

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

**“DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE
ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE SELÊNIO EM AMOSTRAS
AGROPECUÁRIAS”**

Aline Fernandes de Oliveira*

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

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*** bolsista: CAPES**

São Carlos - SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48d Oliveira, Aline Fernandes de
Desenvolvimento e aplicação de análise de
especação química de selênio em amostras
agropecuárias / Aline Fernandes de Oliveira. -- São
Carlos : UFSCar, 2016.
101 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Especação química. 2. Selênio. 3. HPLC-ICP-MS.
4. Carne bovina. 5. Ração animal. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Aline Fernandes de Oliveira, realizada em 28/01/2016:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Embrapa

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso
IQSC/USP

Prof. Dr. Bruno Lemos Batista
UFABC

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega
UFSCar

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
UFSCar

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”**

Albert Einstein

*Aos meus pais pelo amor infinito e apoio
em todos os momentos de minha vida*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e força para lutar pelos meus ideais.

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira pela amizade, apoio e confiança depositada em mim. Um grande exemplo de ética, dedicação, profissionalismo e generosidade.

Ao Prof. Dr. Joseph Caruso (*in memoriam*) por ter me recebido com tanto carinho no meu estágio de doutorado sanduiche em Cincinnati, nos EUA. Além dos ensinamentos em química, uma fonte de inspiração e exemplo de gentileza e bondade.

Ao Prof. Dr. Julio Landero pelos ensinamentos e parceria estabelecida no desenvolvimento do meu projeto durante o estágio de doutorado no exterior.

Ao Prof. Dr. Marcus Zanetti da USP, Campus de Pirassununga, pela parceria e fornecimento das amostras de rações animal e carne bovina.

À Dra. Jenny Nelson da Agilent Technologies, Santa Clara nos EUA, pela parceria e concessão dos materiais envolvidos no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. Kevin Kubachka do U.S. FDA Forensic Chemistry Center, Cincinnati nos EUA, pela parceria e concessão de uso de equipamentos utilizados no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e Dr. Edénir R. Pereira Filho pela amizade e pelas inúmeras e valiosas sugestões nas reuniões de grupo ao longo desses quatro anos.

Aos membros e ex-membros do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA) com os quais tive o prazer de conviver pelas conversas, companheirismo e troca de conhecimento. Em especial para a MSc. Claudia Bartolli Pelizaro, Dra. Luana Novaes Santos, Dra. Silmara Rossana Bianchi e Dra. Amália Geiza Gama Pessoa pela convivência, paciência e amizade.

Aos membros do Metallomics Center da Universidade de Cincinnati, nos EUA, pelo apoio e receptividade durante meu estágio no exterior. Em especial para a Anna Donnell, Amberlie Clutterbuck (e Travis Pollard) e Keaton Nahan.

À todos os funcionários do Departamento de Química da UFSCar, em especial às secretárias da Seção de Pós-Graduação em Química (PPGQ): Luciani, Cristina e Ariane, pela presteza e ajuda em inúmeras situações, e aos professores que contribuíram para a minha formação.

À todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste que tiveram qualquer envolvimento e tornaram viável a realização do meu estágio nessa unidade.

Aos meus pais, Eunice e Manoel, que nunca mediram esforços para a minha formação e sempre incentivaram os estudos.

À minha irmã Sueyde pela amizade e companheirismo.

À minha amiga Monise por me escutar e ter sempre palavras de apoio nos momentos que mais necessito.

Aos meus familiares, que tornam minha vida mais leve e especial com tantas conversas e risadas.

Aos amigos de curta ou longa data, que sem dúvida são fundamentais na minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado no país (Processo nº 001/2011) e bolsa de estágio e pesquisa no exterior (Processo nº 99999.014317/2013-03).

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade concedida para a minha formação acadêmica.

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões.

À todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Sinceramente,
muito obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila (<i>Acetonitrile</i>)
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo (<i>Background Equivalent Concentration</i>)
CRC	Cela de colisão e reação (<i>Collision Reaction Cell</i>)
CRMs	Materiais de referência certificados (<i>Certified Reference Materials</i>)
DAD	Detector de foto-diodos (<i>Diode array detector</i>)
DM	Matéria seca (<i>Dry matter</i>)
DV	Valor diário (<i>Daily Value</i>)
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
ETV	Vaporização eletrotérmica (<i>Electrothermal Vaporization</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para a alimentação e agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FNB	Comitê de Alimentos e Nutrição (<i>Food and Nutrition Board</i>)
GPx	Glutaciona peroxidase
HMW	Alta massa molecular (<i>High Molecular Weight</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (<i>High performance liquid chromatography</i>)
ICP	Plasma acoplado indutivamente (<i>Induced coupled plasma</i>)
ICP-MS/MS	Espectrometria de massa com configuração tandem e plasma acoplado indutivamente (<i>Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry</i>)
IP	Íon de pareamento (<i>Ion pairing</i>)
IS	Padrão interno (<i>internal standard</i>)
IT	Armadilha de íons (<i>Ion Trap</i>)
IU	Unidade Internacional (<i>international units</i>), é uma unidade de medida da quantidade de uma substância com base em sua atividade biológica mediada (ou efeitos)
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LMW	Baixa massa molecular (<i>Low Molecular Weight</i>)
LODs	Limites de detecção
LOQs	Limites de quantificação
m/z	Razão massa-carga
MeOH	Metanol
MMW	Média massa molecular (<i>Medium Molecular Weight</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MSC	Se-metilselenocisteína
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (<i>National Institute of Standards and Technology</i>)
NRCC	Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (<i>National Research Council of Canada</i>)
ORS	Sistema de reação octapolar (<i>Octapole Reaction System</i>)
PFA	Perfluoroalcóxi Teflon®
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
Q ₁	Primeiro quadrupolo
Q ₂	Segundo quadrupolo

REEs	Elementos terras-raras
RF Power	Potência de rádio frequência
RSD	Desvio padrão relativo (<i>relative standard deviation</i>)
RP	Fase reversa (<i>reversed phase</i>)
RT	Tempo de retenção (<i>retention time</i>)
SD	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Cromatografia por Exclusão de Tamanho (<i>size exclusion chromatography</i>)
SeCys	Selenocisteína (<i>selenocystein</i>)
SeCys ₂	Selenocistina ou Se-cistina (<i>Seleno-cystine</i>)
SeMet	Selenometionina ou Se-metionina (<i>Selenomethionine</i>)
Se-O-Met	Óxido de selenometionina
SPS2	Sintetase selenofosfato
TMSe	Íon trimetilselênio (Trimethylselenonium ion)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico
TRx	Tioredoxina redutase
UV-vis	Radiação eletromagnética da região do ultravioleta e visível (<i>Ultraviolet-Visible</i>)

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. Selenoproteínas nos mamíferos e as suas funções.....	6
TABELA 2.2. Alguns alimentos como fonte de selênio.....	7
TABELA 2.3. Valores recomendados de consumo diário de selênio de acordo com cada agência reguladora ($\mu\text{g Se dia}^{-1}$).....	8
TABELA 2.4. Valores máximos toleráveis de selênio ($\mu\text{g dia}^{-1}$).....	8
TABELA 2.5. Estratégias de preparo de amostras e conclusões obtidas no desenvolvimento de métodos de especiação química de selênio em diferentes matrizes por HPLC.....	21
TABELA 3.1. Possíveis interferentes dos isótopos ^{77}Se , ^{78}Se e ^{82}Se	26
TABELA 3.2. Parâmetros instrumentais para o ICP-MS/MS.....	31
TABELA 3.3. Programa de aquecimento no forno de micro-ondas.....	32
TABELA 3.4. Resultados das análises dos CRMs por ICP-MS/MS.....	45
TABELA 4.1. Condições operacionais do HPLC e do ICP-MS para análise de SEC e especiação química de Se.....	53
TABELA 4.2. Concentração de selênio total em matéria seca (mg kg^{-1}) de ração e carne bovina determinada por ICP-MS.....	55
TABELA 4.3. Teste de recuperação com e sem coluna cromatográfica de fase reversa.....	63
TABELA 4.4. Porcentagens de recuperação da adição de padrão de espécies de selênio ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de rações e CRM de levedura (SELM-1) para RP-ICP-MS, e soma das porcentagens de cada espécie.....	65
TABELA 4.5. Porcentagens de recuperação da adição de padrão de espécies de selênio ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de carne bovina e CRM de fígado bovino (NIST 1577b) para RP-ICP-MS, e soma das porcentagens de cada espécie.....	67
TABELA 5.1. Concentrações de selênio determinados (mg kg^{-1}) e rotulados para rações animal e material de referência certificado de farinha de arroz (NIST SRM 1568b) e levedura selenizada (NRC SELM-1).....	76
TABELA 5.2. Eficiência de extração de selênio das amostras de ração animal para diferentes extratores.....	79

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1.** Diagrama de consumo de selênio ($\mu\text{g dia}^{-1}$): essencialidade, deficiência e toxicidade. Modificado de KUBACHKA, 2015. 9
- FIGURA 2.2.** Mecanismo metabólico de selênio da dieta de humanos. SeMet, selenometionina; SeCys, selenocisteína; GSSESG, selenodiglutationa. Modificado de RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M., 2008. 11
- FIGURA 2.3.** Processos ocorridos no plasma, no qual M é o analito e A é um ânion. Modificado de Thomas, 2002. 14
- FIGURA 3.1.** Representação do transporte de íons $^{80}\text{Se}^+$ e o destino dos outros íons transportados entre o Q_1 e Q_2 (Modificado de Agilent Technologies). 30
- FIGURA 3.2.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se. 34
- FIGURA 3.3.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se + $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Gd. 35
- FIGURA 3.4.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se + $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Dy. 36
- FIGURA 3.5.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se na presença de elementos que levem à formação de possíveis interferentes numa concentração 100x maior. 37
- FIGURA 3.6.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se + $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Ca. 38
- FIGURA 3.7.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ Se + $0,1 \% v v^{-1}$ HBr. 39
- FIGURA 3.8.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ Se + $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ Cu. 40
- FIGURA 3.9.** Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ Se + $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ Zn. 41
- FIGURA 3.10.** Curvas de calibração para Se por ICP-MS/MS usando H_2 a $3,7 \text{ mL min}^{-1}$ na ORS e Ge como padrão interno monitorando-se as m/z (Q_1 , Q_2): (a) 78, 78 e (b) 80, 80. 44
- FIGURA 4.1.** Cromatograma de SEC-UV-Vis dos padrões de proteínas: (1) tiroglobulina bovina (670 kDa) (RT= 11,6), (2) Y-globulina (158 kDa) (RT= 13,1), (3) ovoalbumina (44 kDa) (RT= 17,5), (4) mioglobina equina (17 kDa) (20,1) e (5) vitamina B12 (1,35 kDa) (RT= 20,9). 52

FIGURA 4.2. Cromatogramas de SEC-UV-ICP-MS para $\lambda = 280$ e $m/z = 78$ e nm para amostras de (a) ração animal e (b) carne bovina, respectivamente. 57

FIGURA 4.3. Cromatogramas de RP-ICP-MS para soluções padrão de espécies de Se $20 \mu\text{g L}^{-1}$: (a) fase móvel, (b) SeCys₂ (RT = 2,3), (c) SeMet (RT = 3,9), (d) Se(IV) (RT = 4,6), (e) Se-O-Met (RT = 5,1), (f) Se(VI) (RT = 21,1), e (g) solução contendo padrões de Se em meio de fase móvel: SeCys₂ (RT₁ = 2,3), SeMet (RT₂ = 3,9), Se(IV) (RT₃ = 4,6), Se-O-Met (RT₄ = 5,2), e Se(VI) (RT₅ = 20,3). 60

