo contendo a amostra e o ácido é posicionado aproximadamente 1 cm acima da lâmpada de infravermelho.

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (dual-view Optima 4300 DV, Perkin Elmer) foi usado para a determinação de Al, C, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. A introdução da amostra foi feita com um nebulizador de fluxo cruzado com uma câmara de nebulização de duplo passo. Os parâmetros operacionais foram os seguintes: gerador de frequência de 40 MHz; 1,1 kW de potência de radiofrequência; vazão do gás do plasma de 15 L min⁻¹; vazão do gás auxiliar de 0,5 L min⁻¹; vazão do gás de nebulização de 0,8 L min⁻¹; vazão da amostras de 1,4 mL min⁻¹. Uma tocha com diâmetro central de 2,4 mm foi utilizada e as medidas foram realizadas com a tocha na configuração axial. Os comprimentos de onda usados na determinação dos analitos são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Comprimentos de onda empregados na determinação de Al, C, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES.

| Elemento | Comprimento de onda (nm) |
|-----------------|---------------------------------|
| Al(I) | 396,153 |
| C(I) | 193,030 |
| Ca(I) | 317,933 |
| Cu(I) | 327,393 |
| Fe(II) | 238,204 |
| Mg(I) | 285,213 |
| Mn(II) | 259,372 |
| Zn(I) | 213,857 |

5.1.3. Preparo de amostra em forno de micro-ondas com cavidade

Na decomposição em forno de micro-ondas, uma massa de 200 mg de amostra foi digerida usando 3 mL de 65% m m⁻¹ HNO₃ e 2 mL de 30% m m⁻¹ H₂O₂. Após a digestão, as soluções foram diluídas para 25 mL com água ultrapura. O programa de aquecimento aplicado às amostras é mostrado na Tabela 5.2. Os analitos foram determinados por ICP OES.

Tabela 5.2 - Programa de aquecimento usado na digestão de amostras em forno de micro-ondas com cavidade.

| Etapa | Potência (W) | Tempo (min) |
|-------|--------------|-------------|
| 1 | 100-600 | 5,0 |
| 2 | 600 | 5,0 |
| 3 | 1000 | 10,0 |
| 4 | 0 | 15,0 |

5.1.4. Preparo de amostra empregando IR-MW

No procedimento de digestão proposto, aproximadamente 1,0 g das amostras de pó de café ou ração humana foi transferida para frasco de quartzo do sistema de forno de micro-ondas. Após a adição de 65% m m⁻¹ HNO₃, o frasco foi tampado e submetido à radiação infravermelha. Após a pré-digestão, a solução resultante foi completamente digerida em forno de micro-ondas com cavidade usando o programa de aquecimento da Tabela 5.2. O digerido foi diluído para 25 mL com água ultrapura. A determinação dos analitos foi efetuada por ICP OES. O tempo de exposição da amostra à radiação infravermelha e o volume de ácido nítrico foram avaliados através de um planejamento experimental.

A redução da massa da amostra após aplicação da radiação infravermelha foi investigada. Nesse procedimento, ácido nítrico concentrado foi adicionado a aproximadamente 1,0 g de amostra e a radiação proveniente da

lâmpada de infravermelho foi aplicada a essa mistura, a solução resultante foi filtrada, lavada com água ultrapura para remoção do ácido e o material sólido retido no papel de filtro foi seco em estufa (60 °C) por 24 h. O material foi pesado e os cálculos de redução da massa foram realizados.

5.1.5. Planejamento Fatorial

Um planejamento fatorial com dois níveis mais ponto central foi usado para investigar o efeito dos parâmetros (variáveis) no procedimento de pré-digestão com a radiação infravermelha. Na Tabela 5.3 estão demonstrados os experimentos realizados usando amostra de pó de café. As variáveis escolhidas para esse estudo foram: tempo de aquecimento e volume de ácido. A resposta foi medida como porcentagem de carbono residual (% RCC) nas amostras digeridas por IR-MW.

Todos os experimentos foram realizados em dois níveis (normalizados em -1 e +1). Os valores de volume do ácido e tempo de exposição à radiação infravermelha avaliados foram, respectivamente: 4 (nível mínimo, -1) e 8 mL (nível máximo, +1); 10 (nível mínimo, -1) e 30 min (nível máximo, +1).

Tabela 5.3 - Planejamento fatorial 2^2 + ponto central aplicado para escolher a melhor condição experimental do método proposto.

| Experimento | Volume de ácido^a | Tempo^b | RCC (%) |
|--------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------|
| 1 | +1 | -1 | 2,2 |
| 2 | - 1 | +1 | 1,7 |
| 3 | 0 | 0 | 1,7 |
| 4 | +1 | +1 | 2,2 |
| 5 | -1 | -1 | 3,1 |

^a Volume de ácido = 8 mL (+1) e 4 mL (-1)

^b Tempo = 30 min (+1) e 10 min (-1)

Massa da amostra = 1g

5.2. Resultados e Discussão

5.2.1. Avaliação dos parâmetros experimentais do método de digestão proposto

As condições do procedimento de pré-digestão com lâmpada de infravermelho foram estabelecidas aplicando um planejamento fatorial de dois níveis. Os seguintes fatores foram estudados em dois níveis (máximo e mínimo): volume do HNO_3 e tempo de aquecimento empregando a lâmpada de infravermelho. Os valores de % RCC foram medidos por ICP OES para estimar as respostas e definir o tempo de exposição e o volume de ácido adequados para a pré-digestão. De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial, todos os experimentos apresentaram valores de % RCC menores que 3,1. Portanto, o menor volume de ácido HNO_3 (4,0 mL) e o menor tempo de pré-digestão (10 min) foram escolhidos.

Com o objetivo de saber se as condições experimentais escolhidas para a pré-digestão com radiação infravermelha eram suficientes para a obtenção de uma mistura que pudesse ser decomposta em forno com radiação micro-ondas com cavidade de maneira segura, a redução da massa da amostra no processo de pré-digestão foi avaliada. Com esse estudo foi possível saber quanto de massa de amostra restava, após a pré-digestão com radiação infravermelha, que seria conduzida para a etapa posterior, digestão em micro-ondas com cavidade. A redução de massa alcançada quando se aplicou pré-digestão a uma massa de amostra de 1,0 g com 4 mL de HNO_3 e 10 min de pré-digestão foi de mais de 80%, ou seja, após o procedimento com radiação infravermelha a massa de amostra resultante era menor que 200 mg. Visto que, em geral, empregam-se quantidades de amostra de aproximadamente 250 mg de amostra para serem digeridas em forno de micro-ondas com cavidade, a massa da amostra resultante após a pré-digestão com radiação infravermelha apresentou-se adequada para ser

conduzida à digestão completa em forno com radiação micro-ondas com cavidade.

5.2.2. Aplicação do método proposto em amostras de café e ração humana

Após a avaliação dos melhores parâmetros da pré-digestão, o procedimento usando IR-MW foi aplicado para amostras de pó de café e ração humana. Os resultados foram comparados com procedimento convencional de digestão em forno com radiação micro-ondas com cavidade. Os elementos Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn foram determinados por ICP OES (Tabelas 5.4 e 5.5).

De acordo com test *t de Student*, com exceção de Al e Cu nas amostras de ração humana, não há diferença significativa entre as concentrações dos elementos avaliados na digestão total convencional com os valores encontrados no método que utiliza pré-digestão assistida por radiação infravermelha em um nível de confiança de 95%. O Al e Cu nas amostras de ração humana (Tabela 5.4) apresentaram concentrações baixas na solução final do digerido obtido pelo método de decomposição convencional, não atingindo, portanto, o limite de quantificação (LOQ) da técnica de ICP OES. Em contrapartida, visto que o método proposto usa massa de amostra maior, a solução final da digestão continha teores de Al e Cu suficientes para alcançar o LOQ da ICP OES, o que possibilitou a determinação desses dois elementos na amostra de ração humana, com boa exatidão e precisão.

Na tabela 5.4, observa-se que a análise da amostra de ração humana usando o procedimento proposto produziu menores desvios padrão relativos em relação ao sistema de digestão em forno de micro-ondas com cavidade convencional. Isso pode ter ocorrido porque, com a utilização do sistema IR-MW, quantidades maiores de amostra são digeridas, o que influencia diretamente na exatidão e precisão, especialmente de amostras mais heterogêneas.

Os resultados obtidos com as amostras de café e ração humana demonstraram a possibilidade da utilização da lâmpada de infravermelho para a pré-digestão de amostras orgânicas. Dessa maneira, a combinação do aquecimento usando lâmpada de infravermelho com o aquecimento em sistema de micro-ondas com cavidade torna possível a digestão de quantidades maiores de amostra.

Tabela 5.4 – Determinação de Ca, Mg, Al, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES em amostras de ração humana após digestão convencional em forno de micro-ondas com cavidade e digestão usando o sistema proposto (IR-MW), n = 3 para ambos os métodos.

| Ração Humana | | | | |
|---------------------------|--------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|
| Elemento | IR-MW | rsd^a (%) | MW | rsd^a (%) |
| Ca (g kg ⁻¹) | 1,11 ± 0,10 | 8,71 | 1,23 ± 0,11 | 8,92 |
| Mg (g kg ⁻¹) | 1,82 ± 0,05 | 2,68 | 2,21 ± 0,11 | 5,11 |
| Al (mg kg ⁻¹) | 21,5 ± 1,2 | 5,73 | 7,34 ± 2,32 | 31,65 |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 8,4 ± 0,8 | 9,87 | 2,93 ± 0,23 | 7,73 |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 79,7 ± 4,3 | 5,39 | 72,1 ± 7,8 | 10,85 |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 69,1 ± 1,7 | 2,53 | 71,4 ± 3,9 | 5,44 |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 192 ± 5 | 2,71 | 187,9 ± 9,7 | 5,14 |

Tabela 5.5 – Determinação de Ca, Mg, Al, Cu, Fe, Mn e Zn por ICP OES em amostras de café após digestão convencional em forno de micro-ondas com cavidade e digestão usando o sistema proposto (IR-MW), n = 3 para ambos os métodos.

| Elemento | Café | | | |
|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| | IR-MW | rsd ^a (%) | MW | rsd ^a (%) |
| Ca (g kg ⁻¹) | 0,99 ± 0,001 | 0,13 | 1,12 ± 0,01 | 0,92 |
| Mg (g kg ⁻¹) | 1,92 ± 0,01 | 0,59 | 2,03 ± 0,01 | 0,45 |
| Al (mg kg ⁻¹) | 64,2 ± 4,6 | 7,10 | 70,1 ± 6,1 | 8,70 |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 14,06 ± 0,03 | 1,41 | 13,5 ± 0,2 | 1,39 |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 64,5 ± 7,3 | 11,33 | 66,2 ± 2,8 | 4,27 |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 29,0 ± 0,1 | 0,34 | 32,5 ± 0,3 | 1,05 |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 5,00 ± 0,24 | 4,80 | 5,95 ± 0,01 | 0,17 |

5.2.3. Exatidão do método proposto

O sistema proposto (IR-MW) foi avaliado usando material de referência certificado (apple leaves, NIST 1515). Os resultados podem ser observados na Tabela 5.6.

De acordo com os dados da Tabela 5.6, exceto pelos elementos Fe e Mg, não há diferença significativa entre os valores encontrados usando o sistema IR-MW e os valores certificados em um nível de confiança de 95%. Contudo, a recuperação do Mg ainda foi superior a 90% e a do Fe superior a 80%. A amostra certificado (apple leaves) possui silicatos que são solubilizados apenas com a utilização de ácido fluorídrico, possivelmente devido à ausência desse ácido na digestão, o elemento Fe não foi completamente extraído para a solução.

Os resultados obtidos revelaram que o método de digestão proposto pode ser promissor para a decomposição de massas maiores de amostras orgânicas para a determinação dos elementos Al, Ca, Cu, Mn e Zn.

Tabela 5.6 – Determinação de material de referência certificado (apple leaves - NIST 1515) por ICP OES após digestão usando o sistema IR-MW (n = 2).

| Elemento | Sistema IR-MW | Valores Certificados | Recuperação (%) |
|---------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| Ca (g kg ⁻¹) | 1,28 ± 0,10 | 1,526 ± 0,015 | 84 |
| Mg (g kg ⁻¹) | 0,25 ± 0,01 | 0,271 ± 0,008 | 92 |
| Al (mg kg ⁻¹) | 280 ± 8 | 286 ± 9 | 98 |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 5,25 ± 0,38 | 5,64 ± 0,24 | 93 |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 69 ± 2 | 83 ± 5 | 83 |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 52 ± 2 | 54 ± 3 | 97 |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 12,1 ± 0,2 | 12,5 ± 0,3 | 97 |

5.3. Conclusões

O sistema de digestão proposto (IR-MW) produziu resultados exatos para Al, Ca, Cu, Mn e Zn em amostras orgânicas. O sistema IR-MW é simples de ser implementado e de baixo custo, já que utiliza lâmpada de infravermelho disponível comercialmente e a pré-digestão é realizada em frascos de quartzo do sistema de micro-ondas com cavidade. Além disso, a digestão de quantidades maiores de amostra com pequeno volume de ácido é possível. Dessa maneira, a pré-redução da massa de amostra potencializa o emprego de sistemas de micro-ondas com cavidade, melhorando a eficiência de análises de amostras heterogêneas e possibilitando a detecção de analitos em baixas concentrações. A configuração proposta também é adequada para análise de traços, expandindo a possibilidade de aplicações dessas técnicas e os limites de quantificação dessas determinações. O IR-MW também pode ser promissor na digestão de amostras que contenham grande quantidade de matéria orgânica. A pré-digestão desse tipo de amostra conduziria em decomposições mais seguras em forno de micro-ondas com cavidade. Contudo, elementos voláteis ainda necessitam ser investigados pelo método proposto.