FIGURA 4.4. Curvas de calibração dos padrões de Se obtidas por RP-ICP-MS (2 to $50 \mu\text{g L}^{-1}$): (a) SeCys₂, (b) SeMet, (c) Se(IV), (d) Se-O-Met, e (e) Se(VI). 62

FIGURA 4.5. Cromatogramas obtidos por RP-ICP-MS da análise de especificação de selênio das amostras de rações: (a) ração controle, (b) ração + óleo de canola, (c) ração + antioxidantes, (d) ração + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM SELM-1. Os RTs estão baseados na separação das espécies de Se apresentado na Figura 3.3 64

FIGURA 4.6. Cromatogramas obtidos por RP-ICP-MS da análise de especificação de selênio das amostras de carne bovina: (a) carne controle, (b) carne + óleo de canola, (c) carne + antioxidantes, (d) carne + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM de fígado bovino. Os RTs estão baseados na separação das espécies de Se apresentado na Figura 3.3 66

FIGURA 5.1. Mapa dos EUA da distribuição de selênio em amostras de solo coletado em diferentes localidades. Fonte: http://mrddata.usgs.gov/geochem/map/image/lower48/se_aa.jpg 70

FIGURA 5.2. Cromatogramas de SEC-ICP-MS das amostras de ração animal, sendo: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte. 78

FIGURA 5.3. Cromatogramas de RP-ICP-MS para as amostras de: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte. 80

FIGURA A1. Cromatogramas de especificação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de ração animal com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) ração controle, (b) ração + óleo de canola, (c) ração + antioxidantes, (d) ração + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM SELM-1. 91

FIGURA A2. Cromatogramas de especificação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de carne bovina com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) carne controle, (b) carne + óleo de canola, (c) carne + antioxidantes, (d) carne + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) SRM bovine liver. 92

FIGURA B1. Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para frangos (Ração 1). 93

FIGURA B2. Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para suínos (Ração 2). 94

- FIGURA B3.** Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para frangos (Ração 3).
..... 95
- FIGURA B4.** Foto do rótulo contido na embalagem de premix para suínos (Ração 4). 96
- FIGURA B5.** Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para suínos (Ração 5).97
- FIGURA B6.** Foto do rótulo contido na embalagem de sal mineral para gado de corte (Ração 6).
..... 98
- FIGURA C1.** Cromatogramas de especiação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de ração animal com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte. 99

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE SELÊNIO EM AMOSTRAS AGROPECUÁRIAS. O selênio é um elemento essencial na nutrição animal e está associado ao funcionamento saudável dos sistemas músculo-esquelético, reprodutivo e imunológico. O valor de ingestão diária recomendado é estreito e baixas concentrações de Se são necessárias. A fim de suprir as necessidades na alimentação animal, a prática de suplementação tem crescido, pois a deficiência de Se em solos de diversos países é comum. Essa suplementação é feita com o emprego de Se orgânico pela sua baixa toxicidade e alta biodisponibilidade para o animal. O presente estudo teve como objetivo a especiação de Se orgânico (como a Se-metionina e seu produto de oxidação, Se-O-metionina, e a Se-cistina) em amostras de ração animal e carne bovina utilizando HPLC acoplado ao ICP-MS/MS. As espécies inorgânicas, selenato (Se(VI)) e selenito (Se(IV)), as quais podem ser tóxicas mesmo em concentrações baixas também foram determinadas no método. A otimização dos parâmetros instrumentais e a avaliação do emprego de hidrogênio como gás de reação com os interferentes para determinação da $m/z = 80$ para monitoramento do isótopo mais abundante de Se foram realizadas, sendo a capacidade analítica demonstrada com o emprego de soluções padrão de Se na presença de possíveis interferentes e com o emprego de CRMs de fígado bovino e fígado de peixe, e a exatidão calculada foi de 89 e 97 %, respectivamente. A especiação química de Se foi aplicada a amostras provenientes de experimento com 48 animais (divididos em quatro grupos) alimentados com ração enriquecida de Se orgânico durante 82 dias. Os grupos foram: (1) ração animal (controle); (2) ração animal + antioxidantes (Se orgânico + vitamina E); (3) ração animal + óleo de canola e (4) ração animal + antioxidantes (óleo de canola + Se orgânico + vitamina E). O método de preparo de amostra para matrizes complexas, como ração animal e carne bovina foi otimizado com uma mistura de enzimas. Uma boa separação foi obtida e as espécies de Se foram facilmente identificadas. O método foi considerado robusto e tem sido aplicado para diferentes tipos de amostras com recuperações > 65%. Os resultados inferem que Se-metionina é a espécie majoritária nas amostras de rações animal e carne bovina. O método desenvolvido foi aplicado a extratos de ração animal comercializáveis de suínos, aves e bovinos, para verificação da veracidade quanto às espécies sugeridas nos rótulos das embalagens. De forma geral, as amostras atenderam a legislação perante aos quesitos avaliados.

Palavras-chave: especiação química, selênio, HPLC-ICP-MS, carne bovina, ração animal

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF SELENIUM SPECIATION ANALYSIS IN AGRICULTURAL SAMPLES. Selenium is essential in animal nutrition; it ensures proper functioning of musculoskeletal, reproductive, and immune system. The intake requirement range for Se is narrow and low levels of Se are required. In order to supply the demand, the animal feed supplementation has grown, considering the knowing of Se deficiency in soils from different countries. This supplementation is made with the use of organoselenium, because of its low toxicity and high bioavailability to the animal. This study targets organoselenium speciation (of Se-methionine and its product of oxidation, Se-O-methionine, and Se-cystine) in animal feed samples and beef using HPLC coupled to ICP-MS/MS. Inorganic species, selenate (Se(VI)) and selenite (Se(IV)), which could be toxic even at low levels, were also determined. The instrumental parameters were optimized and the use of hydrogen as reaction gas to remove the $m/z=80$ (Se most abundant isotope) interferences was evaluated, and it demonstrated analytical capacity by using Se standard solutions in presence of interfering elements and CRMs (bovine liver and fish liver) digests indicated a calculated accuracy of 89 and 97 %, respectively. The Se chemical speciation method was applied in samples provided from an experiment with 48 animals (divided into four groups) were fed with Se enriched feed for 82 days. The groups are: (1) cattle feed (control); (2) cattle feed + antioxidants (organoselenium + vitamin E); (3) cattle feed + canola oil and (4) cattle feed + antioxidants (canola oil + organoselenium + vitamin E). A sample preparation method development for complex matrices like animal feed and beef was optimized with an enzyme cocktail. A good separation was obtained and Se species could be easily identified. The method is robust and has been applied for different types of samples with recoveries > 65%. The results infer that a majority of Se in both feed and beef present as Se-methionine. The same method was used to evaluate commercialized feed of swine, poultry and bovine in order to evaluate if the concentrations and species are in agreement with labels. In general the samples attend to legislation according to the evaluated parameters.

Keywords: speciation analysis; selenium; HPLC-ICP-MS; beef; animal feed

SUMÁRIO

1. Introdução	2
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Selênio	5
2.2. ICP-MS.....	11
2.3. HPLC e o acoplamento HPLC-ICP-MS	17
3. Hidrogênio como gás de reação para determinação do isótopo ⁸⁰Se em amostras biológicas	25
3.1. Introdução	25
3.2. Objetivo	30
3.3. Material e métodos	30
3.3.1. Instrumentação	30
3.3.2. Reagentes e soluções.....	31
3.3.3. Preparo das amostras.....	32
3.4. Resultados e discussão.....	32
3.5. Conclusões.....	45
4. Desenvolvimento e aplicação de método de especiação química de selênio em amostras de interesse agropecuário	47
4.1. Introdução	47
4.2. Objetivo	48
4.3. Material e métodos	48
4.3.1. Amostras	48
4.3.2. Reagentes e soluções.....	49
4.3.3. Instrumentação	51
4.3.4. Determinação do teor total de selênio.....	53
4.3.5. Extração para análise de SEC	54
4.3.6. Extração para análise de especiação química	54
4.4. Resultados e discussão.....	55
4.4.1. Determinação do teor total.....	55
4.4.2. Caracterização das amostras por LC-SEC	56
4.4.3. Extração de selênio e análise de especiação química.....	58
4.5. Conclusões.....	68

5. Especificação de selênio em rações animais comercializáveis (para aves, suínos e bovinos).	70
5.1. Introdução	70
5.2. Objetivos	72
5.3. Material e métodos	73
5.3.1. Amostras	73
5.3.2. Reagentes e soluções.....	74
5.3.3. Instrumentação	74
5.3.4. Determinação do teor total de selênio.....	74
5.3.5. Extração de proteínas solúveis para análise de SEC	74
5.3.6. Extração de selênio para análise de especificação química.....	74
5.4. Resultados e discussão.....	74
5.4.1. Determinação do teor total	74
5.4.2. Caracterização das amostras por SEC	77
5.4.3. Extração de selênio e análise de especificação química.....	79
5.5. Conclusões.....	81
6. Conclusões gerais	83
7. Referências	85
Apêndice A	91
Apêndice B	93
Apêndice C	99

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Alguns elementos são considerados essenciais para o desenvolvimento normal dos seres vivos, mas alguns, mesmo em baixíssimas concentrações, ou concentrações-traço, são tóxicos e podem desencadear diversos problemas de saúde. Dentre os elementos-traço podem ser encontrados elementos essenciais e nutritivos (Fe, Cu, I, Co, Mn, Zn, Cr, Ni, Si, F, Mo e Se), os não essenciais, mas não tóxicos (a depender da concentração e forma química) (Al, B e Sn) e os não nutritivos, mas tóxicos (Hg, Pb, As, Cd e Sb), dependendo da espécie química e da concentração presentes na amostra (RUZIK, 2012).

O selênio, por sua vez, está relacionado a diversas funções vitais e de prevenção de doenças, mas também pode ter comportamento ambivalente, ou seja, atuar como essencial ou altamente tóxico, a depender das espécies encontradas na matriz, do estado de oxidação e da concentração (GOLDHABER, 2003; FORDYCE, 2005, 2007).

Os alimentos são a principal fonte de selênio para os seres vivos e, de acordo com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (U.S. HHS), as castanhas, alguns peixes e frutos do mar e a carne bovina estão entre as principais fontes de Se, sendo que esses alimentos podem prover até 40 % da dose diária recomendada (EUA, 2013b). De acordo com alguns órgãos reguladores a dose diária recomendada (DV, do inglês, *daily value*) para humanos varia bastante a depender da idade, gênero e período de lactação, no caso de mulheres que estejam amamentando.

Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais tais como ferro e selênio, a carne é um das commodities mais importantes no mercado de exportações brasileiras. O Brasil já é o maior exportador de carnes do mundo, seguido pelos Estados Unidos (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (SNA), 2015). Somente em 2014 foram exportadas em torno de 1,5 milhão de toneladas de carne, sendo que desse total, cerca de 80 % corresponde à carne *in natura* (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE CARNES, 2012, 2015). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) espera-se que até 2020 a produção nacional de carnes supra 44,5 % do mercado mundial, indicando que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carne bovina e passar a ser o maior produtor de carne

bovina do mundo (BRASIL, 2015, SNA, 2015). Portanto, para manter sua posição ou ampliar os negócios é necessário se adequar às exigências estabelecidas pelos importadores e certificar a qualidade deste bem de consumo.

A suplementação animal é uma prática que tem aumentado bastante em locais onde algumas vitaminas e minerais não ocorrem naturalmente. Além disso, em alguns casos, a suplementação animal pode ocorrer com o objetivo de aumentar a concentração de alguma vitamina e mineral para o consumidor final, agregando valor àquele produto.

Um dos parâmetros de avaliação da qualidade da carne utilizado pelos órgãos reguladores de saúde é o teor total de elementos. No entanto, sabe-se que apenas esse dado não fornece informações sobre a biodisponibilidade, essencialidade ou toxicidade dos elementos nos organismos vivos.

A especiação química é uma ferramenta analítica que conquistou credibilidade no meio científico. Envolve a separação e a determinação das formas de um elemento. A grande vantagem em relação à determinação mais comumente utilizada, ou seja, o teor total da espécie química, é que através da especiação pode-se obter informações a respeito da forma como o elemento se encontra na matriz, estado de oxidação, bem como formas orgânicas e inorgânicas (TEMPLETON et al., 2000). Dessa forma, a motivação deste trabalho dá-se diante das inúmeras questões supracitadas e foi dividido em três partes. Um primeiro estudo avaliou as condições instrumentais para a realização dos experimentos de especiação química. Um segundo estudo verificou se a concentração de Se adicionada à ração animal se enquadra na legislação disposta pelas agências reguladoras, como o selênio adicionado à ração (na forma de Se-orgânico) é metabolizado pelo animal e quais espécies estão presentes na carne bovina. Por fim, o método de especiação química de Se desenvolvido foi aplicado em rações animal (de aves, suínos e de bovinos), a fim de verificar as espécies presentes e avaliar se essas atendem às normas no que diz respeito à descrição apresentada nas embalagens (ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS, 2010; EUA, 2015).

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Selênio

O selênio (do grego σελήνη *selene* que significa “lua”) foi descoberto em 1817 por Jöns Jakob Berzelius numa planta de produção de ácido sulfúrico, que ao encontrar uma pirita e queimá-la percebeu que não tinha odor de arsênio como se acreditava, mas mais semelhante ao odor de um composto de telúrio. Mais adiante foi revelado o novo elemento (Se) que levou nome pela sua semelhança com o telúrio, cujo nome significa Terra (TROFAST, 2011; MISTRY et al., 2012). O comportamento desse não-metal, alocado na família VI da tabela periódica é intermediário em relação ao dos seus adjacentes, os calcogênios enxofre e telúrio. No início acreditava-se que o Se era um elemento tóxico e somente em 1957 foi reconhecida sua essencialidade para vertebrados (MISTRY et al., 2012; WEEKLEY, C. M.; HARRIS, H. H., 2013). Em 1973 foi identificada a primeira selenoproteína, a glutathiona peroxidase (GPx). Atualmente existem pelo menos 25 selenoproteínas (Tabela 2.1) identificadas no corpo humano que causam uma série de efeitos pleiotrópicos, ou seja, codificam os genes humanos que estão diretamente ligados a múltiplas funções metabólicas do organismo devido a seu comportamento estrutural e enzimático que variam desde anti-inflamatório, antioxidante até a síntese de hormônios (RAYMAN, 2012).

TABELA 2.1. Selenoproteínas nos mamíferos e as suas funções.

Selenoproteína	Função
Glutationa peroxidase (GPx)	Enzimas antioxidantes
GPx1	Antioxidante no citosol celular; reserva de selênio?
GPx2	Antioxidante no trato gastrointestinal
GPx3	Antioxidante no espaço extracelular e plasma
GPx4	Antioxidante em membranas; proteína estrutural nos espermatozoides; apoptose?
GPx5	Desconhecida
GPx6	Homóloga a GPx1?
Tioredoxina redutase (TRx)	Funções múltiplas incluindo a oxiredutase ditiol-dissulfídrica. Destoxifica peroxidases, reduz tioredoxina (controla o crescimento celular); mantém o estado redox dos fatores de transcrição
TR1	Majoritariamente citosólica, ubíquo
TR2	Expressa por células germinativas nos testículos
TR3	Mitocondrial, ubíquo
Iodotironinas desidases	
Tipos D1 e D2	Converte a tiroxina (T4) para a bioativa 3,5,3'-triiodotironina (T3)
Tipos D1 e D3	Converte a tiroxina (T4) para a 3',3',5' T3 reversa bioinactiva
Selenoproteína P	Proteína de transporte de selênio. Antioxidante no endotélio
Selenoproteína W	Antioxidante
Sintetase selenofosfato (SPS2)	Síntese de selenofosfato para a síntese de selenoproteínas
Selenoproteínas de 15 kDa (Sep 15)	Proteção anticâncer?
Selenoproteínas H, I, K, M, N, O, R, S, T, V	Função em grande parte desconhecida

Adaptado de BECKETT E ARTHUR, 2005.

O Se entra na cadeia alimentar através das plantas, que por sua vez absorvem o mineral do solo. Para os humanos esse elemento é incorporado ao organismo basicamente pela ingestão de alimentos ricos em selenoproteínas. De acordo com o U.S. HHS, dentre os alimentos ricos em selênio estão castanhas do Brasil, alguns peixes e frutos do mar e carne bovina (Tabela 2.2) (EUA, 2013b).

TABELA 2.2. Alguns alimentos como fonte de selênio.

Alimento	Porção aproximada	µg Se porção⁻¹	Porcentagem do DV
Castanha do Brasil	30 g (6-8 unidades)	544	777
Atum grelhado	85 g	92	131
Sardinha enlatada	85 g	45	64
Presunto assado	85 g	42	60
Camarão	85 g	40	57
Carne (músculo) bovina assada	85 g	33	47
Fígado bovino grelhado	85 g	28	40
Peito de frango assada	85 g	22	31
Arroz integral cozido	1 xícara	19	27
Ovo cozido grande	1 unidade	15	21
Leite, 1 % gordura	1 xícara	8	11
Castanha de cajú torrada	30 g	3	4
Banana cortada	1 xícara	2	3
Cenoura crua	1 xícara	0	0
Alface	1 xícara	0	0

Modificado de U.S. HHS (EUA, 2013) baseado no valor diário (DV) de 70 µg dia⁻¹ recomendado pelo U.S. FDA para adultos e crianças com 4 anos ou mais.

Observa-se na Tabela 2.2 que os tecidos animais são as principais fontes de selênio, com exceção da castanha do Brasil extraída da região de Belém e Manaus, que possui uma alta concentração desse elemento devido à localização geográfica das plantações, onde o solo é rico em Se (CHANG et al., 1995). Os alimentos de origem vegetal possuem baixíssimas concentrações de Se, quando não nulas.

O grande problema associado ao Se é a estreita faixa de ingestão recomendada, que é um comportamento bastante peculiar desse elemento. As agências regulamentadoras, no entanto, apresentam divergências quanto aos limites recomendáveis de selênio para o consumo humano, como apresentado na Tabela 2.3.

TABELA 2.3. Valores recomendados de consumo diário de selênio de acordo com cada agência regulamentadora ($\mu\text{g Se dia}^{-1}$).

Idade	Homens		Mulheres		Grávidas		Lactantes	
	FAO*	FNB**	FAO	FNB	FAO	FNB	FAO	FNB
Nascimento até 6 meses	6	15	6	15	-	-	-	-
7 - 12 meses	10	20	10	20	-	-	-	-
1 - 3 anos	17	20	17	20	-	-	-	-
4-6 anos	22	-	22	-	-	-	-	-
4 – 8 anos	-	30	-	30	-	-	-	-
7-9 anos	21	-	21	-	-	-	-	-
9 – 13 anos	-	40	-	40	-	-	-	-
10-18 anos	32	-	26	-	-	-	-	-
14 – 18 anos	-	55	-	55	28-30	60	35-42	70
19 – 50 anos	-	55	-	55	28-30	60	35-42	70
19 – 65 anos	34	-	26	-	-	-	-	-
51+ anos	-	55	-	55	-	-	-	-
65+ anos	33	-	-	25	-	-	-	-

* Food and Agriculture Organization for World Health Organization (FAO/OMS), 2001.

** Food and Nutrition Board (FNB), 2000.

Apesar das diferenças encontradas entre os valores recomendados, esses são relativamente baixos, reforçando a ideia da essencialidade desse elemento em baixas concentrações. No Brasil, a ANVISA adota os valores sugeridos pelo FAO/OMS (BRASIL, 2005). Por outro lado, o limite máximo também apresenta diferenças entre os órgãos reguladores. Nos EUA, o limite diário de selênio não deve exceder 400 μg (EUA, 2003b; GOLDBERGER, 2003; PEDRERO; MADRID, 2009), no entanto na Comunidade Europeia esse valor é de 300 μg (BÉLGICA, 2000). Esses valores estão diretamente relacionados à concentração de Se no solo, ou seja, quanto maior a concentração de Se no solo onde os alimentos são cultivados, maior é a ingestão do mesmo pela população local. A FNB também propõe valores guia para o consumo máximo tolerável de selênio, como mostrado na Tabela 2.4.

TABELA 2.4. Valores máximos toleráveis de selênio ($\mu\text{g dia}^{-1}$).

Idade	Homens	Mulheres	Grávidas	Lactantes
Nascimento até 6 meses	45	45	-	-
7 – 12 meses	60	60	-	-
1 – 3 anos	90	90	-	-
4 – 8 anos	150	150	-	-
9 – 13 anos	280	280	-	-
14 – 18 anos	400	400	400	400
19 + anos	400	400	400	400

Institute of Medicine, 2000.

Diversos trabalhos na literatura assumem, portanto, que a ingestão de selênio pode variar entre uma dose diária deficitária menor que 40 μg até níveis tóxicos superiores a 400 μg , como apontado, por exemplo, por Forcyde (2007). Como citado anteriormente, tanto altas doses de selênio, como o baixíssimo consumo desse elemento pode desencadear sérios problemas para o organismo de humanos, como mostrado na Figura 2.1.

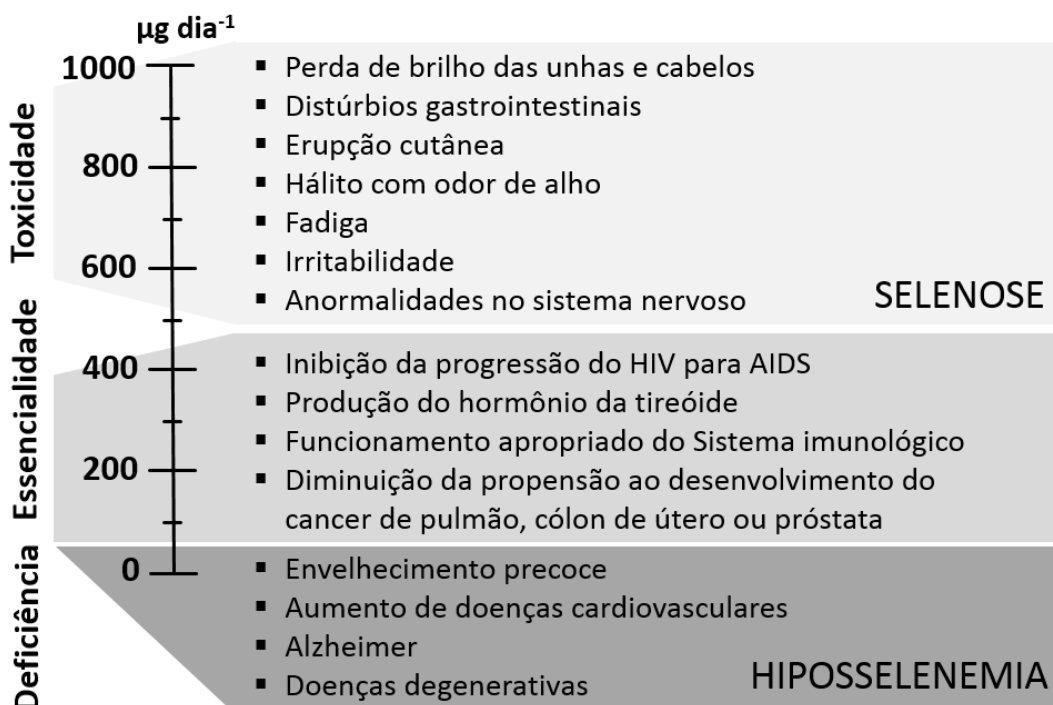


FIGURA 2.1. Diagrama de consumo de selênio ($\mu\text{g dia}^{-1}$): essencialidade, deficiência e toxicidade. Modificado de KUBACHKA, 2015.