Capítulo 6

“Fracionamento e especiação de selênio em sêmen de bovinos”

6. Fracionamento e especiação de selênio em sêmen de bovinos

6.1. Materiais e Métodos

6.1.1. Amostras, Reagentes e Padrões

Amostras de sêmen de 12 touros Nelore foram coletadas empregando a técnica de eletroejaculação utilizando o aparelho ELETROVET, modelo Torjet 95 A. Os touros recebiam suplementação de selênio na forma inorgânica em sua alimentação, misturado a outros minerais (mistura mineral). As amostras de sêmen coletadas foram misturadas de maneira a compor uma única amostra de sêmen (“*pool*”), como forma de aumentar o volume visando maior representatividade amostral.

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm) obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os recipientes de vidro e polipropileno foram descontaminados em banho ácido 10% v v⁻¹ HNO₃ (Merck, Darmstadt, Alemanha) por no mínimo 24 h e lavados com água ultrapura antes de serem usados nos experimentos.

Nas digestões totais, ácido nítrico concentrado 65% m m⁻¹ (Merck) e peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Merck) foram empregados. Soluções de referência de selênio foram preparadas através de diluições sucessivas das soluções estoque 1000 mg L⁻¹ Se (Tritisol[®], Merck, Alemanha).

Para o fracionamento de selênio nas amostras de sêmen, foi realizado procedimento de extração de gordura, proteína e compostos de baixo peso molecular. Nas etapas de extração foram utilizados os reagentes: clorofórmio, metanol, hidróxido de sódio e acetona da Synth, Brasil e ácido fosfórico e ácido perclórico da Merck.

Para os experimentos de separação cromatográfica, os reagentes selenato de sódio (Se(VI)), selenito de sódio (Se(IV)), seleno-L-metionina

(SeMet) e Se-metil-selenocisteína (SeCys) foram obtidos da Sigma Aldrich. Hidróxido de tetrametilamônio, hidróxido de tetrabutilamônio, ácido trifluoracético, ácido malônico, 1-heptanosulfato, tampão fosfato e metanol eram da Merck.

Soluções padrão de 1 mg mL^{-1} Se das espécies Se(IV), Se(VI), SeMet e SeCys foram empregadas para a otimização da separação cromatográfica. A concentração dos padrões de selênio foi escolhida de acordo com a sensibilidade da técnica utilizada para esta otimização (ICP OES).

As fases móveis testadas no trabalho foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas de ácido malônico, hidróxido de tetrametilamônio, 1-heptanosulfato, dihidrogênio fosfato de tetrabutilamônio, ácido trifluoracético e tampão fosfato em água ultrapura. O ajuste de pH da fase móvel foi efetuado pela adição de ácido nítrico ou hidróxido de amônio concentrados. Todas as fases móveis foram filtradas usando membranas de filtro de nitrocelulose com porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Bedford, USA) e desgaseificadas em ultrassom por 10 min.

6.1.2. Instrumentação

Para a digestão total das amostras, utilizou-se um forno de micro-ondas com cavidade (Multiwave[®], Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com seis frascos fechados de PFA e sensor de temperatura.

As determinações de selênio total foram feitas em espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), Varian 820-MS. Os parâmetros usados nas análises por ICP-MS estão apresentados na Tabela 6.1. As medidas foram efetuadas sem e com o emprego de CRI. Quando a CRI foi utilizada, empregou-se os gases hidrogênio ou hélio na vazão de 60 mL min^{-1} .

Tabela 6.1 – Condições de operação do ICP-MS empregadas nas determinações de selênio total.

| Características | Parâmetros |
|---|--|
| Gerador de frequência (MHz) | 27 |
| Potência de radio-frequência (kW) | 1,4 |
| Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹) | 18 |
| Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹) | 1,8 |
| Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹) | 0,93 |
| Vazão do “ <i>sheath gas</i> ” (L min ⁻¹) | 0,19 |
| Pontos por pico | 2 |
| Varredura/replicata | 5 |
| Replicatas/amostra | 5 |
| Tempo de leitura (ms) | 100 |
| Cone “ <i>skimmer</i> ” | Ni |
| Cone “ <i>sampler</i> ” | Ni |
| Nebulizador | Seaspray |
| Câmara de nebulização | Scott |
| Temperatura da câmara de nebulização | 2 °C |
| Processamento do sinal | “ <i>Peak Hopping</i> ” |
| Isótopos monitorados | ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se |

A fim de verificar a exatidão das determinações de selênio por ICP-MS, determinou-se também o elemento usando um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), Varian AA-800. Esse equipamento possui amostrador automático (Varian GTA 96) e corretor de fundo baseado no efeito Zeeman transversal. Nas análises, utilizou-se tubo de grafite recoberto piroliticamente com aquecimento longitudinal (Varian, Austrália). A fonte de radiação usada foi uma lâmpada de cátodo oco de selênio, utilizou-se

comprimento de onda de 196,0 nm e corrente da lâmpada de 10 mA. Paládio 1000 mg L⁻¹ foi usado como modificador químico.

A separação das espécies de selênio foi realizada em coluna cromatográfica C₁₈ (Hypersil ODS, 5 µm, empacotada com sílica, 250 x 4,6 mm D. I., Thermo), bomba de alta pressão (Varian Pro-star, mod. 210) e injetor de seis entradas Rheodyne com alça de amostragem de 20 µL. A coluna foi acoplada ao nebulizador V-groove de um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) com vista radial, modelo VISTA PRO-CCD da Varian. Deve ser ressaltado que o equipamento ICP OES foi empregado no modo Time Scan que exibe, em forma de gráfico, a intensidade do sinal analítico de um determinado comprimento de onda em função do tempo.

6.1.3. Preparo da amostra para determinação total de selênio

As amostras de sêmen foram mantidas sob refrigeração imediatamente após a coleta e em seguida transferidas ao laboratório, misturadas e congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (E-C Micromódulo, NewYork, EUA) por 48 h. As amostras liofilizadas foram moídas em moinho criogênico (Marconi MA 775, Piracicaba, Brasil) aplicando-se o seguinte programa: 2 min de pré-resfriamento, 2 min de etapa de moagem e 1 min para resfriamento.

Para avaliar o teor de selênio total na amostra de sêmen, decomposição em forno de micro-ondas com cavidade foi efetuada adicionando-se 2 mL de 7 mol L⁻¹ HNO₃, e 1 mL de 30% m m⁻¹ H₂O₂ a 50 mg de amostra. A mistura foi submetida à decomposição assistida por micro-ondas usando o programa de aquecimento apresentado na tabela 6.2. Após a digestão, a solução resultante foi diluída para 20 mL com água. Para avaliar a exatidão da análise, experimento de adição e recuperação de 10 µg L⁻¹ foi feito. A determinação de selênio foi realizada por ICP-MS. Devido à ausência de material de referência

certificado de amostra de sêmen, além do experimento de adição e recuperação, os resultados foram comparados com a determinação por GFAAS.

Tabela 6.2 – Programa de aquecimento usado na digestão total de sêmen em forno de micro-ondas com cavidade.

| Etapa | Potência (W) | Tempo (min) |
|-------|--------------|-------------|
| 1 | 300 | 2,0 |
| 2 | 0 | 3,0 |
| 3 | 650 | 4,0 |
| 4 | 850 | 5,0 |
| 5 | 1000 | 5,0 |
| 6 | Vent. | 15,0 |

6.1.4. Fracionamento de selênio: extração de lipídeos, proteínas e compostos de baixo peso molecular

A extração de lipídios na amostra de sêmen (Figura 6.1) foi promovida pela adição de 5 mL da mistura clorofórmio-metanol (2:1 v v⁻¹) a 1,0 g da amostra de sêmen moída. A mistura de solvente orgânico juntamente com a amostra foi agitada em agitador tipo Vórtex por 5 min e filtrada. O processo de extração foi realizado por três vezes na mesma amostra e as três frações de clorofórmio-metanol foram combinadas. Esse procedimento foi realizado em replicata (n = 2). Após secagem do solvente à temperatura ambiente, a fração de gordura foi pesada para obter informação sobre o teor lipídico do sêmen. O resíduo da extração (sêmen sem gordura), retido no filtro, foi seco em estufa a 40 °C e homogeneizado usando almofariz e pistilo. Uma massa de 50 mg desse resíduo foi pesada e digerida em forno de micro-ondas com cavidade utilizando o mesmo procedimento empregado na decomposição

do sêmen. Após digestão, a solução foi diluída para 20 mL e analisada por ICP-MS.

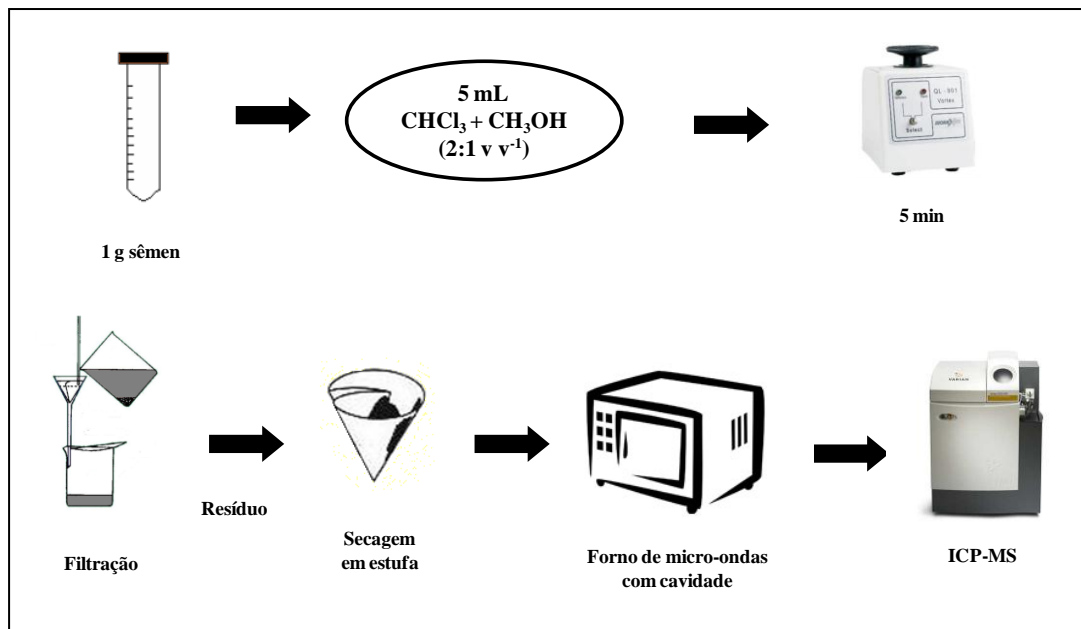


Figura 6.1 – Esquema da extração de lipídeos da amostra de sêmen.

A diferença entre o teor total de selênio no sêmen e a concentração desse elemento na amostra após a extração da gordura revelou o nível de selênio na fração lipídica. O teor de lipídeo na gordura foi feito por subtração devido à massa de gordura obtida na extração ser insuficiente para a realização de decomposição com replicatas.

Na extração protéica (Figura 6.2), 5 mL de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH foi adicionada a 500 mg de amostra de sêmen sem gordura.¹⁴⁴ A solução foi agitada por 10 min em agitador tipo Vórtex, centrifugada (3500 rpm) e o sobrenadante (extrato) foi separado em um novo frasco. Esse processo foi efetuado por duas vezes na mesma amostra e os sobrenadantes foram combinados. O resíduo da extração foi reservado para ser digerido e analisado por ICP-MS. O pH do extrato foi ajustado para 7,0 usando solução $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ H_3PO_4 , 40 mL de acetona foi adicionado e a solução foi refrigerada a $-14 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. O precipitado formado foi separado por centrifugação (3500 rpm) e seco

em estufa à temperatura de 40 °C. Todo o procedimento foi realizado em duplicata. A massa de proteína obtida na extração foi pesada com o objetivo de avaliar o teor proteico do sêmen. Massa de 50 mg da fração proteica e do resíduo da extração protéica foi digerida usando o mesmo procedimento de digestão empregado na decomposição do sêmen e a concentração de selênio foi determinada por ICP-MS.