Regiões vulcânicas, solos ácidos e com altas concentrações de alumínio e ferro apresentam baixa absorção de Se pelas plantas. Para os animais, casos de prejuízo em larga escala foram notificados em países europeus, nos quais o rebanho de gado apresentou insuficiência reprodutiva, crescimento irregular, doença do músculo branco (também conhecida como Degeneração Muscular Nutricional, Doença do Cordeiro Rígido, Distrofia Muscular Nutricional, ou ainda Miopatia Nutricional), que é uma doença que atinge principalmente cordeiros e bezerros, envolve um conjunto de alterações

bioquímicas que ocorre nos músculos em função da deficiência de selênio, de vitamina E ou de ambos e que levam a debilidade muscular, tremores ou até mesmo à morte súbita do animal (MAAS et al., 2006).

Também está bem estabelecida na literatura a importância do Se na agropecuária para uma reprodução bem sucedida, pois esse elemento é um dos responsáveis pela prevenção do aborto espontâneo ou perda prematura. O selênio também é responsável pela fertilidade masculina, por ser essencial para a biossíntese de testosterona e pela formação e desenvolvimento saudável do espermatozoide. Animais com alimentação pobre em Se apresentam anormalidades no esperma que estão relacionadas à mobilidade do mesmo, apresentando tendência de quebra da cauda e diminuindo as chances de fertilização (MISTRY, 2012).

As doenças citadas anteriormente acarretam enormes prejuízos econômicos. Portanto, a prática da suplementação de Se nas rações animais, adição de fertilizantes enriquecidos com Se nos pastos, mistura de minerais ou medicamentos passou a ser adotada pelos criadores e, em casos extremos, se tornaram obrigatórias, como foi o caso da Finlândia. A partir de 1985 foi implementado um programa de fertilização com adição de selênio no solo e os resultados indicaram um aumento da ingestão desse elemento de 26 para 56 $\mu\text{g dia}^{-1}$ da população local, solucionando a questão da deficiência de Se (KESKINEN, 2012; FAO/OMS, 2001).

Outra vertente questiona a biodisponibilidade das espécies de selênio para o organismo. Sabe-se que a absorção de Se é menor em ruminantes devido às modificações que ocorrem no rúmen do animal. A suplementação desses animais a partir de fontes de Se orgânico como selenometionina e levedura selenizada introduzida na alimentação do animal aumentam a concentração de Se nos tecidos e no leite do animal quando comparadas aos resultados obtidos para os mesmos tecidos após adição de fonte de selênio inorgânico na dieta (SPEARS, 2003).

O oposto ocorre para animais não-ruminantes, para os quais as fontes de selênio inorgânico são facilmente absorvidas se comparadas às fontes orgânicas de selênio. No entanto, também há estudos que indicam que o Se administrado como selenometionina é retido por um tempo mais longo que o selenito, mantendo as atividades das selenoenzimas durante o processo de depleção desse mineral por longos

períodos de tempo (RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M., 2008). A selenometionina é mais efetiva no aumento do status de Se por não ser necessariamente incorporada em proteínas (e.g. hemoglobina, albumina) no lugar da metionina que está diretamente ligada à similaridade das propriedades entre selênio e enxofre, os quais compõem esses aminoácidos, respectivamente. Todavia, a selenometionina é menos biodisponível que o selenito ou o selenato, uma vez que esses precisam apenas do seleneto para formar um selenofosfato, um dos precursores da selenocisteína que leva à formação de selenoproteínas (RAYMAN, 2000). Muitos trabalhos propõem rotas de metabolismo do selênio em suas diferentes formas proveniente da dieta, suas vias de excreção e assimilação, como mostrado na Figura 2.2.

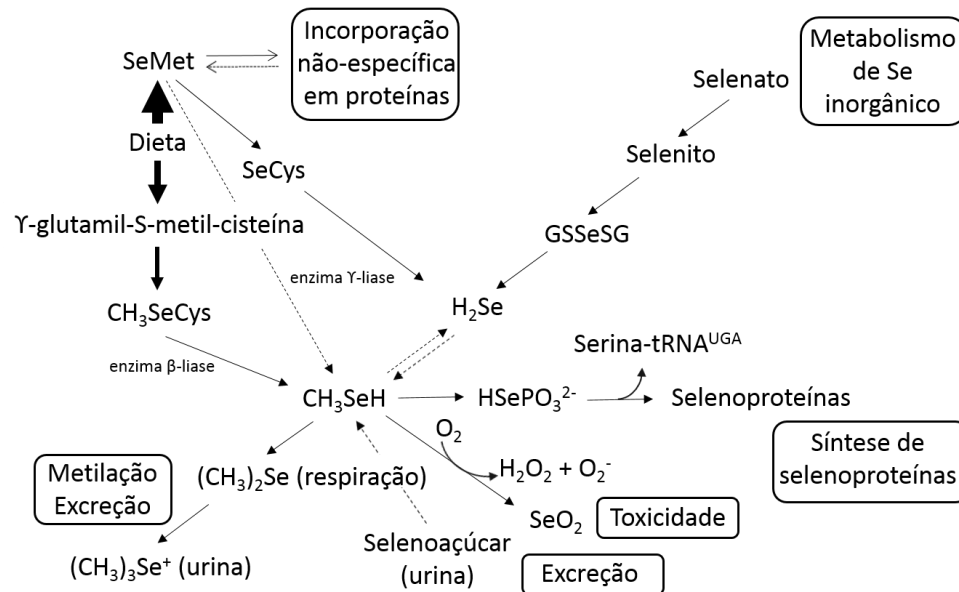


FIGURA 2.2. Mecanismo metabólico de selênio da dieta de humanos. SeMet, selenometionina; SeCys, selenocisteína; GSSeSG, selenodiglutatona. Modificado de RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M., 2008.

2.2. ICP-MS

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado teve grande aceitação no mercado devido à sua capacidade de análise multi-elementar (sequencial), medidas da razão isotópica, baixos limites de detecção, baixo sinal de fundo espectral, ampla faixa linear, elevada frequência analítica, alta eficiência na

geração de íons monovalentes e espectros de massas simples e de fácil interpretação (THOMAS, 2013).

Há diferentes modelos comerciais, mas de forma geral o ICP-MS é composto por um sistema de introdução de amostra que inclui um nebulizador, uma câmara de nebulização e um tubo de quartzo, interface que une o ICP ao MS, sistema de focalização de íons positivos e de separação de massas e detector. O argônio é o gás usado para a formação e a manutenção do plasma por inúmeros motivos. Dentre esses está sua elevada energia, capacidade de ionizar quase todos os elementos da tabela periódica, incluindo os elementos dificilmente ionizáveis, tais como As, Se, P e S. Também possui condutividade térmica alta suficiente para transferir calor das extremidades para a região central do plasma, mas não tão alta a ponto de sofrer com o resfriamento da atmosfera circundante, e ainda tem resistividade elétrica adequada para dissipação da potência de radiofrequência, responsável pela manutenção do plasma. O custo pode ser considerado baixo considerando-se a disponibilidade quando comparado a outros gases nobres (como He, Ne, Kr ou Xe), a pureza obtida e a inércia química (MONTASER, 1998; THOMAS, 2013).

O sistema de introdução de amostra pode variar bastante, a depender do estado físico da amostra. Como exemplo, para amostras sólidas pode ser feita ablação por laser, centelha, ou ETV (do inglês, *electrothermal vaporization*), enquanto que para amostras gasosas a introdução no plasma pode ser feita por geração de hidretos, vapor de Hg e cromatografia gasosa, dentre outros. No entanto, o convencional é a introdução de amostras líquidas fazendo-se uso de diferentes nebulizadores, tais como: pneumáticos, ultrassônicos, micronebulizadores e também por cromatografia líquida (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*). Nos nebulizadores é formado um fino aerossol da solução introduzida (THOMAS, 2013).

O aerossol é formado quando o gás (argônio) que é inserido sob alta velocidade passa sobre a superfície do líquido (amostra ou solução de calibração), quebrando-as e formando gotículas. Essas microgotas, formadas na câmara de nebulização, são selecionadas, sendo que gotas maiores são descartadas, o que suaviza os pulsos de entrada de amostra causados pela bomba peristáltica, tornando a introdução de amostras no plasma contínua. Dentre as diversas opções existentes para

câmaras de nebulização, dois tipos se destacam: duplo passo e ciclônica. A câmara de duplo passo é a mais comum, pois alcança uma melhor distribuição no tamanho das partículas. Em alguns equipamentos de ICP-MS a câmara de nebulização está acoplada ao sistema Peltier, que é um sistema externo de resfriamento (que funciona entre 2 e 5 °C), que gera estabilidade térmica de amostras e minimiza a quantidade de solvente que chega no plasma. Além desses, há outros benefícios, como a minimização da formação de óxidos e o favorecimento da aspiração de solventes orgânicos (THOMAS, 2013).

O grande problema associado aos sistemas de introdução é a eficiência da condução da amostra, que deve ser representada na sua totalidade, até atingir o plasma, sem desestabilizá-lo ou extingui-lo.

O tubo de quartzo, localizado na sequência do nebulizador e da câmara de nebulização possui três tubos concêntricos, cada um com uma entrada independente de gás, com funções diferentes. No tubo externo o gás Ar é introduzido formando o vórtice de Reed, que serve como isolante térmico e para a centralização do plasma. Pelo tubo intermediário é introduzido o gás auxiliar, que direciona e posiciona o plasma. E no tubo interno é feita a introdução da amostra nebulizada com argônio (MONTASER, 1998; THOMAS, 2013).

A formação do plasma é feita através da geração de um campo magnético alternado aplicado numa bobina de cobre que circunda o tubo de quartzo, preenchido por argônio que passa através do tubo e, com uma descarga elétrica, o plasma é iniciado. Para a estabilização do plasma uma potência de radiofrequência é aplicada constantemente. O plasma, que é um gás parcialmente ionizado (nesse caso o argônio), possui átomos no estado normal e íons de argônio (Ar^+), bem como elétrons livres, com densidade eletrônica de $\sim 10^{15} \text{ e}^- \text{ cm}^{-3}$ e 15,8 eV de energia (THOMAS, 2013). Na Figura 2.3 estão apresentados os processos pelos quais o analito é submetido quando atinge o plasma.