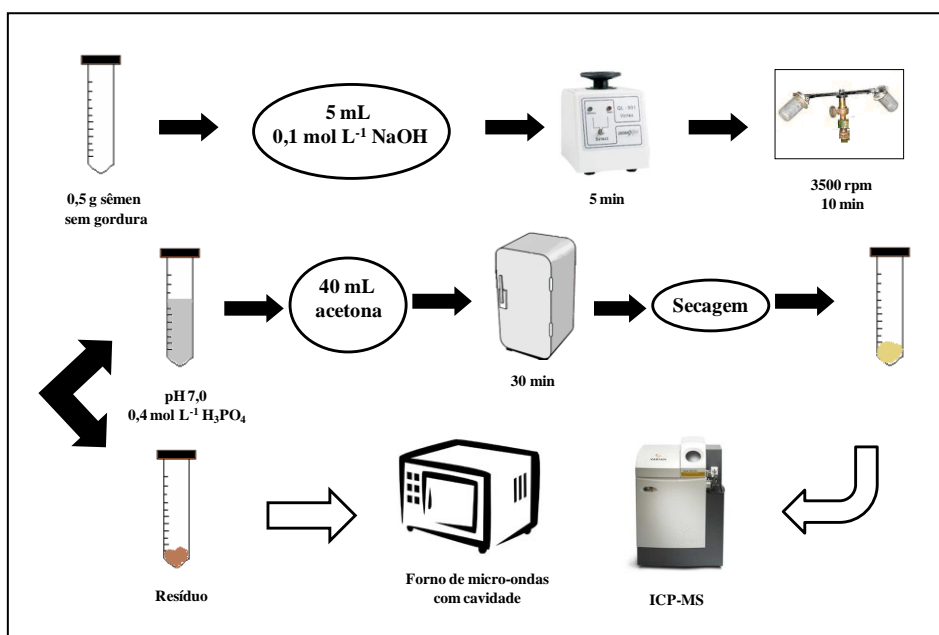


Figura 6.2 – Esquema da extração de proteínas da amostra de sêmen.

A extração de compostos de baixo peso molecular (Figura 6.3) foi efetuada pela adição de 4 mL de solução 0,4 mol L⁻¹ HClO₄ a 0,2 g de amostra de sêmen sem gordura.¹⁴⁴ A mistura foi colocada em ultrassom por 2 h, trocando-se a água do banho a cada 30 min para manter a temperatura uniforme. Uma única posição do banho foi usada na extração das duas replicatas. O extrato foi separado do resíduo por centrifugação (3500 rpm) e a determinação de selênio no sobrenadante foi realizada por ICP-MS.

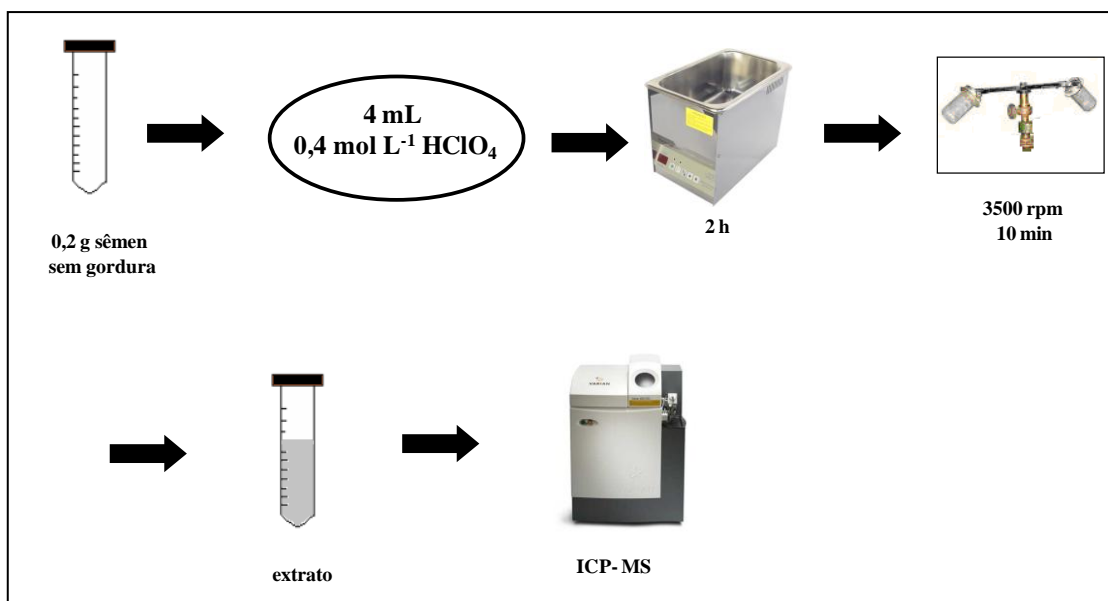


Figura 6.3 – Esquema da extração de compostos de baixo peso molecular da amostra de sêmen.

6.1.5. Otimização da separação cromatográfica das espécies de selênio

Cromatografia de fase reversa com pareamento iônico foi usada para a separação das espécies Se(IV), Se(VI), SeMet e SeCys. Diferentes fases móveis foram avaliadas com o objetivo de obter a separação adequada das espécies de selênio. A otimização da separação foi realizada com emprego de ICP OES usando a configuração “Time Scan” do equipamento. Usou-se a vazão da coluna cromatográfica a 1 mL min^{-1} e alça de amostragem de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A coluna foi condicionada por aproximadamente 1 hora com a fase móvel antes da injeção dos padrões de selênio. A injeção das soluções padrão foi realizada manualmente, usando seringa de HPLC.

6.2. Resultados e Discussão

6.2.1. Determinação do teor total de selênio

Antes de iniciar as análises de fracionamento e o estudo de separação das espécies de selênio na amostra, fez-se a determinação do teor total desse elemento. Para isso, a amostra liofilizada e moída foi digerida em forno de micro-ondas com cavidade, usando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. A determinação foi realizada por ICP-MS. Experimento de adição e recuperação foi realizado a fim de escolher a melhor condição do equipamento. Além disso, a análise da amostra por GFAAS também foi efetuada com o intuito de avaliar a exatidão dos resultados.

Os isótopos ^{76}Se , ^{77}Se e ^{78}Se foram avaliados na análise por ICP-MS sem utilizar CRI e com CRI empregando hidrogênio como gás reacional na vazão de 60 mL min^{-1} . O isótopo ^{80}Se foi avaliado somente com CRI por ter interferência severa de $^{40}\text{Ar}_2$. Sobre o isótopo ^{82}Se , que sofre interferência espectral de $^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2$, empregou-se CRI com 60 mL min^{-1} He. Os resultados da determinação desses isótopos na amostra e a recuperação de selênio na amostra dopada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Se nas condições citadas estão apresentadas na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Determinação de selênio total em amostra de sêmen.

| Sem CRI | | | |
|--|--|--------------------------|-----------------------------------|
| Isótopo | Concentração mg kg⁻¹ | RSD (%) | Recuperação* (%) |
| 76 | - | - | - |
| 77 | 7,5 | 11,2 | 95 |
| 78 | 2,6 | 26,1 | 61 |
| 82 | 12,8 | 3,8 | 42 |
| CRI H₂(60 mL min⁻¹) | | | |
| Isótopo | Concentração mg kg⁻¹ | RSD (%) | Recuperação* (%) |
| 76 | 32,1 | 31,4 | 478 |
| 77 | 13,9 | 0,3 | 311 |
| 78 | 15,7 | 4,3 | 267 |
| 80 | - | - | - |
| CRI He(60 mL min⁻¹) | | | |
| Isótopo | Concentração mg kg⁻¹ | RSD (%) | Recuperação* (%) |
| 82 | 15,8 | 2,5 | 289 |

*Recuperação do selênio na amostra de sêmen dopada com 10 µg L⁻¹.

Avaliando-se os dados da Tabela 6.3 observa-se que a única condição experimental que propiciou boa recuperação de selênio na amostra de sêmen fortificada foi ⁷⁷Se sem CRI com 95% de recuperação. Todos os outros isótopos estudados sem CRI apresentaram recuperações abaixo de 62%. Ressalta-se ainda que a determinação com o isótopo ⁷⁶Se não foi possível traçar uma curva analítica adequada para a determinação da concentração do elemento na amostra. Por outro lado, com o emprego da CRI, as recuperações encontradas foram de 267 a 478%, ou seja, valores muito superiores a 100%, o que

impossibilitou traçar uma curva analítica adequada. Uma justificativa para esses resultados é que o uso de CRI pode ter produzido espécies com mesma razão massa/carga do analito, ocasionando interferência positiva na determinação de selênio. Com os resultados obtidos, a condição escolhida para a determinação de selênio na amostra de sêmen foi utilizando o isótopo ^{77}Se sem o emprego de CRI.

Hafez⁸² apresentou uma tabela com os constituintes orgânicos e inorgânicos do plasma seminal de diferentes animais. Na Tabela 6.4 é apresentada a concentração desses constituintes no plasma seminal bovino, onde se pode observar que o plasma seminal de bois apresenta elevada concentração de cloreto ($1,7 \text{ g L}^{-1}$), o qual interfere sobre o isótopo ^{77}Se devido a formação da espécie $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$. Contudo, apesar do alto teor de cloreto no sêmen, com a diluição da amostra após o processo de digestão, obtém-se uma concentração final de cloreto de aproximadamente 42 mg L^{-1} . Esse cálculo da concentração de cloreto na solução final foi realizado considerando que a amostra de sêmen estudada neste trabalho tenha $1,7 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^{-1}$ e 90% de água. Segundo Pereira *et al.*¹⁰² somente amostras com teor de cloreto superior a $6,0 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^{-1}$ interferem de forma significativa na determinação de Se usando o isótopo ^{77}Se . Portanto, com a consideração acima, inferiu-se que os teores de cloreto na amostra de sêmen bovino não foram suficientes para provocar interferência na determinação de selênio utilizando o isótopo ^{77}Se .

Tabela 6.4 – Valores médios dos componentes do plasma seminal.⁸²

| Componentes orgânicos | Concentração |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Proteínas | 30 – 80 (mg L ⁻¹) |
| Frutose | 1,2 - 6,0 (g L ⁻¹) |
| Sorbitol | 0,1 - 1,4 (g L ⁻¹) |
| Ácido cítrico | 3,6 - 10,0 (g L ⁻¹) |
| Ácido ascórbico | 87 (mg L ⁻¹) |
| Inositol | 0,2 - 0,5 (g L ⁻¹) |
| Ácido glutâmico | 0,5 - 0,41 (g L ⁻¹) |
| Glicerilfosforilcolina | 1,1 - 50,0 (g L ⁻¹) |
| Componentes inorgânicos | Concentração |
| Sódio | 2,7 (g L ⁻¹) |
| Potássio | 1,7 (g L ⁻¹) |
| Cloreto | 1,7 (g L ⁻¹) |
| Magnésio | 82 (mg L ⁻¹) |
| Cálcio | 37 (mg L ⁻¹) |

Apesar da boa recuperação obtida na amostra de sêmen bovino que recebeu adição de selênio, a análise da amostra de sêmen foi também feita por GFAAS para confirmação dos resultados obtidos para ⁷⁷Se por ICP-MS . Para isso, as curvas de temperatura de pirólise e atomização (Figura 6.4) para Se foram obtidas com 30 µL de 30 µg L⁻¹ Se e 5 µL de 1000 mg L⁻¹ Pd como modificador químico.

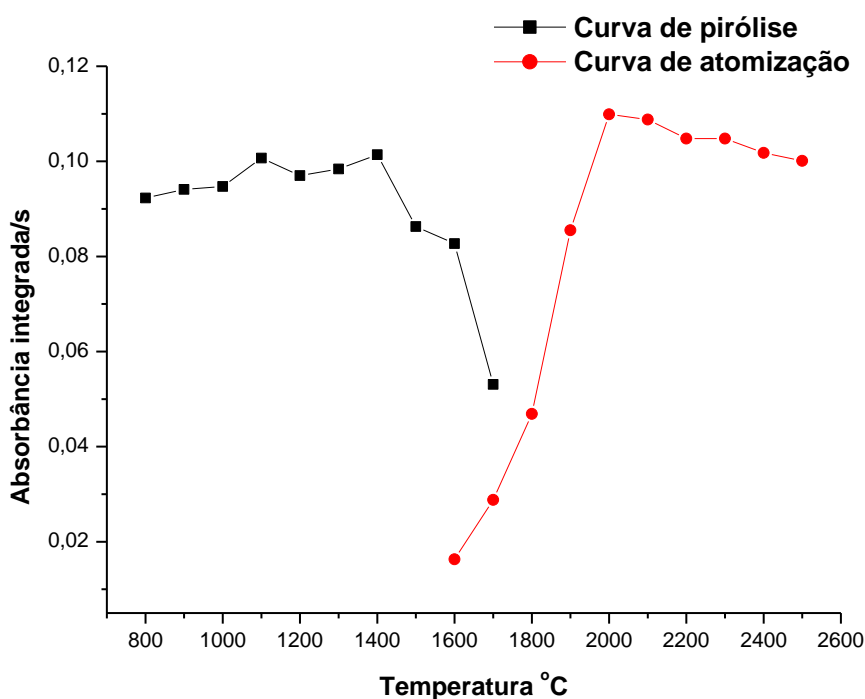


Figura 6.4 – Curva de temperatura de pirólise e atomização para $30 \mu\text{g L}^{-1}$ Se em meio $0,1\% \text{ v v}^{-1} \text{ HNO}_3$ com modificador químico $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Pd}$.

Para estabelecer a temperatura adequada de pirólise, fixou-se a temperatura de atomização em $2600 \text{ }^\circ\text{C}$ e variou-se a temperatura de pirólise entre 800 e $1700 \text{ }^\circ\text{C}$. A curva de pirólise na Figura 6.4 mostra que a partir de $1400 \text{ }^\circ\text{C}$ a intensidade do sinal do selênio começa a diminuir, portanto essa temperatura foi escolhida como a temperatura de pirólise. Fixando-se $1400 \text{ }^\circ\text{C}$ como temperatura de pirólise, variou-se a temperatura de atomização entre 1600 e $2500 \text{ }^\circ\text{C}$ (curva de atomização, Figura 6.4) e a maior absorbância de Se foi em $2000 \text{ }^\circ\text{C}$ e a partir de então se manteve razoavelmente constante. Dessa maneira, a temperatura de atomização escolhida foi de $2000 \text{ }^\circ\text{C}$. O programa de aquecimento empregado na determinação de selênio por GFAAS está apresentado na Tabela 6.5. O método foi avaliado analisando-se material de referência certificado (*bovine liver*, NIST 1577b), sendo obtida recuperação de 98%.

Tabela 6.5 – Programa de aquecimento empregado na determinação de selênio em amostra de sêmen por GFAAS.

| Etapa | T (°C) | Tempo (s) | Vazão (L min ⁻¹) | Leitura |
|------------|--------|-----------|------------------------------|---------|
| Secagem | 85 | 5,0 | 3,0 | Não |
| Secagem | 95 | 20 | 3,0 | Não |
| Secagem | 120 | 10 | 3,0 | Não |
| Pirólise | 1400 | 5,0 | 3,0 | Não |
| Pirólise | 1400 | 1,0 | 3,0 | Não |
| Pirólise | 1400 | 2,0 | 0 | Não |
| Atomização | 2000 | 0,8 | 0 | Sim |
| Atomização | 2000 | 2,0 | 0 | Sim |
| Limpeza | 2500 | 2,0 | 3,0 | Não |

Após o estabelecimento das melhores condições de trabalho do GFAAS para selênio, fez-se a determinação desse elemento na amostra de sêmen e na amostra de sêmen que recebeu adição de quantidade conhecida de Se. A concentração de selênio encontrada foi de 7,0 mg kg⁻¹, com desvio padrão relativo de 5,6%. A recuperação do selênio na amostra fortificada foi de 95%. De acordo com teste *t de Student*, os teores de Se encontrados na amostra de sêmen em ambas as técnicas não diferiram significativamente em um nível de confiança de 95%.

6.2.2. Fracionamento de selênio em amostra de sêmen

Além da determinação do teor total de selênio no sêmen, o teor desse elemento nas frações lipídica, proteica e de compostos de baixo peso molecular também foi avaliado. Todas as concentrações foram calculadas com base na matéria seca, inclusive os teores de lipídeos e proteínas.

Os lipídeos são biomoléculas com características hidrofóbicas, sendo esses solúveis em clorofórmio, éter, metanol e outros solventes

orgânicos.¹⁴⁵ Nesse trabalho a fração lipídica do sêmen foi extraída usando a mistura clorofórmio-metanol (2:1 v v⁻¹). O teor de gordura obtida nessa extração foi de $5,0 \pm 0,5\%$ (m m⁻¹). A concentração de selênio nessa fração foi calculada através da diferença entre o teor de Se encontrado no sêmen total ($7,5 \pm 0,8$ mg kg⁻¹) e o determinado no sêmen após a extração da gordura. Para isso, após extração da gordura, a amostra de sêmen foi digerida em forno de micro-ondas com cavidade e a determinação de selênio feita por ICP-MS com ⁷⁷Se. A concentração encontrada na amostra de sêmen sem gordura foi de $4,1 \pm 0,1$ mg kg⁻¹ Se, portanto o teor calculado na fração lipídica foi de $3,4 \pm 0,8$ mg kg⁻¹ Se. Após a remoção da fase lipídica da amostra, foram realizadas as extrações de proteínas e de compostos de baixo peso molecular.

Na extração da fração proteica utilizou-se solução (0,1 mol L⁻¹ NaOH), uma vez que proteínas são solúveis em meio alcalino. Após neutralização da solução com H₃PO₄, a precipitação das proteínas solubilizadas foi promovida pela adição de acetona ao meio sob baixas temperaturas, visto que solventes orgânicos solúveis em água diminuem a solubilidade das proteínas devido ao baixo valor de suas constantes dielétricas e por sofrerem hidratação.¹⁴⁷ O teor de proteína encontrado na amostra estudada foi de $76,0 \pm 0,3\%$ (m m⁻¹). A fração proteica e o resíduo dessa fração foram digeridas e as concentrações de selênio determinadas por ICP-MS empregando o isótopo ⁷⁷Se.

Os teores de selênio encontrados na fase proteica e no resíduo da extração de proteínas foram, respectivamente, $2,4 \pm 0,1$ mg kg⁻¹ e $1,8 \pm 0,2$ mg kg⁻¹. A determinação da concentração de Se no resíduo da extração mostra que não houve perdas do analito durante o processo, uma vez que a somatória das quantidades de selênio nessas duas fases é muito próxima ao teor de Se no sêmen sem gordura ($4,1$ mg kg⁻¹). Os resultados revelam que o nível de selênio na fração lipídica foi superior ao encontrado na fração proteica, o que não era esperado, visto que em amostras biológicas a maior parte do selênio se encontra na fração proteica. É possível que durante a extração de gordura, lipoproteínas

contendo selênio em sua constituição também tenham sido lixiviadas, e isso justificaria o elevado teor de Se na fração lipídica.

A fração de compostos de baixo peso molecular, assim como na fase proteica, foram extraídas na amostra de sêmen sem gordura, ou seja, após a extração da fração lipídica. A extração foi promovida com solução $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ HClO_4 que solubiliza seletivamente os compostos de menor peso molecular.¹⁴⁸ A determinação de selênio foi feita no extrato, mas visto que esse estava em meio de HClO_4 , uma nova avaliação das condições do ICP-MS foi realizada para verificar a melhor condição do equipamento nesse meio. Para isso, experimento de adição e recuperação foi realizado e um valor de 100% de recuperação foi obtido quando se utilizou isótopo ^{78}Se com CRI usando gás hidrogênio como gás reacional (60 mL min^{-1}). Dessa maneira, essa condição foi empregada apenas para determinação de Se no extrato de compostos de baixo peso molecular. O teor de selênio obtido no extrato de compostos de baixo peso molecular ficou abaixo do limite de detecção, dessa maneira sugere-se um estudo mais detalhado para otimização da extração desses compostos para amostra de sêmen.

Para resumir a análise de fracionamento na amostra de sêmen, a Figura 6.5 apresenta as frações de lipídeo e proteína da amostra de sêmen estudada e a Figura 6.6 mostra o teor de selênio encontrado nessas frações e o teor total desse elemento no sêmen.

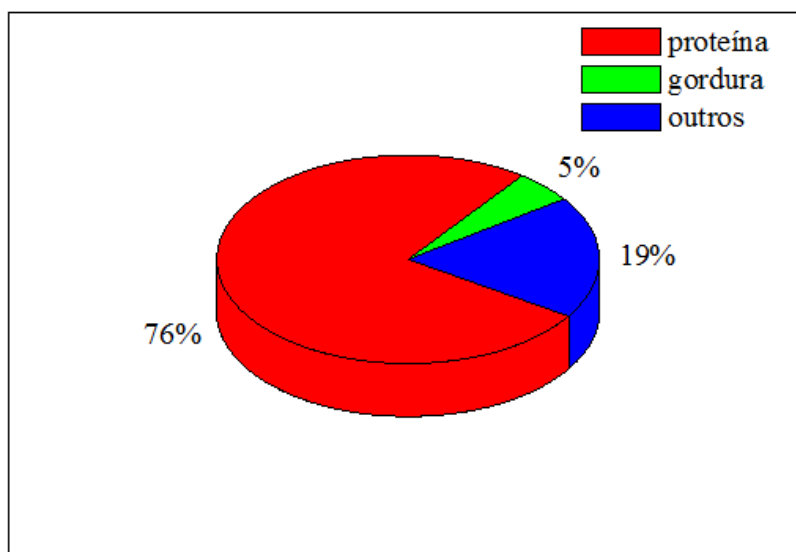


Figura 6.5 – Frações de proteína e lipídeo na amostra de sêmen.

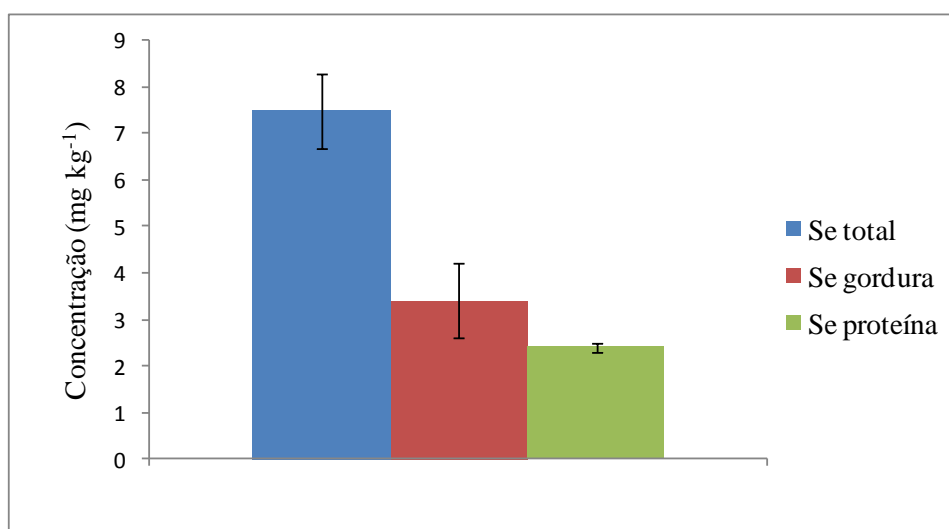


Figura 6.6 – Fracionamento de selênio na amostra de sêmen.

6.2.3. Otimização da separação cromatográfica das espécies de selênio

A separação simultânea de espécies inorgânicas de selênio e selenoaminoácidos não é simples devido às diferenças nas características físico-químicas dessas espécies. A cromatografia líquida de alta eficiência, com emprego de colunas de fase reversa e fases móveis compostas por misturas aquosas e aditivos iônicos tem sido reportada como uma boa alternativa para se

obter uma separação adequada dessas espécies, no que diz respeito à resolução e ao tempo de análise.

Desta forma, com o objetivo de obter a separação cromatográfica de Se(IV), Se(VI), SeMet e SeCys empregou-se a cromatografia de fase reversa com pareamento iônico. Diferentes fases móveis foram avaliadas em coluna C₁₈ com o intuito de otimizar as condições de análise. A Figura 6.7 ilustra as estruturas químicas das espécies avaliadas neste trabalho.