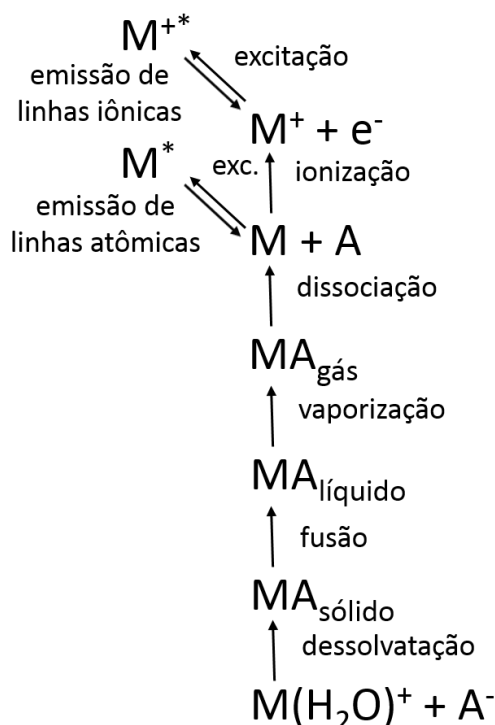


FIGURA 2.3. Processos ocorridos no plasma, no qual M é o analito e A é um ânion. Modificado de Thomas, 2002.

Os processos que ocorrem no plasma são a dessolvatação, fusão, vaporização, dissociação e ionização. Dentre os parâmetros que influenciam os processos ocorridos no plasma estão a potência de rádio-frequência aplicada, a vazão do gás de nebulização e a profundidade de amostragem (THOMAS, 2002).

O acoplamento do plasma (ICP), que é a fonte de íons, a um espectrômetro de massas (MS), que é um separador de íons pela sua razão massa-carga (m/z) se dá numa transição bastante instável para os íons, que migram de uma zona sob pressão atmosférica, para uma zona de pressão praticamente nula, o vácuo. Para corrigir os efeitos de dispersão da nuvem eletrônica (*ion beam*), chamado de efeito de carga espacial, há estágios graduais de redução de pressão; primeiro o feixe passa pelo primeiro cone de amostragem, que possui um pequeno orifício (*Sampler*), na sequência passa pelo outro cone que possui um orifício ainda mais reduzido (*Skimmer*) e depois por uma sequência de lentes iônicas que focalizam e direcionam o feixe em direção ao quadrupolo. O vácuo, no entanto, tem papel fundamental, evitando colisões que alteram

a trajetória, podendo acarretar em transferência de energia e desencadeando reações químicas indesejáveis (THOMAS, 2013).

Dentre os equipamentos de ICP-MS comerciais convencionais são disponíveis modelos com um ou dois quadrupolos sequenciais, denominados ICP-MS ou ICP-MS/MS, respectivamente. O quadrupolo é composto por quatro barras circulares ou hiperbólicas de aço inoxidável ou molibdênio, que são carregadas alternadamente, ou seja, duas barras são carregadas positivamente, enquanto as outras duas barras, posicionadas perpendicularmente às demais, são carregadas negativamente. A configuração é montada de forma a que os pólos sejam alternados com uma frequência que favoreça apenas a trajetória de uma m/z , sendo as demais m/z desestabilizadas e lançadas para fora do quadrupolo. O detector é um dinodo multiplicador de elétrons. Quando o íon se choca contra o dinodo são arrancados elétrons, que por sua vez são direcionados para um próximo dinodo, multiplicando os elétrons ao longo de uma sequência de dinodos até que um “pulso” seja detectado (THOMAS, 2013).

Apesar de bastante vantajosa, a técnica também possui alguns inconvenientes como possíveis interferências matriciais e/ou isobáricas, baixa energia de ionização para a determinação de elementos com elevada energia de ionização (e.g. halogênios) e alto custo de aquisição do instrumento. Dentre as interferências matriciais podemos listar a deposição de sais no orifício dos cones, diminuindo o orifício e, conseqüentemente, diminuindo a sensibilidade gradualmente; e a supressão da ionização do analito, em função da carga espacial. Para minimizar o efeito de carga espacial podem-se utilizar estratégias como: diluição das soluções, compatibilização de matriz, método de adição de analito ou o uso de padrão interno (IS). As interferências isobáricas podem ser elementares ou moleculares. No caso das interferências moleculares é comum que haja combinação de átomos de Ar, C, H, O, N, ou seja, os elementos geralmente abundantes no plasma. Esses átomos se recombinaem, totalizando a mesma m/z do analito. Para não sofrer com as interferências isobáricas elementares é recomendável analisar outro isótopo do analito quando possível. No caso das interferências isobáricas moleculares as estratégias são: diluição das soluções, possível uso do plasma frio (*cool plasma*), introdução de gases de colisão ou reação, ou geometria do equipamento, com a introdução de filtro de íons a 90 °C (MONTASER,

1998; TANNER, BARANOV, BANDURA, 2002; BIANCHI, 2011; D'ILIO et al., 2011; THOMAS, 2013).

O uso de padrão interno facilita a correção das interferências matriciais sobre o sinal do analito e a correção é feita através da razão do sinal do analito pelo sinal do padrão interno. A escolha do padrão deve ser baseada nas energias de ionização do IS e do analito, que devem ser similares, quando teoricamente os dois sofreriam os mesmos efeitos de transporte. É recomendável que os átomos (do IS e do analito) tenham tamanhos semelhantes, uma vez que átomos pequenos sofrem mais as interferências de carga espacial. O IS também deve ser um elemento inerte e não deve fazer parte da composição da amostra. A solução do elemento a ser usado como IS é adicionada em concentração constante a todas as soluções de calibração e das amostras. Também deve-se observar se o número de contagens para o analito e do IS têm a mesma ordem de grandeza, pois se o número de contagens para o IS for muito superior haverá um super ajuste do sinal, o que não é desejável (THOMAS, 2013).

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou-se o modelo 8800 Triple Quadrupole da Agilent Technologies, o qual possui a configuração *tandem*. O equipamento possui um sistema de introdução de amostras, incluindo o nebulizador (Micromist), a câmara de nebulização (ciclônica) acoplada ao sistema Peltier (funcionando a 2 °C), o tubo de quartzo seguido pelos dois cones de amostragem, *sampler* e *skimmer* (ambos de Ni). As lentes iônicas, posicionadas atrás dos cones, são carregadas positivamente ou negativamente e também desempenham o papel de desviar a rota do feixe iônico, o separando dos fótons e neutrons, evitando que esses sejam direcionados para o detector. A diferença desse modelo para os diversos instrumentos comerciais é basicamente a configuração do sistema de separação de massas, que possui dois quadrupolos (Q_1 e Q_2) alternados pelo sistema de colisão e reação (ORS, do inglês, *Octapole Reaction System*) no qual pode ser feita a inserção de gases colisionais ou reacionais. Essa configuração permite trabalhar no modo de operação MS ou MS/MS. No modo MS/MS é possível utilizar o Q_1 como um filtro de massas, utilizar gases de colisão para atenuar os efeitos de interferências, ou usar gases de reação para reagir com interferências ou com o analito, que será selecionado no Q_2 . O detector é multiplicador de elétrons com diversos dinodos que convertem o sinal dos

elétrons que se chocam contra a placa numa corrente elétrica que pode ser medida a fim de gerar um sinal para um dado íon (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014).

2.3. HPLC e o acoplamento HPLC-ICP-MS

A cromatografia líquida é uma técnica físico-química de separação de componentes de uma mistura, envolvendo sua distribuição diferencial em um sistema bifásico composto por uma fase móvel e uma fase estacionária (ETTRE E SAKODYNSKII, 1993). Essa foi a definição dada por Mikhael Semenovitch Tswett que, em 1906, apresentou os resultados de uma separação de extratos vegetais utilizando uma coluna de carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel. Em linhas gerais, a cromatografia é uma técnica de separação de misturas e identificação de seus componentes, sendo que essa separação cromatográfica depende da interação entre os componentes da amostra com as duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, por isso é uma técnica versátil e de grande aplicação (COLLINS, BRAGA E BONATO, 2006; CASS E DEGANI, 2001).

Dentre os diferentes tipos de cromatografia, a líquida se destaca pelas diferentes aplicações com diferentes matrizes, que é reflexo dos muitos avanços em termos de resolução, quantificação, tempo de análise e detecção. Isso se deve a combinação do conhecimento das técnicas com a instrumentação desenvolvida. Do que se sabe da cromatografia gasosa, a eficiência da separação é aprimorada com a diminuição do tamanho de partícula, portanto o uso de micropartículas na fase estacionária proporcionou um desempenho de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (CASS E DEGANI, 2001).

Um sistema HPLC é composto pelo reservatório da fase móvel que geralmente possui um filtro que garante que apenas o eluente seja introduzido no sistema, uma bomba capaz de produzir uma vazão constante e reprodutível e cujo material deve ser resistente ao solvente utilizado, um medidor de pressão e um injetor. Na sequência é acoplada a coluna desejável e a depender da necessidade um detector (e.g. UV-visível, fluorescência, infravermelho, espectrometria de massas (MS) e outros) (COLLINS, BRAGA E BONATO 2006; CASS E DEGANI, 2001). O detector tem a função

de identificar e/ou quantificar as substâncias de interesse que estejam eluindo da coluna cromatográfica (ZOCOLO, 2012).

Os detectores utilizados nesta tese foram o UV-Visível e o espectrômetro de massas (MS). O detector de UV-Vis é o mais utilizado, e tem como princípio a absorção de radiação ultravioleta ou visível pelos grupos cromóforos presentes na amostra quando submetida a radiação eletromagnética. O detector MS tem se tornado comum para casos de determinação de íon molecular, e operando no modo MS/MS é possível a confirmação estrutural. O princípio do detector MS está descrito na seção Revisão Bibliográfica, item 2 sobre ICP-MS. No caso de estudos de especiação química, o uso desses detectores supracitados tem se tornado uma prática comum para identificação de metais ligados a aminoácidos e proteínas, espécies das formas redox, organometálicas e complexos metálicos (COLLINS, BRAGA E BONATO 2006; CASS E DEGANI, 2001). Para que haja uma boa separação no HPLC é necessário que as espécies tenham afinidade diferente com a coluna e, dessa forma, sejam detectadas em tempos diferentes (RT, do inglês *retention time*) pelo detector utilizado.

Há uma grande variabilidade de fases estacionárias comercializadas de diferentes fabricantes, dentre elas podem ser citadas as colunas de fase normal e em fase reversa. Uma coluna de fase normal é feita em sílica e possui grupos polares como fenila, ciano, amino e diol. Esse tipo de fase estacionária é recomendado para análise de substâncias insolúveis em água, como óleos, gorduras ou lipídeos. As colunas de fase reversa são colunas de baixa polaridade formadas por partículas de sílica recobertas por hidrocarbonetos com diferentes cadeias alifáticas (e.g. C-2, C-4, C-8, C-18) e permitem a análise desde substâncias hidrossolúveis e/ou iônicas, até substâncias lipofílicas. Dos solventes mais comumente utilizados para colunas operando em fase reversa estão a água, acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). Algumas vantagens estão associadas ao uso da coluna de fase reversa, como o rápido equilíbrio atingido pela coluna, menor adsorção irreversível, homogeneidade nos sítios de adsorção, eluição facilitada no modo gradiente e o não comprometimento da reprodutibilidade sofrido na presença de água (ZOCOLO, 2012).

As colunas de exclusão por tamanho (SEC) contêm partículas com poros de tamanhos variados (suporte) e os interstícios formam cavidades nas quais as

moléculas são separadas. As grandes moléculas são empurradas pelo eluente e adotam o caminho mais fácil, por isso são eluídas primeiro, enquanto as menores moléculas permeiam nas cavidades entre o suporte retardando seu tempo de eluição. Nesse caso, não é desejável que haja interação entre os analitos e o suporte e a coluna funciona como uma peneira molecular.