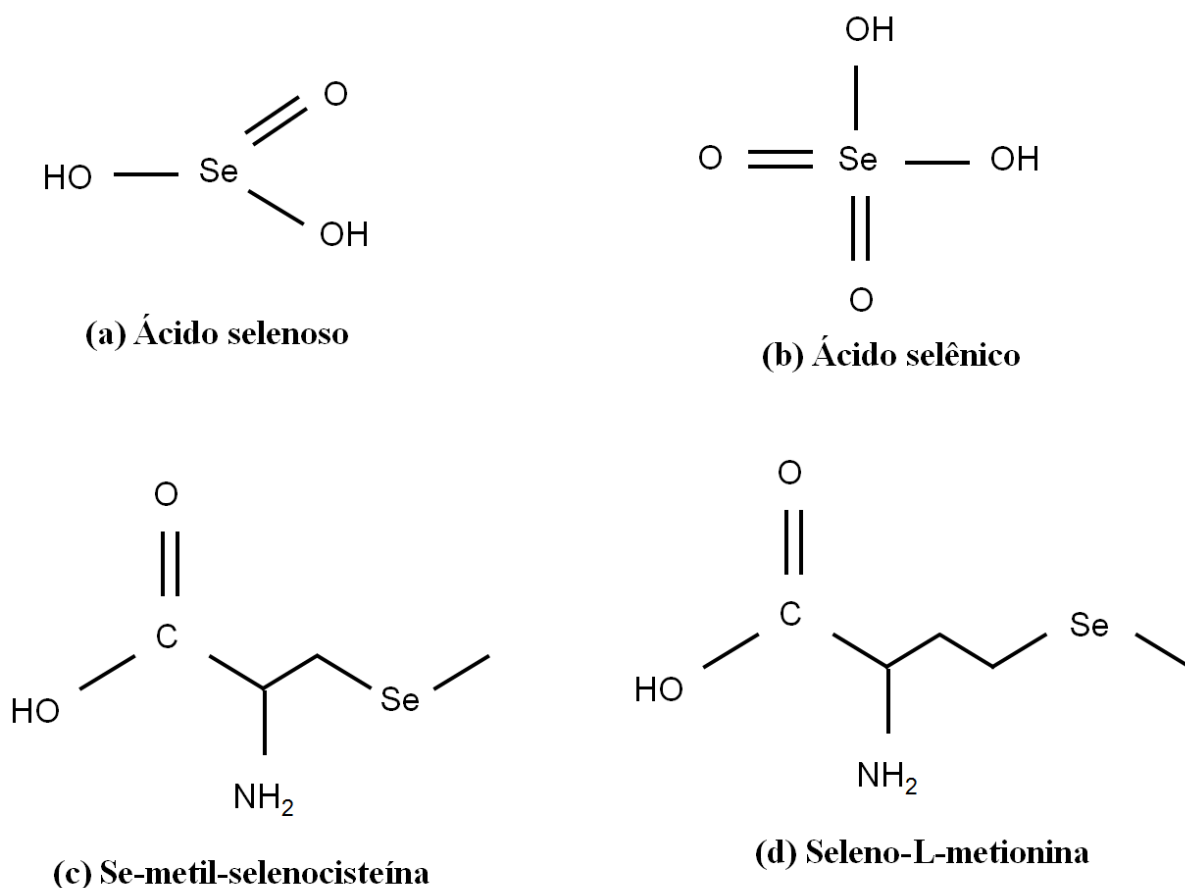


Figura 6.7 – Estrutura química das espécies de selênio inorgânicas (a) ácido selenoso (Se(IV)); $pK_2 = 1,7$ e (b) ácido selênico (Se(VI)); $pK_1 = 2,35$ e $pK_2 = 7,94$ e das espécies orgânicas (c) Se-metil-selenocisteína e (d) Seleno-L-metionina; $pK_1 = 2,6$ e $pK_2 = 8,9$.

Em solução aquosa, ácido selênico é um ácido forte e ácido selenoso é um ácido fraco. Essas espécies podem se apresentar na forma de

ânions com uma ou duas cargas negativas. Para valores de $\text{pH} < 4,0$, parte do ácido selenoso e do ácido selênico permanece na forma protonada. Por outro lado, a seleno-L-metionina e metilselenocisteína terão cargas positivas para valores de $\text{pH} < 4,0$, sendo que essa carga deve-se à protonação do grupo amino. Porém, essas duas espécies se comportarão como uma espécie zwitteriônica em pHs intermediários e se tornarão aniônicas em pHs elevados devido à desprotonação do grupo carboxílico.

Visto que as espécies de selênio avaliadas neste trabalho podem se apresentar em soluções aquosas como cátions, ânions ou zwitteriônicos dependendo do pH, suas retenções na cromatografia de fase reversa com pareamento iônico irá depender da concentração do par iônico e do pH da fase móvel.

Do *et al.*¹²¹ conseguiram uma separação cromatográfica das espécies orgânicas e inorgânicas de selênio usando cromatografia de fase reversa com pareamento iônico com $4,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 + (3,0 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1})$ de tetrabutilamônio ($\text{pH } 5,5 - 6,5$), como fase móvel. Baseando-se nesse artigo, neste trabalho foi feita uma adaptação desta fase móvel e de seus constituintes para uso com coluna C_{18} Hipersil ODS. Dessa maneira, avaliou-se a fase móvel $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 + \text{HTBA}$ (diferentes concentrações) + 1% metanol ($\text{pH } 6,5$). A Figura 6.8 mostra a estrutura química do par iônico dihidrogênio fosfato de tetrabutilamônio (HTBA).

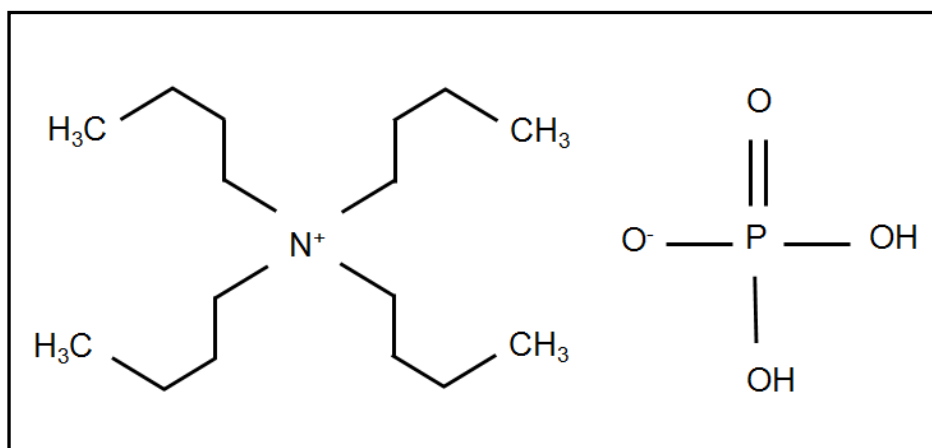


Figura 6.8 – Estrutura química do par iônico dihidrogênio fosfato de tetrabutilamônio (HTBA).

Inicialmente, fez-se um estudo com diferentes concentrações de HTBA na fase móvel. Na Figura 6.9 estão os cromatogramas obtidos com 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + 1% metanol (pH 6,5) e 2,5; 5,0 e 7,5 mmol L⁻¹ HTBA.

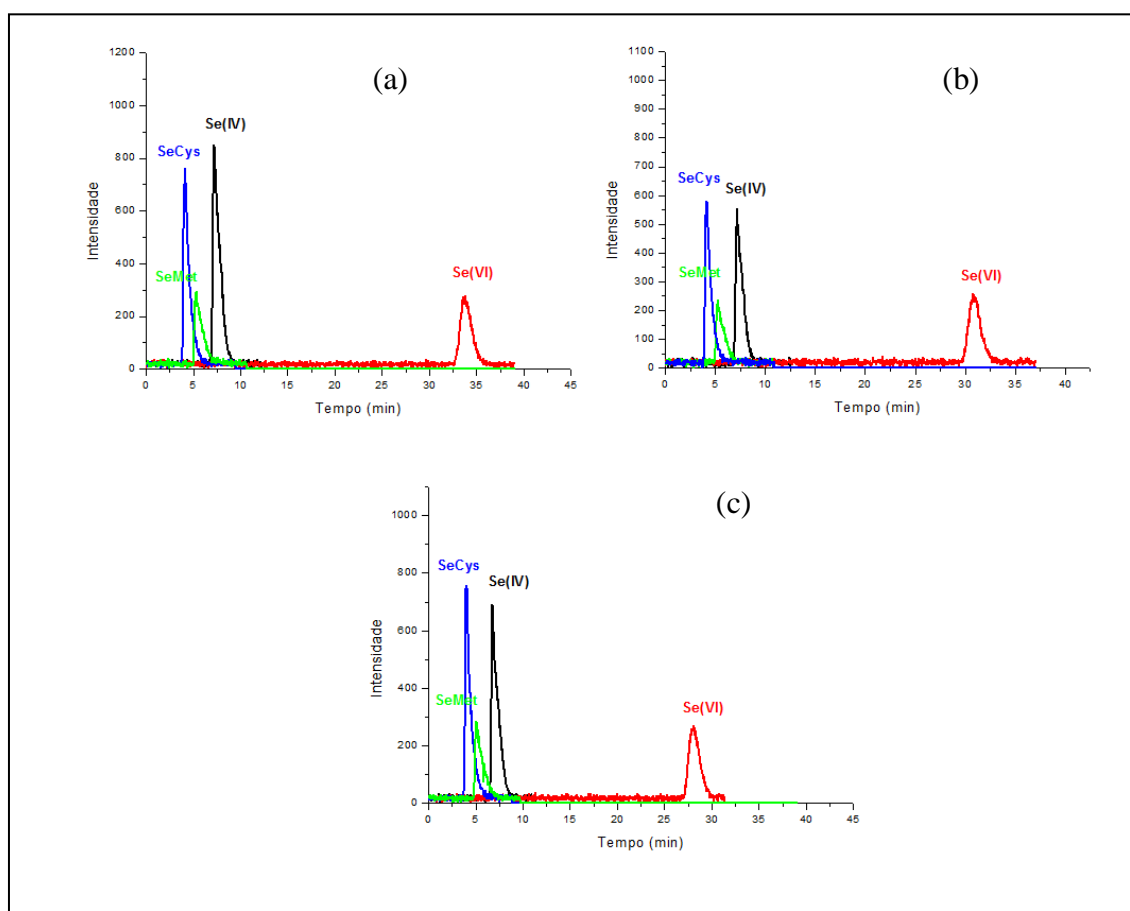


Figura 6.9 – Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + HTBA + 1% metanol (pH 6,5) (a) 2,5 mmol L⁻¹ HTBA; (b) 5,0 mmol L⁻¹ HTBA e (c) 7,5 mmol L⁻¹ HTBA.

A estrutura química do HTBA mostra que essa molécula é um par iônico catiônico, o qual interage com moléculas carregadas negativamente levando a formação de pares iônicos. Adicionalmente, a molécula de HTBA possui em sua estrutura química quatro grupos butil ($- [CH_2]_3 - CH_3$) que são volumosos e hidrofóbicos e, portanto, interagem com a fase estacionária, também hidrofóbica, da coluna de fase reversa, resultando em retenção. Desta forma, o HTBA interage com as espécies de selênio desprotonadas e as mesmas passam a ter maior retenção na coluna C₁₈.

Os resultados da Figura 6.9 mostram que, nas três concentrações avaliadas para HTBA como par iônico, as espécies inorgânicas foram as que

apresentaram maiores valores de retenção e de fatores de separação cromatográfica. No entanto, as bandas cromatográficas referentes às espécies de SeMet e SeCys não foram significativamente influenciadas pelo aditivo da fase móvel e, além de ficarem pouco retidas, ainda apresentaram baixa resolução cromatográfica entre si. Estes resultados sugerem que, provavelmente, apenas as espécies inorgânicas formaram par iônico efetivo com o contraíon, visto que em $\text{pH} > 4$ essas espécies estão completamente desprotonadas, enquanto que as espécies de selenoaminoácidos em $\text{pH} 6,5$ estão com carga total neutra porque formam compostos zwitteriônicos. Observa-se que a mudança nas concentrações de HTBA não apresentou melhora na separação das espécies, e assim, optou-se em trabalhar com a menor concentração de HTBA ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e avaliar o comportamento dos tempos de retenção dessas espécies de selênio em diferentes valores de pH (Figura 6.10).

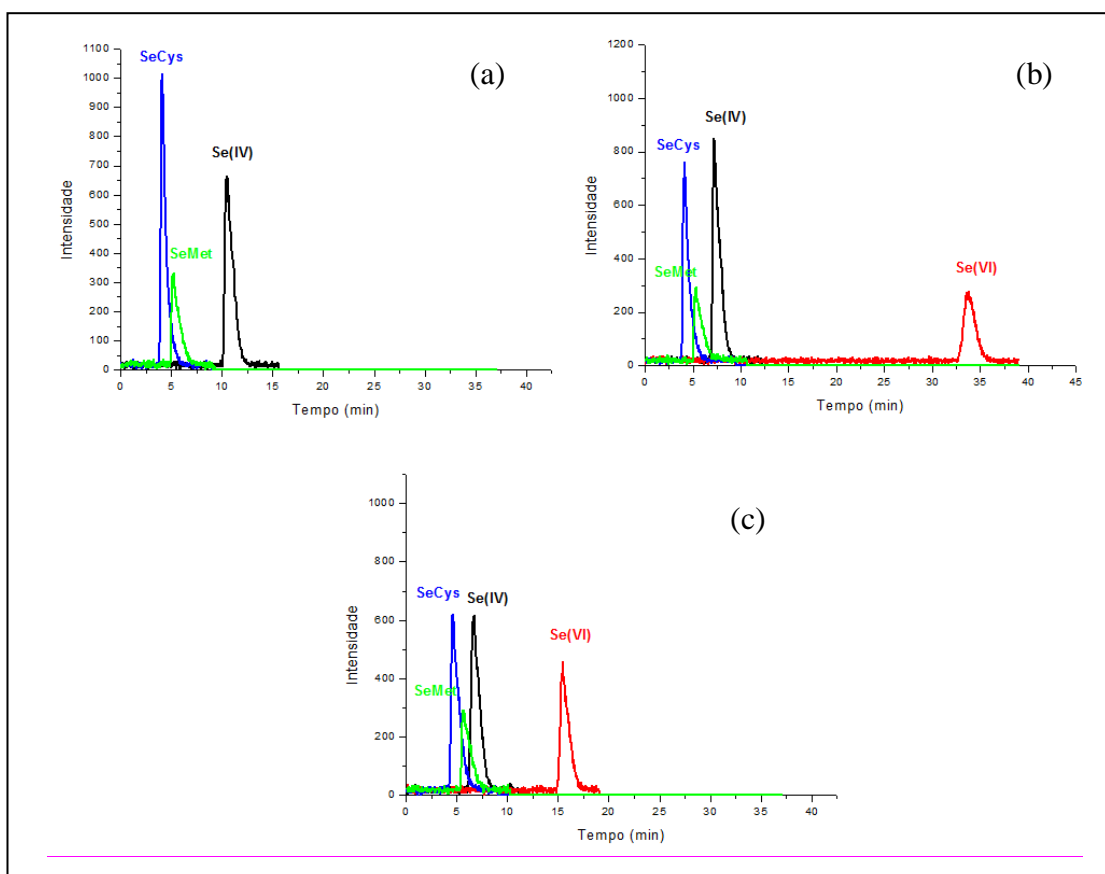


Figura 6.10 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + 2,5 mmol L⁻¹ HTBA + 1% metanol. (a) pH 5,5; (b) pH 6,5 e (c) pH 7,5.