O desenvolvimento de um protocolo analítico deve resultar num método robusto, de procedimento relativamente simples, levar em consideração as possíveis interferências, os limites de detecção desejáveis e utilizar materiais e equipamentos existentes e comercializados. Levando essas questões em consideração, objetivou-se o desenvolvimento de um método empregando-se uma coluna de fase reversa, que além de apresentar todas as vantagens citadas anteriormente, é comumente encontrada nos laboratórios de análise por cromatografia líquida. Para a identificação as espécies de Se de baixa massa molecular e organometálicas utilizou-se uma coluna de fase reversa (C₁₈) e, para a avaliação do perfil proteico ligado ao selênio, foi empregada uma coluna de exclusão por tamanho (SEC).

A análise de especiação, ou a atividade analítica de determinação de espécies químicas, é um campo de estudo relativamente novo. O termo “especiação” foi emprestado das ciências biológicas. Trata-se de um conceito em química analítica no qual diferentes formas de um elemento químico devem ser consideradas individualmente. Em muitos casos, a essencialidade ou a toxicidade dos elementos depende da sua forma química, que pode variar bastante entre a forma orgânica ou inorgânica. O acoplamento HPLC-ICP-MS é uma estratégia que alia um método de separação com alta seletividade a uma técnica de detecção altamente sensível, na tentativa de buscar respostas que esclareçam questões como: Qual espécie é encontrada em maior concentração em determinada matriz? Como os metais são absorvidos e metabolizados? Quais espécies são formadas a partir da suplementação com determinada vitamina ou mineral? Existe interconversão de espécies?

Na Tabela 2.5 estão resumidos alguns trabalhos encontrados na literatura utilizando o acoplamento HPLC-ICP-MS para a identificação de espécies de selênio em diferentes matrizes. De acordo com os trabalhos mencionados observa-se que os principais parâmetros que implicam numa boa separação das espécies, precisão e

sensibilidade estão relacionados a etapa de preparo de amostra e ao emprego de técnicas de alta seletividade e sensibilidade.

TABELA 2.5. Estratégias de preparo de amostras e conclusões obtidas no desenvolvimento de métodos de especiação química de selênio em diferentes matrizes por HPLC.

Referência	Matriz	Espécies monitoradas	Preparo de amostras	Coluna	Observação
Casiot et al. (1999)	Levedura enriquecida	Selenocisteína, selenometionina, e selenoetionina	Extração com água quente, metanol, Tris-HCl, enzimática, solução salina	250 x 4.1 mm, 10 µm Hamilton PRP-X100 e 150 x 4.6 mm, 5 µm Inertsil ODS-2 para determinar espécies de Se e 300 x 10 mm, 13 µm SEC Superdex-200 HR 10/30 para avaliar o perfil proteico ligado a Se	Os resultados obtidos dependeram criticamente do procedimento de preparo de amostras usado. Coluna de troca aniônica apresentou melhores resultados para a separação das espécies.
Kotrebai et al. (2000)	Plantas hiperacumuladoras enriquecidas (<i>Astragalus praleongus</i> e <i>Brassica juncea</i>), levedura, alho-poró, cebola e alho.	23 espécies de selênio	Extração enzimática e com água quente.	150 x 3.9 mm, 5 µm Symmetry Shield RP8	Selenometionina é a principal espécie encontrada em amostras de levedura. Em alho e cebola a metilselenocisteína era a espécie majoritária. Resultados mais conclusivos foram obtidos com o acoplamento HPLC-ESI-MS
Montes-Bayón et al. (2002)	<i>Brassica juncea</i> geneticamente modificada	Selênio inorgânico, SeCys ₂ , MSC, selenometionina	HCl	250 x 4.6 mm, 5 µm Alltech C-8	O acoplamento HPLC-ICP-MS forneceu importantes informações como a quantificação das espécies mesmo em baixas concentrações. O mecanismo metabólico pode ser elucidado através de informações obtidas por ESI-MS

TABELA 2.5. Estratégias de preparo de amostras e conclusões obtidas no desenvolvimento de métodos de especiação química de selênio em diferentes matrizes por HPLC (continuação).

Referência	Matriz	Espécies monitoradas	Preparo de amostras	Coluna	Observação
Vonderheide et al. (2002)	Castanha do Brasil	SeMet, SeCys ₂ e selenoetionina	HCl diluído e extração enzimática foram comparados	150 x 4.6 mm, 5 µm Alltima C-8	A remoção lipídica foi essencial para fixar os tempos de retenção que eram alterados ao longo das análises. A extração enzimática foi a mais eficiente na extração de Se e gerou nos melhores resultados.
Capelo et al. (2004)	Levedura enriquecida	SeMet e SeCys ₂	Extração com água e enzimática combinados a probe ultrassônica foram comparados	250 x 4.1 mm, 10 µm Hamilton PRP-X200	A extração enzimática assistida pela probe ultrassônica elevou a eficiência da extração. Foi possível identificar selenocistina, metilselenocisteína, selenometionina e Se inorgânico de acordo com os tempos de retenção dos padrões por HPLC-ICP-MS. Outras espécies puderam ser identificadas por ESI-MS
Shah et al. (2004)	Cebolinha verde enriquecida	Selenoaminoácidos	HCl diluído para extrair espécies de Se livre e tampão Tris + CaCl ₂ + Proteinase K para extrair espécies de Se ligadas a proteínas.	150 x 4.6 mm, 5 µm Alltima C-8 para identificação de espécies de Se e Superdex Peptide HR 10/30	
Gergely et al. (2006)	Cogumelos	Selenoaminoácidos	NaOH, Tris-HCl e digestão enzimática foram comparados	250 x 4.6 mm, 5 µm Alltima C-8 e Superdex 75 HR 10/300 GL	Foram identificadas três espécies: SeCys, MSC e SeMet.
Phipps et al. (2008)	Sangue, leite e queijo de gado leiteiro suplementado	SeMet e SeCys	Enzimática (protease e lipase)	Reversed-phase	Com esse método foi possível avaliar se houve aumento da concentração de Se (como SeMet e SeCys) em diferentes matrizes

TABELA 2.5. Estratégias de preparo de amostras e conclusões obtidas no desenvolvimento de métodos de especiação química de selênio em diferentes matrizes por HPLC (continuação).

Referência	Matriz	Espécies monitoradas	Preparo de amostras	Coluna	Observação
Fang et al. (2009)	Arroz enriquecido	Se(IV), Se(VI), SeCys ₂ , SeMet e Se-O-Met	Água, HCl diluído, hidrólise enzimática foram comparados	250 x 4.6 mm, 5 µm Agilent Zorbax SB-C18 e 150 x 4.6 mm, 5 µm Hamilton PRP-X100	A extração enzimática (protease + amilase) assistida com banho ultrassônico indicou os melhores resultados. SeMet foi a principal espécie detectada por HPLC-ICP-MS e confirmada por nano-ESI-IT-MS.
Vacchina et al. (2010)	Amostras biológicas	SeMet e 2-Hidroxi-4-ácido metilselenobutanóico	Extração enzimática (protease e lipase em tampão fosfato pH 7.5)	250 x 4.6 mm, 5 µm Alltima C-8	O acoplamento HPLC-ICP-MS permitiu a identificação e quantificação das espécies.
Cuderman et al. (2010)	Brotos de trigo sarraceno cultivados em soluções contendo Se	SeCys ₂ , MSC, Se(IV), Se(VI), SeMet	Tampão fosfato + 0,1 a 0,3 M HCl + protease combinado a celulase, amilase ou lipase foi comparado com extrações que variavam as concentrações da razão amostra/enzima	250 x 4.1 mm, 10 µm Hamilton PRP-X 100	Uma boa separação das espécies foi possível através do acoplamento HPLC-ICP-MS. Foram quantificadas espécies extraídas dos brotos e das soluções remanescentes do meio de cultivo
Pedrero et al. (2011)	Orgãos de peixes suplementados	SeMet, MSC, SeCys ₂ , Se(IV) e Se(VI)	Enzimática (protease e lipase)	250 x 4.1 mm, 10 µm Hamilton PRP X-100	As espécies foram identificadas apesar da complexidade da matriz
Kokarnig et al. (2015)	Serum e urina humana após ingestão de suplementos selênicos	SeMet, TMSe, Se(IV), MSC	Água e extração enzimática	250 x 4.1 mm, Hamilton PRP-X200, 200 x 3 mm, Ionospher 5C, 150 x 4.6 mm, Hamilton PRP-X100 e 150 x 4.1 mm Atlantis dC18 foram comparadas	Com esse estudo pode-se correlacionar o efeito de biodisponibilidade e excreção de espécies de Se não-proteicas

Capítulo 3

**Hidrogênio como gás de reação
para determinação do isótopo
 ^{80}Se em amostras biológicas**

3. Hidrogênio como gás de reação para determinação do isótopo ^{80}Se em amostras biológicas

3.1. Introdução

Como apresentado na revisão bibliográfica, o ICP-MS apresenta inúmeras vantagens frente às demais técnicas espectroanalíticas, bem como a capacidade de análise multi-elementar e isotópica, além de alta sensibilidade, o que implica em baixos limites de detecção, alta frequência analítica e baixo consumo de amostra, dentre outras. Por outro lado, essa técnica também sofre com a influência de algumas interferências espectrais e não-espectrais.

As interferências não-espectrais, também chamadas de efeito de transporte, se referem à supressão do sinal do analito ocasionada em função do teor de sólidos dissolvidos, turbidez e acidez da amostra, bem como nebulização, tensão superficial e viscosidade do líquido, e o efeito de carga espacial sofrida pelos íons na transição de uma zona de pressão atmosférica para vácuo. Outra causa da supressão do sinal analítico ocorre quando a amostra contém altas concentrações de analito e/ou interferentes que podem influenciar nas condições de ionização do plasma. As interferências espectrais, por sua vez, são aquelas formadas pela mesma razão massa carga (m/z) e implicam no aumento do sinal, uma vez que é monitorada a razão m/z no(s) quadrupolo(s), levando a um falso resultado. Das possíveis interferências espectrais podem ser citadas formações de óxidos, dupla carga, dímeros e outras formações poliatômicas.

O Se possui seis isótopos com distintas abundâncias naturais, sendo esses: ^{74}Se (0,9 %), ^{76}Se (9,0 %), ^{77}Se (7,6 %), ^{78}Se (23,6 %), ^{80}Se (49,7 %) e ^{82}Se (9,2 %). Apesar de sofrer com as interferências espectrais, os isótopos de Se mais comumente monitorados por ICP-MS são ^{77}Se , ^{78}Se e ^{82}Se , como apresentado na Tabela 3.1.

TABELA 3.1. Possíveis interferentes dos isótopos ^{77}Se , ^{78}Se e ^{82}Se .

Isótopo	Sobreposição com argônio	Sobreposição com oxigênio	Sobreposição com enxofre	Sobreposição com carbono	Formação de dupla carga	Outras formações poliatômicas
^{77}Se	$^{38}\text{Ar}_2\text{H}$ $^{36}\text{Ar}^{40}\text{ArH}$	$^{61}\text{Ni}^{16}\text{O}$ $^{60}\text{Ni}^{17}\text{O}$ $^{59}\text{Co}^{18}\text{O}$		$^{12}\text{C}^{19}\text{F}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	$^{154}\text{Gd}^{2+}$ $^{154}\text{Sm}^{2+}$	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$
^{78}Se	$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ $^{39}\text{Ar}_2$	$^{62}\text{Ni}^{16}\text{O}$ $^{61}\text{Ni}^{17}\text{O}$ $^{60}\text{Ni}^{18}\text{O}$			$^{156}\text{Gd}^{2+}$ $^{156}\text{Dy}^{2+}$	$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$
^{82}Se	$^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2$	$^{64}\text{Cu}^{18}\text{O}$ $^{66}\text{Zn}^{16}\text{O}$	$^{33}\text{S}^{16}\text{O}_3\text{H}^+$ $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$	$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$	$^{154}\text{Dy}^{2+}$ $^{164}\text{Er}^{2+}$	$^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}$ ^{81}BrH

Modificado de Perkin Elmer Sciex, 2008.

Observa-se na Tabela 3.1 que os principais interferentes são formados a partir de elementos presentes na composição do ar, como oxigênio e nitrogênio, com o gás de formação do plasma, o argônio e de carbono, elemento comumente parte da composição das amostras, no caso de amostras orgânicas.

Por ser o isótopo mais abundante desse elemento, o monitoramento do ^{80}Se pode solucionar o problema da sensibilidade no caso de amostras com uma baixa concentração desse mineral. No entanto esse isótopo não é usualmente monitorado por sofrer severas interferências de formações poliatômicas, com destaque para o majoritário que é o dímero de argônio ($^{40}\text{Ar}_2^+$), proveniente do argônio. Os interferentes desse isótopo, na mesma m/z são: $^{40}\text{Ar}_2$, $^{62}\text{Ni}^{18}\text{O}$, $^{63}\text{Cu}^{17}\text{O}$, $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}$, ^{79}BrH , $^{160}\text{Dy}^{2+}$, $^{160}\text{Gd}^{2+}$.

São diversas as estratégias de minimização de interferentes. Alguns interferentes podem ter sua formação minimizada com ajustes de parâmetros instrumentais. A profundidade de amostragem, que consiste na medida da distância entre o tubo de quartzo e o cone de amostragem é um parâmetro instrumental que está diretamente ligado à formação de óxidos e espécies de dupla carga. Quando o tubo está muito distante do cone de amostragem o plasma aumenta a superfície de contato com o ar e portanto, tanto o analito como os interferentes entram em contato com a região mais fria do plasma, acarretando a formação de óxidos. Por outro lado, a aproximação do tubo e do cone de amostragem faz com que os íons presentes no plasma se concentrem na região mais quente desse, fornecendo mais energia para uma possível ionização do segundo elétron. Em outras palavras, formando íons de dupla carga. Não obstante, associado à questão da profundidade de amostragem, o fluxo do gás de nebulização tem

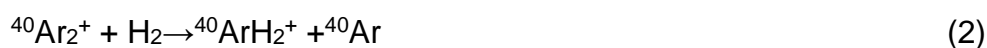
influência no número de interferentes que será conduzido ao detector. Quanto maior o fluxo do gás de nebulização, maior é o número de íons interferentes ionizados e introduzidos, mas também é menor o tempo de residência dos íons desejados e indesejados no plasma. O oposto ocorre para um baixo fluxo do gás de nebulização, diminuindo a introdução de íons e aumentando o tempo de residência no plasma, podendo levar ao aumento de formação de íons com dupla carga. No entanto, diminuir o fluxo do gás de nebulização também implica na menor introdução dos íons de interesse. A potência de radiofrequência (*RF Power*) é outro parâmetro instrumental que pode influenciar na formação dessas espécies. Com o aumento da potência de RF o plasma se torna mais energético, induzindo a ionização do segundo elétron de alguns elementos. Por outro lado, a diminuição da potência de RF implica na diminuição da temperatura do plasma, o que pode influenciar na eficiência de ionização de alguns elementos que possuem alta energia de ionização, e/ou induzir a formação de óxidos. Aumentar a vazão do gás de nebulização e aplicar uma baixa potência de RF é uma estratégia para monitorar óxidos de algumas espécies (MO^+), denominado plasma frio, uma vez que sob essas condições o plasma tem menor energia se comparado ao uso de uma alta potência de RF. Dessa forma, a otimização desse conjunto de parâmetros instrumentais se faz necessária para alcançar sensibilidade suficiente para a determinação analítica do(s) isótopo(s) a ser(em) monitorado(s), com a minimização do sinais dos interferentes.

Com a evolução da instrumentação algumas estratégias têm sido aperfeiçoadas, alcançando resultados cada vez mais precisos e exatos. A célula de colisão e reação (CRC) é uma ferramenta encontrada em alguns equipamentos de ICP-MS e consiste numa cela, geralmente um multipolo que atua como um focalizador de íons. A atmosfera da célula de colisão é preenchida com um gás de colisão ou reação, a depender do analito e dos interferentes. A quantificação através da m/z desejada é possível devido à remoção dos íons não desejados pela CRC, o que leva à maior exatidão dos resultados (JACKSON, LIBA E NELSON, 2015).

De forma resumida, o uso do gás de colisão tem o objetivo de usar a energia liberada pela colisão do gás com o feixe iônico para promover a quebra de algumas formações poliatômicas. O emprego do gás de reação, por sua vez, leva a uma complexa

série de reações do gás utilizado com os interferentes, formando novas espécies poliatômicas que terão outra m/z que não a do analito, ou a reação com o analito, que poderá ser monitorado em função da nova m/z . A escolha do gás de reação deve levar em consideração o favorecimento termodinâmico da reação almejada, seja com o analito ou com o interferente.

Dentre os diversos gases utilizados como gás de reação os mais comumente usados para a redução de interferentes estão: a amônia (NH_3), o metano (CH_4), o oxigênio (O_2) e o hidrogênio (H_2). O hidrogênio tem sido extensivamente usado como gás de reação e no caso do selênio é usado para reagir com os interferentes do isótopo ^{80}Se , permitindo seu monitoramento (FELDMANN, JAKUBOWSKI E STUEWER, 1999; BANDURA, BARANOV E TANNER, 2001; TANNER, BARANOV E BANDURA, 2002; D'ILIO et al., 2011). De acordo com D'ilio et al. (2011), o hidrogênio se destaca na remoção do sinal do dímero de argônio ($^{40}\text{Ar}_2^+$) através da reação com o hidrogênio, quando o dímero assume outra m/z , deixando a $m/z= 80$ livre para a análise do ^{80}Se . As equações (1) e (2) foram propostas para demonstrar o mecanismo que ocorre durante a reação:



A presença de Ca pode resultar numa potencial sobreposição no sinal dos isótopos ^{78}Se e ^{80}Se devido a possíveis recombinações como $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$. Na presença de H_2 essas recombinações são desfavorecidas (D'ILIO et al., 2011). Para amostras biológicas como urina, sangue e plasma pode haver íons brometo, podendo ocorrer a formação de seu hidreto ($^{79}\text{BrH}^+$) e causar severas interferências sobre o sinal do $^{80}\text{Se}^+$ (D'ILIO et al., 2011; SUCHAROVA, 2011). A formação de íons com dupla carga de elementos terras-raras (REEs) como o Gd^+ e Dy^+ também deve ser considerada. A interferência de Gd^+ e Dy^+ com $m/z= 80$ pode ser um problema, uma vez que esses elementos tem a segunda energia de ionização baixa. Nota-se que o Gd possui 21,86 % de abundância na $m/z= 160$, enquanto o Dy tem 2,34 % e apesar desses elementos não

serem comumente encontrados em matrizes alimentícias, um estudo para formação de íons com dupla carga também foi realizado. Ambos, Gd e Dy são imobilizados no solo, entretanto, o cultivo de alimentos em solos ricos em REEs pode ser tornar um problema na determinação de ^{80}Se (SUCHAROVA, 2011). Assim, de acordo com Thomas (2002), a formação de íons com dupla carga não pode ser evitada, mas minimizada, otimizando-se o fluxo de gás de nebulização, diminuindo a potência de RF e ajustando-se a profundidade de amostragem. Dois parâmetros são facilmente ajustáveis através do programa do instrumento, entretanto a potência de RF não deve sofrer grandes alterações, uma vez que a primeira energia de ionização do Se é alta e mudanças na energia do plasma comprometerão a sensibilidade. Outro problema particular do Se é que geralmente esse elemento é encontrado em baixas concentrações em matrizes alimentícias, sendo necessários procedimentos com os menores limites de detecção possíveis. Cobre e zinco são elementos frequentemente encontrados em amostras biológicas e as espécies poliatômicas $^{63}\text{Cu}^{17}\text{O}^+$ e $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+$ são combinações que podem sobrepor o sinal do ^{80}Se , portanto essas também foram avaliadas.

O ICP-MS/MS utilizado é um equipamento com a configuração *tandem* que é baseada na possibilidade de uso de dois quadrupolos. Para a determinação do isótopo ^{80}Se essa configuração é de extrema importância, pois além do ajuste dos parâmetros instrumentais, o uso do primeiro quadrupolo atua como filtro de outras m/z diferentes de 80. O ORS tem alta eficiência na remoção de interferentes, como do sinal do dímero de argônio que se dá com uma alta taxa de reação entre o dímero de argônio e o gás hidrogênio. Na Figura 3.1 observa-se o diagrama do transporte dos íons ao longo do caminho até o detector e a remoção dos interferentes ao longo do Q_1 e Q_2 .

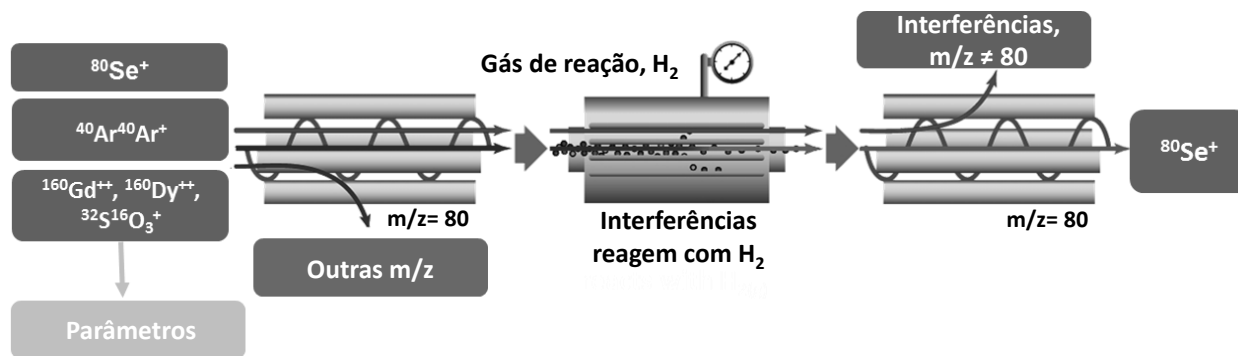


FIGURA 3.1. Representação do transporte de íons $^{80}\text{Se}^+$ e o destino dos outros íons transportados entre o Q_1 e Q_2 (Modificado de Agilent Technologies).

3.2. Objetivo

Otimizar as condições operacionais do ICP-MS/MS para a determinação do isótopo $^{80}\text{Se}^+$ com o menor limite de detecção possível e avaliar a eficiência da ferramenta de fluxo do gás de reação/colisão com o emprego de hidrogênio para a remoção de interferências na determinação de selênio focado em baixas e altas concentrações desse elemento monitorando-se os isótopos ^{78}Se e ^{80}Se em dois materiais de referência certificados (CRMs), de fígado bovino e de fígado de peixe.