Com a variação nos valores de pH da fase móvel, obteve-se uma melhor separação para a banda cromatográfica referente ao Se(IV) em pH 5,5. Contudo, nesse pH, a espécie Se(VI) ficou muito retida na coluna e não eluiu em um tempo de análise de até 60 minutos. Com este resultado, pode-se inferir que em pH mais baixo a formação do par iônico com o contraíon HTBA foi favorecida, o que justifica o aumento de retenção das espécies inorgânicas. Apesar da espécie Se(VI) ter apresentado um fator de retenção muito elevado com a fase móvel com pH 5,5, essa foi escolhida por ter separado melhor a espécie Se(IV) dos dois selenoaminoácidos. Na tentativa de otimizar a separação de SeCys e SeMet, acrescentou-se à fase móvel o ácido trifluoracético (TFA),

sendo este um par aniônico forte (Figura 6.11). A escolha por este par iônico como constituinte da fase móvel foi baseada na possibilidade que este teria de interagir com as espécies básicas (protonadas) dos dois selenoaminoácidos, promovendo retenção e separação das mesmas. O cromatograma obtido após emprego deste par iônico está apresentado na Figura 6.12.

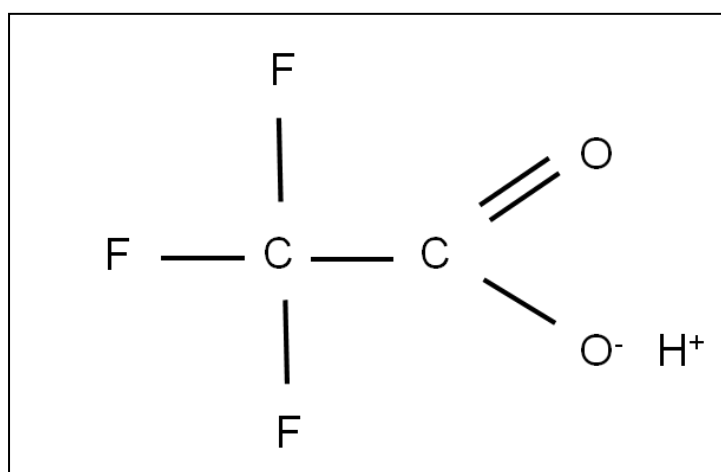


Figura 6.11 – Estrutura química do par iônico trifluoracético.

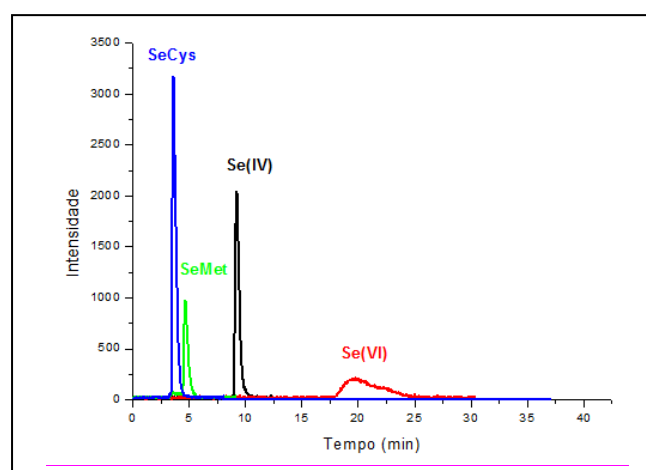


Figura 6.12 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + 2,5 mmol L⁻¹ HTBA + 0,5 mmol L⁻¹ TFA + 1% metanol (pH 5,5).

Ácido trifluoracético é também um par iônico e, por sua natureza volátil, não causa prejuízos ao ICP-MS.¹⁰⁷ O mecanismo de pareamento do TFA, segundo Pathy, é baseado em adsorção de superfície não específica ao invés do mecanismo de formação do pareamento iônico dinâmico.¹⁴⁸

Com a inclusão de TFA na concentração 0,5 mmol L⁻¹ na fase móvel, a retenção das espécies Se(VI) diminuiu significativamente, no entanto, o mesmo sofreu um alargamento de banda cromatográfica. Talvez isso tenha ocorrido devido à competição entre o mecanismo de pareamento do TFA, por adsorção do contraíon à fase estacionária, que pode ter competido com a interação das espécies inorgânicas associadas ao HTBA. Apesar dos tempos de retenção das espécies orgânicas de selênio não terem aumentado como esperado, com a presença de TFA, a resolução das bandas cromatográficas melhorou e isso possibilitou uma separação mais adequada das espécies SeCys e SeMet.

Com o objetivo de obter uma melhor banda cromatográfica para Se(VI), empregou-se a mesma fase móvel anterior, com pH 6,0 (Figura 6.13). Esse experimento, diferente dos anteriormente apresentados, foi feito com ICP-MS como detector. A concentração dos padrões de selênio foi de 100 µg L⁻¹.

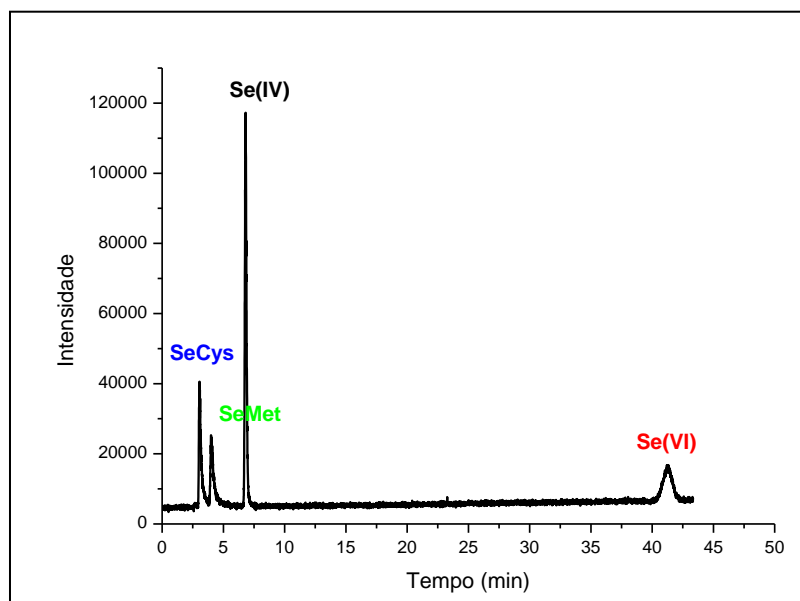


Figura 6.13 - Separação das diferentes espécies de selênio. Condições Cromatográficas: Coluna C₁₈ Hypersil (25 x 0,46 cm), fase móvel: 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ + 2,5 mmol L⁻¹ HTBA + 0,5 mmol L⁻¹ TFA + 1% metanol (pH 6,0).

De fato, a banda cromatográfica da espécie Se(VI) apresentou-se mais simétrica nessa última condição cromatográfica. A desvantagem das condições cromatográficas utilizadas foi o tempo de análise muito longo, justamente para contemplar a presença das quatro espécies conjuntamente. Este fator pode dificultar a análise de amostras reais, se estas forem em grande número. A alternativa para contornar este problema é o emprego de eluição gradiente, onde a concentração de metanol seja aumentada após 15 minutos de análise, para reduzir o tempo de retenção do Se(VI) e ajustar os fatores de retenção para todos os quatro analitos de interesse.

6.3. Conclusões

Os teores de gordura e de proteína no sêmen bovino foram, respectivamente, de 5,0% $m\ m^{-1}$ e 76,0% $m\ m^{-1}$. No sêmen há 7,5 $mg\ kg^{-1}$ de selênio total e, de acordo com o estudo de fracionamento, cerca de 45% do selênio se encontram na fase lipídica e 32% estão na fase proteica. A fração de compostos de baixo peso molecular no sêmen não apresentou teor de selênio significativo. É possível que proteínas lipossolúveis tenham sido lixiviadas no processo de extração de gordura e, por esse motivo, o teor de selênio na fração lipídica tenha sido superior ao teor encontrado na fração proteica. Na otimização da separação das espécies de Se(IV), Se(VI), SeMet e SeCys por cromatografia de fase reversa com pareamento iônico, a melhor condição cromatográfica para a separação dos compostos foi com 5 $mmol\ L^{-1}$ Na_2HPO_4 + 2,5 $mmol\ L^{-1}$ HTBA + 0,5 $mmol\ L^{-1}$ TFA + 1% metanol (pH 6,0) como fase móvel. Porém, nessas condições, a espécie Se(VI) ficou muito retida na coluna levando a um tempo longo de análise. Dessa maneira, o uso de eluição gradiente é uma alternativa para contornar este problema. O procedimento de separação cromatográfico desenvolvido será aplicado para a identificação das espécies Se(IV), Se(VI), SeMet e SeCys na amostra de sêmen bovino.

Referências

Referências

1. COZZOLINO, F. M. S. *Biodisponibilidade de nutrientes*. Silvia M. Franciscato (Ed.) Cozzolino Barueri, SP: Manole, 2005.
2. REILLY, C. *Metal contamination of food: its significance for food quality and human health*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 3^a Ed., 2002.
3. KRUG, F. J. *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar*. Editado por Francisco José Krug, Fealq, Piracicaba, 2009.
4. WASILEWSKA, M.; GOESSLER, W.; ZISCHKA, M.; MAICHINC, B. & KNAPP, G. "Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements" *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1121, 2002.
5. OLIVEIRA, E. "Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends" *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 174, 2003.
6. WIETESKA, E.; ZIÓEK, A. & DRZEWINSKA, A. "Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry" *Anal. Chim. Acta*, **330**: 251, 1996.
7. Compilação de procedimentos assistidos por radiação microondas para o preparo de amostras 2006-2007, Grupo de Análise Instrumental Aplicada, UFSCar, São Carlos-SP, 2008.
8. KINGSTON, H. M. & JESSIE, L. B. "Microwave energy for acid decomposition at elevated temperatures and pressures using biological and botanical samples" *Anal. Chem.* **58**: 2534, 1986.
9. KINGSTON, H. M. & JASSIE, L. B. *Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice*. ACS Professional Reference Book, Washington, 1988.
10. MESTER, Z. & STURGEAN, R. *Comprehensive Analytical Chemistry - Sample preparation for trace analysis*. 1^a Ed., Volume XLI, Wilson & Wilson's, Amsterdam, 2003.
11. KINGSTON, H. M. S. & HASWELL, S. J. *Microwave-Enhanced Chemistry – Fundamentals, Sample Preparation and Applications*, American Chemical Society. ACS Professional Reference Book Washington, 1997.

12. WÜRFELS, M. & JACKWERTH, E. “Investigation on the carbon balance in the decomposition of biological materials with nitric acid” *Fresen. J. Anal. Chem.*, **322**: 354, 1985.
13. WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. & STOEPLER, M. “About the problem of disturbances of inverse voltammetric trace analysis after pressure decomposition of biological samples” *Fresen. J. Anal. Chem.*, **329**: 459, 1987.
14. WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. & STOEPLER, M. “On the composition of the residue of biological materials after pressure digestion with nitric acid” *Fresen. J. Anal. Chem.*, **330**: 160, 1988.
15. WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. & STOEPLER, M. “Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition” *Anal. Chim. Acta*, **226**: 1, 1989.
16. TREVIZAN, L.C.; DONATI, G.L.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. *Microwave-assisted procedures for sample preparation: recent developments*. in: Marco Aurelio Zezzi Arruda (Ed.), *Trends in Sample Preparation*, Nova Science Publishers, São Paulo, Brazil, 2007, pp. 29–52.
17. BOCCA, B.; ALTIMONTI, A.; FORTE, G.; PETRUCCI, F. & PIROLA, C. “High-throughput microwave-digestion procedures to monitor neurotoxic elements in body fluids by means of inductively coupled plasma mass spectrometry” *Anal. Bional. Chem.*, **377**: 65, 2003.
18. BRANCALION, M. L. & ARRUDA, M. A. Z. “Evaluation of medicinal plant decomposition efficiency using microwave ovens and mini-vials for Cd determination by TS-FF-AAS” *Microchim. Acta*, **150**: 283, 2005.
19. NOMURA, C.S.; SINKUS, F. H. & OLIVEIRA, P. V. *Trends in sample preparation 2004 —development and application*. Book of abstracts, Graz, Austria, 2004, p. 75.
20. FLORES E. M. M.; SAIDELLES, A. P. F.; BARIN, J. S.; MORTARI, S. R.; MARTINS, A. F. “Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry” *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**: 1419, 2001.
21. ISOYAMA, H.; UCHIDA, T.; OGUCHI, K.; IIDA, C. & NAKAGAWA, G. “Determination of tracemetals in biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with discrete nebulization after microwave decomposition” *Anal. Sci.*, **6**: 385, 1990.

22. MATUSIEWICZ, H. "Vapour-phase acid digestion of inorganic and organic matrices for trace element analysis using a microwave heated bomb" *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**: 283, 1991.
23. MATUSIEWICZ, H. "A review of acid vapor-phase sample digestion of inorganic and organic matrices for elemental analysis" *Spectrosc. Int.*, **3**: 22, 1991.
24. MATUSIEWICZ, H. "Acid vapor-phase pressure decomposition for the determination of elements in biological materials by flame atomic emission spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**: 265, 1989.
25. TREVIZAN, L. C.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Single vessel procedure for acid vapor partial digestion of bovine liver in a focused microwave: multielement determination by ICP-OES" *Talanta*, **61**: 81, 2003.
26. ARAÚJO, G. C. L.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Single vessel procedure for acid-vapor partial digestion in a focused microwave: Fe and Co determination in biological samples by GFAAS" *Analyst*, **125**: 1861, 2000.
27. ARAÚJO, G. C. L.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Microwave single vessel acid-vapor extraction: effect of experimental parameters on Co and Fe determination in biological samples" *Microchim. Acta*, **144**: 81, 2004.
28. WASILEWSKA, M.; GOESSLER, W.; ZISCHKA, M.; MAICHINC, B. & KNAPP, G. "Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements" *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1121, 2002.
29. SKOOG, D. A., 1918-; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. *Principles of instrumental analysis*. 5^a Ed, Philadelphia: Harcourt Brace College, 1998.
30. GOUVEIA, S. T., *Moagem Criogênica e Aquecimento por Radiação Infravermelha como Alternativas no Preparo de Amostras Orgânicas*. São Carlos-SP, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2000. Tese de doutorado.
31. KUEHNER, J; ALVAREZ, R.; PAUSEN, P. J. & MURPHY, T. J. "Production and analysis of special high-purity acids purified by sub-boiling distillation" *Anal. Chem.*, **44**: 2050, 1972.

32. GRAS, L.; MORA, J.; TODOLÍ, J. L.; CANALS, A. & HERNANDIS, V. "Desolvation of acid solutions in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry by infrared radiation. Comparison with a system based on microwave radiation" *Spectrochim. Acta Part B*, **54**: 1321, 1999.
33. EASTGATE, A. R.; FRY, R. C. & GOWER, G. H. "Radiation versus conduction in heated spray chamber desolvation for Inductively Coupled Plasmas" *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**: 305, 1993.
34. SCHRÖN, W. & MÜLLER, U. "Influence of heated spray chamber desolvation on the detectability in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry" *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**: 22, 1997.
35. GROTTI, M.; LAGOMARSINO, C. & FRACHE, R. "A new nebulization device with exchangeable aerosol generation mode as a useful tool to investigate sample introduction processes in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry" *Spectrochim. Acta Part B*, **59**: 1001, 2004.
36. MORA, J.; MAESTRE, S.; HERNANDIS, V. & TODOLÍ, L. J. "Liquid-sample introduction in plasma spectrometry" *Trends Anal. Chem.*, **22**: 123, 2003.
37. SCHÖNIGER, W. "Eine mikroanalytische schnellbestimmung Von halogen in organischen substanzen" *Mikrochim. Acta*, p 123, 1955.
38. KNAPP, G.; RAPTIS, S. E.; KAISER, G.; TÖLG, G.; SCHRAMEL, P. & SCHREIBER, B. "A partially mechanized for the combustion of organic samples in a stream of oxygen with quantitative recovery of the trace elements" *Fresenius J. Anal. Chem.*, **308**: 97, 1981.
39. NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L. C.; ARAÚJO, G. C. L. & NOGUEIRA, A. R. A. "Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation (review)" *Spectrochim. Acta part B*, **57**: 1855, 2002.
40. MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G. & FLORES, E. M. M. "Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique" *Microchem. J.*, **82**: 183, 2006.
41. FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. & KNAPP, G. "Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications" *Spectrochim. Acta, Part B*, **6**: 1051, 2007.

42. ASTM D 3566-03, Standard Practice for Rubber — Determination of Bromine in the Presence of Chlorine by Oxygen Combustion, ASTM International 2003.
43. ASTM D 2361-02, Standard Test Method for Chlorine in Coal, ASTM International 2002.
44. ASTM D 3761-96, Standard Test Method for Total Fluorine in Coal by the Oxygen Bomb Combustion/Ion Selective Electrode Method, ASTM International 2002.
45. ASTM D 3684-01, Standard Test Method for Total Mercury in Coal by the Oxygen Bomb Combustion/Atomic Absorption Method, ASTM International 2001.
46. ASTM D 3566-03, Standard Practice for Rubber — Determination of Bromine in the Presence of Chlorine by Oxygen Combustion, ASTM International 2003;
47. ISO 7725, Rubber and rubber products – Determination of bromine and chlorine content – Oxygen flask combustion technique, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1991.
48. ISO 6528-1, Rubber — Determination of Total Sulfur Content – Part 1: Oxygen Combustion Flask Method, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1992.
49. ISO 1138, Rubber compounding ingredients – Carbon black – Determination of Sulphur Content, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1981.
50. ASTM D 6741-01, Standard Test Methods for Silanes Used in Rubber Formulations (bis-(triethoxysilylpropyl)sulfanes): Sulfur Content, ASTM International 2001.
51. ISO 9055, Carbonaceous materials for the production of aluminum – Pitch for electrodes – Determination of sulfur content by the bomb method, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1988.
52. MESKO, M. F.; PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; PANIZ, J. N. G.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. & FLORES, E. M. M. “Focused Microwave-Induced Combustion: A new technique for sample digestion” *Anal. Chem.* **82**(5): 2155, 2010.

53. CARUSO, J. A.; SUTTON, K. L. & ACKLEY, K. L. *Elemental speciation – New approaches for trace element analysis*. 1^a Ed., Wilson & Wilson's, Amsterdam, 2000.
54. KOT, A. & NAMIESNIK, J. “The role of speciation in analytical chemistry” *Trends Anal. Chem.*, **19**: 69, 2000.
55. TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G., MUNTAU, H.; LEEUWEN, H. P. V. & ŁOBÍŃSKI, R. “Guidelines for terms relates to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)” *Pure Appl. Chem.*, **72** (8): 1453, 2000.
56. ZINGARO, R. A. & COOPER, W. C. *Selenium*. Ralph A. Zingaro (Ed.); W Charles Cooper (Ed.) New York: Van Nostrand Reinhold, 1974.
57. TINGGI, U. “Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review” *Toxicol. Lett.*, **137**: 103, 2003.
58. SUZUKI, K.T. “Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies”. *J. Health Sci.*, **51**:107, 2005.
59. COZZOLINO, F. M. S. *Biodisponibilidade de nutrientes*. Silvia M. Franciscato (Ed.) Cozzolino Barueri, SP: Manole, 2005.
60. SECOR, C. L. & LISK, D. J. “Variation in the selenium content of individual Brazil nuts” *J. Food Saf.*, **9**: 279, 1989.
61. Food and Nutrition Board – USA Institute of Medicine. *Dietary References Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. Washington: National Academy Press; 2000.
62. AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. *Metais: gerenciamento da toxicidade*. Fausto A. de Azevedo; Alice A. da Matta Chasin (Ed.) São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
63. ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G. & HOEKSTRA, W. G. “Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase”. *Science*, **179**: 588, 1973.
64. URSINI, F. & BINDOLI, A. “The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes”. *Chem. Phys. Lipids*, **44**: 255, 1987.

65. ARTHUR, J. R.; NICOL, R. & BECKETT, G.J. "Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases". *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 236, 1993.
66. GLADYSHEV, V. N. & HATFIELD, D. L. "Selenocysteine-containing proteins in mammals". *J. Biochem. Sci.* **6**: 151, 1999.
67. LI, N.; GAO, Z.; LUO, D.; TANG, X.; CHEN, D. & HU, Y. "Selenium level in the environment and the population of Zhoukoudian area, Beijing, China" *Sci. Total Environ.*, **381**:105, 2007.
68. CHEN, X.; YANG, G.; CHEN, J.; CHEN, X.; WEN, Z. & GE, K. "Studies on the relations of selenium to Keshan disease". *Biol. Trace Elem. Res.*, **2**: 91, 1980.
69. GE, K. & YANG, G. "The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China". *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.*, **57**: 259S, 1993.
70. <http://www.embrapa.com.br>, artigos: A cadeia bovina no Brasil, acessado em 29 de janeiro de 2011.
71. <http://www.abiec.com.br>, acessado em 29 de janeiro de 2011.
72. MORAES, S.S. Microelement deficiencies and imbalances in cattle and sheep in some regions of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **19**:19, 1999.
73. RODRIGUES, S. H. B. G., *Preparo de amostras de sêmen e plasma seminal bovino para determinação de Se e Mo por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite*. São Carlos-SP, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2000. Tese de doutorado.
74. XU, D.; SHEN, H.; ZHU, Q.; CHUA, L.; WANG, Q.; CHIA, S. & ONG, C. "The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma". *Mut. Res.*, **534**: 155, 2003.
75. BEHNE, D.; DUK, M. & ELGER, W. "Selenium Content and Glutathione Peroxidase Activity in the Testis of the Maturing Rat" *J. Nutr.*, **116**:1442, 1986.
76. SHALINI, S. & BANSAL, M. P. "Dietary selenium deficiency as well as excess supplementation induces multiple defects in mouse epididymal spermatozoa: understanding the role of selenium in male fertility" *Int. J. Androl.*, **31**: 438, 2008.

77. SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; GARCÍA-MONTALVO, E. A.; IZQUIERDO-VEJA, J. A. & DEL RAZO, L. M. "Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa" *Cell Biol. Toxicol.*, **24**:321, 2008.
78. LI-GUANG, S.; RU-JIE, Y.; WEN-BIN, Y.; WEN-JUAN, X.; CHUN-XIANG, Z.; YOU-SHE, SHI LEI, R. & FU-LIN, L. "Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats" *Anim. Reprod. Sci.*, **118**: 248, 2010.
79. MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; CHUNG, Y. K.; PATE, J. L. & POPE, W. F. "Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts" *J. Anim. Sci.* **75**:2994, 1997.
80. MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C. & PATE, J. L. "Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars" *J. Anim. Sci.* **78**:1537, 2000.
81. BERTELSMANN, H.; KEPPLER, S.; HOLTERSHINKEN, M.; BOLLWEIN, H.; BEHNE, D.; ALBER, D.; BUKALIS, G.; KYRIAKOPOULOS, A. & SIEME, H. "Selenium in blood, semen, seminal plasma and spermatozoa of stallions and its relationship to sperm quality". *Reprod. Fertil. Develop.*, **22**(5), 886-891, 2010.
82. DO, E. S. E. & HAFEZ, B.; *Reproduction in Farm Animals*, 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 2000.
83. SAEED, K. & THOMASSEN, Y. "Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in blood serum and seminal fluid after protein precipitation with trichloroacetic acid" *Anal. Chim. Acta*, **143**, 223-228, 1982.
84. NÈVE, J.; CHAMART, S.; TRIGAUX, P. & VERTONGEN, F. "Direct determination of selenium seminal plasma by Zeeman-effect atomic absorption spectroscopy" *At. Spectrosc.*, **8**(6), 167-169, 1987.
85. PLEBAN, P. A. & MEI, D. "Trace elements in human seminal plasma and spermatozoa" *Clin. Chim. Acta*, **133**, 43-50, 1983.
86. SAARANEN, M.; SUISTOMMA, U.; KANTOLA, M.; REMES, E. & VANHAPERTTULA, T. "Selenium in reproductive organs, seminal fluid and serum of men and bulls". *Hum. Reprod.*, **1**(2), 61-644, 1986.

87. LIN, T. H.; TSENG, W. C. & CHENG, S. Y. "Direct determination of selenium in human blood plasma and seminal plasma by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry and clinical application" *Biol. Trace Elem. Res.*, **64**, 133-149, 1998.
88. EIMANN, E. D.; SMITH, M. F.; MORRIS, J. S.; GALL, T. J.; ELMORE, R. G. & MORROW, R. E. "Relationships among spermatozoa abnormalities and the selenium concentration of blood plasma, semen, and reproductive tissues in young bulls" *Anim Reprod. Sci.*, **7**: 315, 1984.
89. BECKER, J. S., *Inorganic Mass Spectrometry – Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 2007.
90. Thomas, R., *Practical Guide to ICP-MS – A Tutorial for Beginners*, 2^a Ed., Taylor & Francis Group, New York, USA, 2008.
91. B'Hymer, C. & Caruso, J. A. "Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry" *J. Chromatogr. A*, **1114**: 1, 2006.
92. HUERTA, V. D.; REYES, L. H.; MARCHANTE-GAYÓN, J. M.; SÁNCHEZ, M. L. F. & SANZ-MEDEL, A. "Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS" *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**: 1243, 2003.
93. REYES, L. H.; GAYÓN, J. M. M.; ALONSO, J. I. G. & SANZ-MEDEL, A. "Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS" *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**: 11, 2003.
94. OGRA, Y.; ISHIWATA, K. & SUZUKI, K. T., "Effects of deuterium in octopole reaction and collision cell ICP-MS on detection of selenium in extracellular fluids" *Anal. Chim. Acta*, **554**: 123, 2005.
95. MAZAN, S.; GILON, N.; CRÉTIER, G.; ROCCA, J. L. & MERMET; J. M. "Inorganic selenium speciation using HPLC-ICP-hexapole collision/reaction cell-MS" *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 366, 2002.
96. SCHAUMLFFEL, D.; BIERŁA, K. & ŁOBINSKI, R. "Accurate determination of selenium in blood serum by isotope dilution analysis using inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry with xenon as collision gas" *J. Anal. At. Spectrom.*, **22**: 318, 2007.

97. SLOTH, J. J. & LARSEN, E. H. “The application of inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry for measurement of selenium isotopes, isotope ratios and chromatographic detection of selenoamino acids” *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**: 669, 2000.
98. HILL, S. J.; FORD, M. J. & EBDON, L. “Investigations into the Application of Methane Addition to the Nebulizer Gas in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Removal of Polyatomic Interferences” *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**: 1157, 1992.
99. PICK, D.; LEITERER; M. & EINAX, J. W. “Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS” *Microchem. J.*, **95**: 315, 2010.
100. DUFAILY, V.; NOËL, L. & GUÉRIN, T. “Determination of chromium, iron and selenium in foodstuffs of animal origin by collision cell technology, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), after closed vessel microwave digestion” *Anal. Chim. Acta*, **565**: 214, 2006.
101. IGLESIAS, M.; GILON, N.; POUSSEL, E. & MERMET, J. M. “Evaluation of an ICP-collision/reaction cell-MS system for the sensitive determination of spectrally interfered and non-interfered elements using the same gas conditions” *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1240, 2002.
102. PEREIRA, C. D.; GARCIA, E. E.; SILVA, F. V.; NOGUEIRA, A. R. A. & NOBREGA, J. A. “Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface” *J. Anal. At. Spectrom.* **11**: 1763, 2010.
103. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; *Introdução a métodos cromatográficos*, 6^a Ed. Campinas: Unicamp, 1995.
104. WOLLER; A.; GARRAUD, H.; BOISSON; J.; DORTHE; A. M.; FODORA, P. & DONARD; O. F. X. “Simultaneous speciation of redox species of arsenic and selenium using an anion-exchange microbore column coupled with a micro- concentric nebulizer and an inductively coupled plasma mass spectrometer as detector” *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**: 141, 1998.
105. GAMMELGAARD, B.; BENDAHL, L.; SIDENIUS, U. & JØNS, O. “Selenium speciation in urine by ion-pairing chromatography with perfluorinated carboxylic acids and ICP-MS detection” *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 570, 2002.

106. CASTILLO, A.; ROIG-NAVARRO, A. F. & POZO, O. J. “Capabilities of microbore columns coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in speciation of arsenic and selenium” *J. Chromatogr. A*, **1202**: 132, 2008.
107. KOTREBAI, M.; BIRD, S. M.; TYSON, J. F.; BLOCK, E.; UDEN, P. C. “Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry and by referenced electrospray ionization-mass spectrometry” *Spectrochim. Acta Part B*, **54**: 1573, 1999.
108. TYSON, J. F. “High-performance, flow-based, sample pre-treatment and introduction procedures for analytical atomic spectrometry” *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**: 169, 1999.
109. SNYDER, L. R.,; GLAJCH, J. L. & KIRKLAND, J. J., *Practical HPLC method development*. New York: John Wiley, 1988.
110. MCNAIR, H. M. & ESQUIVEL H., B., *Cromatografia líquida de alta pressão*. Volume 10, Washington: The Pan American Union, 1973.
111. CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G.; *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*. Sao Carlos: EdFSCar, 2001.
112. BIRD, S. M.; UDEN, P. C.; TYSON, J. F.; BLOCK, E. & DENOYER, E. “Speciation of Selenoamino Acids and Organoselenium Compounds in Selenium-enriched Yeast Using High-performance Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry” *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 785, 1997.
113. BIRD, S. M.; GE, H.; UDEN, P. C.; TYSON, J. F.; BLOCK, E.; DENOYER, E. “High-performance liquid chromatography of selenoamino acids and organo selenium compounds Speciation by inductively coupled plasma mass spectrometry” *J. Chromatogr. A*, **789**: 349, 1997.
114. MARCHANTE-GAYÓN, J. M.; THOMAS, C.; FELDMANN, I. & JAKUBOWSKI, N. “Comparison of different nebulisers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell ICP-MS” *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**: 1093, 2000.
115. ZHENG, J. & KOSMUS, W. “Retention Study of Inorganic and Organic Selenium Compounds on a Silica-Based Reversed Phase Column with Mixed Ion-Pairing Reagents” *Chromatographia*, **51**: 338, 2000.

116. ZHENG, J.; OHATA, M.; FURUTA, N. & KOSMUS, W. "Speciation of selenium compounds with ion-pair reversed-phase liquid chromatography using inductively coupled plasma mass spectrometry as element-specific detection" *J. Chromatogr. A*, **874**: 55, 2000.
117. ZHENG, J.; OHATA, M. & FURUTA, N. "Reversed-phase liquid chromatography with mixed ion-pair reagents coupled with ICP-MS for the direct speciation analysis of selenium compounds in human urine" *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 730, 2002.
118. ZHENG, J.; SHIBATA, Y. & TANAKA, A. "Study of the stability of selenium compounds in human urine and determination by mixed ion-pair reversed-phase chromatography with ICP-MS detection" *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**: 348, 2002.
119. ZHENG, J.; SHIBATA, Y. & FURUTA, N. "Determination of selenoamino acids using two-dimensional ion-pair reversed phase chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry" *Talanta*, **59**: 27, 2003.
120. PAN, F.; TYSON, J. F. & UDEN, P. C. "Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.*, **22**: 931, 2007.
121. DO, B.; ROBINET, S.; PRADEAU, D. & GUYON, F. "Speciation of arsenic and selenium compounds by ion-pair reversed-phase chromatography with electrothermic atomic absorption spectrometry Application of experimental design for chromatographic optimization" *J. Chromatogr. A*, **918**: 87, 2001.
122. GAMMELGAARD, B.; MADSEN, K. G.; BJERRUM, J.; BENDAHL, L.; JØNS, O.; OLSEN, J. & SIDENIUS, U. "Separation, purification and identification of the major selenium metabolite from human urine by multi-dimensional HPLC-ICP-MS and APCI-MS" *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**: 65, 2003.
123. MORENO, P.; QUIJANO, M. A.; GUTIÉRREZ, A. M.; PÉREZ-CONDE, M. C. & CÁMARA, C. "Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry" *Anal. Chim. Acta*, **524**: 315, 2004.
124. ENCINAR, J. R.; RUZIK, R.; BUCHMANN, B.; TORTAJADA, J. LOBINSKI, R. & SZPUNAR, J. "Detection of selenocompounds in a tryptic

digest of yeast selenoprotein by MALDI time-of-flight MS prior to their structural analysis by electrospray ionization triple quadrupole MS” *Analyst*, **128**: 220, 2003.

125. ENCINAR, J. R.; SLIWKA-KASZYNSKA, M.; POŁATAJKO, A.; VACCHINA, V. & SZPUNAR, J. “Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast” *Anal. Chim. Acta*, **500**: 171, 2003.

126. VONDERHEIDE, A. P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S.; B’HYMER, C.; MONTES-BAYON, M.; LEON, C. P. & CARUSO, J. A. “Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC–ICP-MS and ES-MS” *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 5722, 2002.

127. CHUNHIENG, T.; PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T. & MONTET, D. “Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*” *J. Agric. Food Chem.*, **52**(13): 4319, 2004.

128. CASIOT, C.; SZPUNAR, J.; ŁOBINSKI, R. & POTIN-GAUTIER, M. “Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS” *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**: 645, 1999.

129. MORENO, P.; QUIJANO, M. A.; GUTIÉRREZ, A. M.; PÉREZ-CONDE, M. C. & CÁMARA, C. “Fractionation studies of selenium compounds from oysters, and their determination by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry” *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**: 1044, 2001.

130. POŁATAJKO, A.; SLIWKA-KASZYNSKA, M.; DERNOVICS, M.; RUZIK, R.; ENCINAR, J. R. & SZPUNAR, J. “A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast” *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 114, 2004.

131. CHASSAIGNE, H.; CHERY, C.C.; BORDIN, G. & RODRIGUEZ, A. R. “Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material” *J. Chromatogr. A*, **976**: 409, 2002.

132. FERRI, T.; COCCIOLI, F.; DE LUCA, C.; CALLEGARI, C. V. & MORABITO, R. “Distribution and speciation of selenium in *Lecythis ollaria* plant” *Microchem. J.*, **78**:195, 2004.

133. HUERTA, V. D.; SANCHEZ, M. L. F. & SANZ-MEDEL, A. “Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures” *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 644, 2004.

134. SIWEK, M.; GALUNSKY, B. & NIEMEYER, B. "Isolation of selenium organic species from antarctic krill after enzymatic hydrolysis" *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**: 737, 2005.
135. GERGELY, V.; KUBACHKA, K. M.; MOUNICOU, S; FODOR, P. & CARUSO, J. A. "Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry" *J. Chromatogr. A*, **1101**: 94, 2006.
136. MOORE, S.; SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. "Chromatography of Amino Acids Sulfonated on Polystyrene Resins" *Anal. Chem.*, **30**: 1185, 1958.
137. SOCHASKI, M. A.; JENKINS, A. J.; LYONS, T. J.; THORPE, S. R. & BAYNES, J. W. "Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Determination of Methionine Sulfoxide in Protein" *Anal. Chem.*, **73**: 4662, 2001.
138. WROBEL, K; KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K. & CARUSO, J. A. "Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts" *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**: 133, 2003.
139. STEFÁNKA, Zs; IPOLYI, I.; DERNOVICS, M. & FODOR, P. "Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples" *Talanta*, **55**: 437, 2001.
140. GILON, N.; ASTRUC, A.; ASTRUC, M. & POTIN-GAUTIER, M. "Selenoamino acid speciation using HPLC-ETAAS following an enzymic hydrolysis of selenoprotein" *Appl. Organomet. Chem.*, **9**: 623, 1995.
141. ENCINAR, J. R.; OUERDANE, L.; BUCHMANN, W.; TORTAJADA, J.; LOBINSKI, R. & SZPUNAR, J. "Identification of Water-Soluble Selenium-Containing Proteins in Selenized Yeast by Size-Exclusion-Reversed-Phase HPLC/ICPMS Followed by MALDI-TOF and Electrospray Q-TOF Mass Spectrometry" *Anal. Chem.*, **75**: 3765, 2003.
142. SHAH, M.; KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, J. C. A.; WUILLOUDA, R. G. & CARUSO, J. A. "Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS" *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 381, 2004.

143. DERNOVICS, M.; STEFÁNKA, Zs & FODOR, P. “Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*” *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**:473, 2002.
144. KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A. & CARUSO, J. A. “HPLC–ICP–MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut” *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**:454, 2002.
145. VOET, D.; VOET, J. G. & PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica*. Trad. De Arthur Germano Fett Neto *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2000.
146. MARZZOCO, A. & TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. 2^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
147. KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G & CARUSO, J. A. “Studies of various elements of nutritional and toxicological interest associated with different molecular weight fractions in Brazil nuts” *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 5773, 2004.
148. PATTHY, M “Explanation of the selectivity differences between reversed-phase ion-pair chromatographic systems containing trifluoroacetate or heptafluorobutyrate as pairing ion” *J. Chromatogr. A*, **660**: 17, 1994.