3.3. Material e métodos

3.3.1. Instrumentação

Todas as medidas analíticas foram realizadas em um ICP-MS/MS (Agilent Technologies, modelo 8800 MS, Santa Clara, CA) operando no modo MS/MS com introdução de H_2 na célula de colisão e reação, ou sistema de reação quadrupolar (ORS). O instrumento é equipado com uma câmara de nebulização de duplo passo refrigerada por um sistema Peltier para minimizar a formação de óxidos, nebulizador concêntrico, e tubo de quartzo com 2,5 mm de diâmetro interno (para o tubo central). Os dados foram adquiridos usando-se o programa do instrumento, MassHunter Workstation. Os parâmetros operacionais do instrumento estão resumidos na Tabela 3.2.

TABELA 3.2. Parâmetros instrumentais para o ICP-MS/MS.

Parâmetros do tune	
Potência de RF	1600 W
Profundidade de amostragem	8,3 mm
Vazão do gás de nebulização	0,95 L/min
Temperatura da câmara de nebulização	2 °C
Velocidade da bomba peristáltica	0,30 rps
Gás Makeup/Diluição	0,11 L/min
Gás introduzido no ORS	H ₂
Parâmetros da cela	
Vazão de H ₂	3,7 mL/min
OctP Bias	-18,0 V
OctP RF	150 V
Energy discrimination	5,0 V
Parâmetros das lentes	
Extract 1	-3,5 V
Extract 2	-140,5 V
Omega Bias	-80 V
Omega Lens	9,0 V
Q1 Entrance	0 V
Q1 Exit	1 V
Cell Focus	0 V
Cell Entrance	-40 V
Cell Exit	-80 V
Deflect	-3,0 V
Plate Bias	-50 V
Parâmetros de aquisição de sinal	
m/z (Q ₁ , Q ₂)	(78, 78); (80, 80)
Tempo de estabilização	30 s
Tempo de integração/ Se	0,25 s
Tempo de integração / Ge	0,09 s

3.3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (> 18,2 MΩ cm) de um sistema de purificação (EMD Millipore Corp., modelo Q-POD Milli-Q, Billerica, MA). Ácido nítrico ultrapuro e ácido bromídrico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e peróxido de hidrogênio 30 % m m⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) foram usados para a digestão das amostras. As soluções multi-elementares contendo 10 mg L⁻¹ de Se (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ), 1010 e 1015 µg mL⁻¹ de Cu e Gd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), respectivamente, 100 µg mL⁻¹ de Zn e 1000 µg mL⁻¹ de Dy (High Purity Standards), 1000 ppm de Ca (Fisher Scientific) e uma solução multi elementar

contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Ge (High-Purity Standards) usado como padrão interno foram utilizadas na preparação de soluções padrão de calibração de 5 e/ou $500 \mu\text{g L}^{-1}$ por diluição na presença de HNO_3 1 % v v $^{-1}$.

3.3.3. Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado no US FDA, Forensic Chemistry Center, portanto seguiu-se os protocolos laboratoriais para a execução do procedimento. Os CRMs de fígado bovino (*bovine liver*, NIST, SRM 1577c, Gaithersburg, MD) e fígado de peixe (*Fish liver*, NRC, CRM Dolt-4, Ottawa, Canadá) foram usados para avaliar a exatidão do método. Os CRMs foram submetidos à digestão via úmida assistida por radiação micro-ondas (Mars Xpress, CEM Corp., Matthews, NC). Para isso, aproximadamente 250 mg de cada material foi pesado diretamente nos frascos de digestão. A seguir foi adicionado 5 mL de HNO_3 14 mol L^{-1} e 3 mL de água ultrapura em cada frasco, além da adição de uma solução estoque de selênio a fim de atingir uma concentração final do digerido de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ para avaliar a exatidão dentro do frasco através do teste de adição e recuperação. Adicionou-se 1,0 mL of H_2O_2 aos digeridos após uma primeira rodada no forno de micro-ondas, após o resfriamento dos frascos. A seguir os frascos foram levados novamente ao forno de micro-ondas para uma segunda rodada de digestão. O programa de aquecimento para a digestão das amostras usado nas duas etapas está descrito na Tabela 3.3. Após o resfriamento dos frascos de digestão as amostras foram diluídas a fim de se enquadrar na faixa linear da curva de calibração (de $0,5$ a $50 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de HNO_3 1 % v v $^{-1}$.

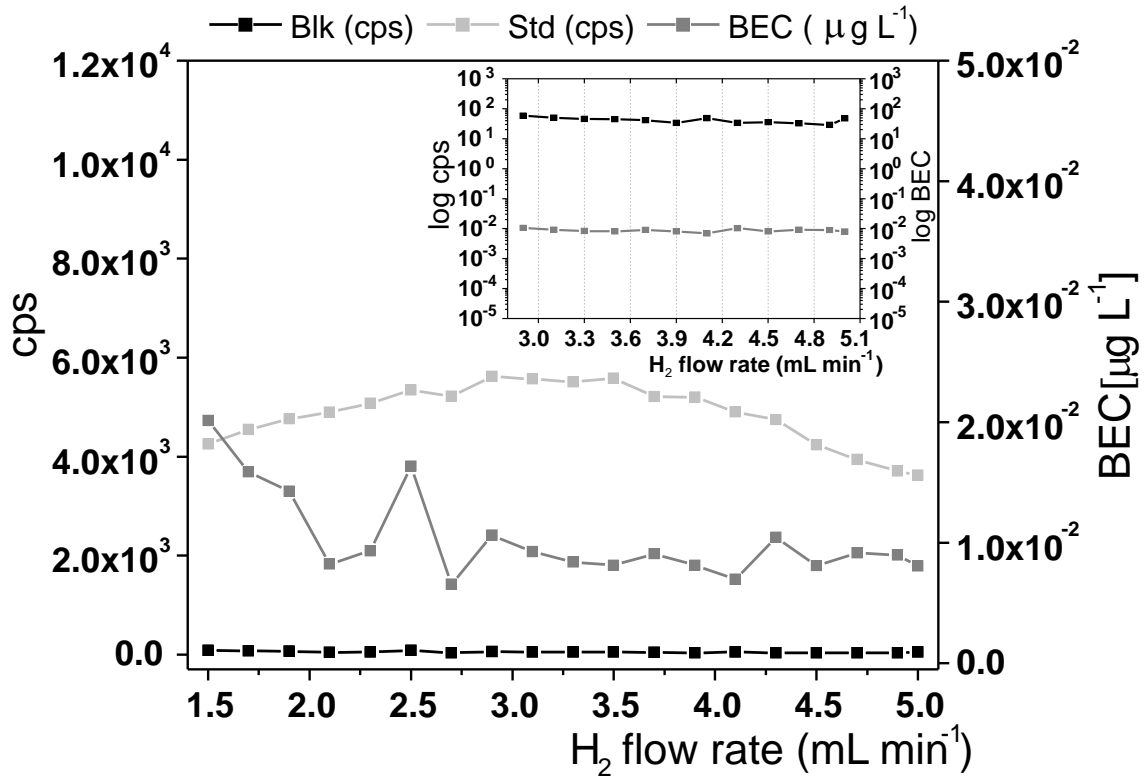
TABELA 3.3. Programa de aquecimento no forno de micro-ondas.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Patamar (min)
1	1600	20	120	15
2	1600	10	190	15
3	0			

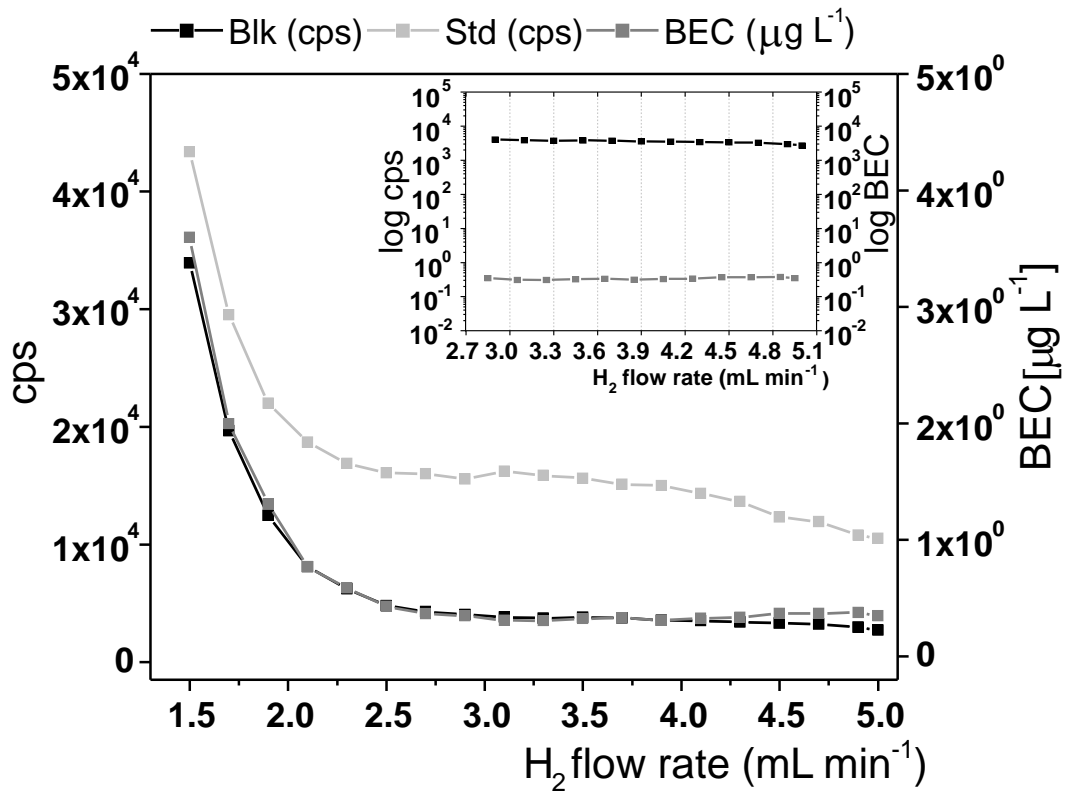
3.4. Resultados e discussão

A otimização da vazão do fluxo de gás na cela ORS permite o operador escolher a melhor razão sinal do analito/sinal de fundo. Nas Figuras 3.2 a 3.9 estão apresentadas as vazões de H_2 vs. sinal de uma solução padrão de Se/sinal de fundo na

presença de diversos possíveis interferentes e soluções de branco. As interferências estudadas nesse trabalho são: a formação do dímero do isótopo ^{40}Ar , influência da dupla carga (de Dy^+ e Gd^+), $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$, e óxidos como $^{62}\text{Ni}^{18}\text{O}^+$, $^{63}\text{Cu}^{17}\text{O}^+$, $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+$ sobrepondo a $m/z=80$. Para $m/z=78$ foram consideradas as formações das espécies poliatômicas $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ e $^{39}\text{Ar}^{2+}$, e óxidos como $^{62}\text{Ni}^{16}\text{O}^+$, $^{61}\text{Ni}^{17}\text{O}^+$ e $^{60}\text{Ni}^{18}\text{O}^+$. As soluções preparadas foram monitoradas na (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$ para as soluções de padrão, branco e sinal de fundo (ou BEC, do inglês, *background equivalent concentration*), como apresentadas na Figura 3.2. As soluções foram preparadas em meio de HNO_3 1 % v v⁻¹, bem como as soluções de branco que tinham as mesmas concentrações, exceto a adição da solução padrão de Se..

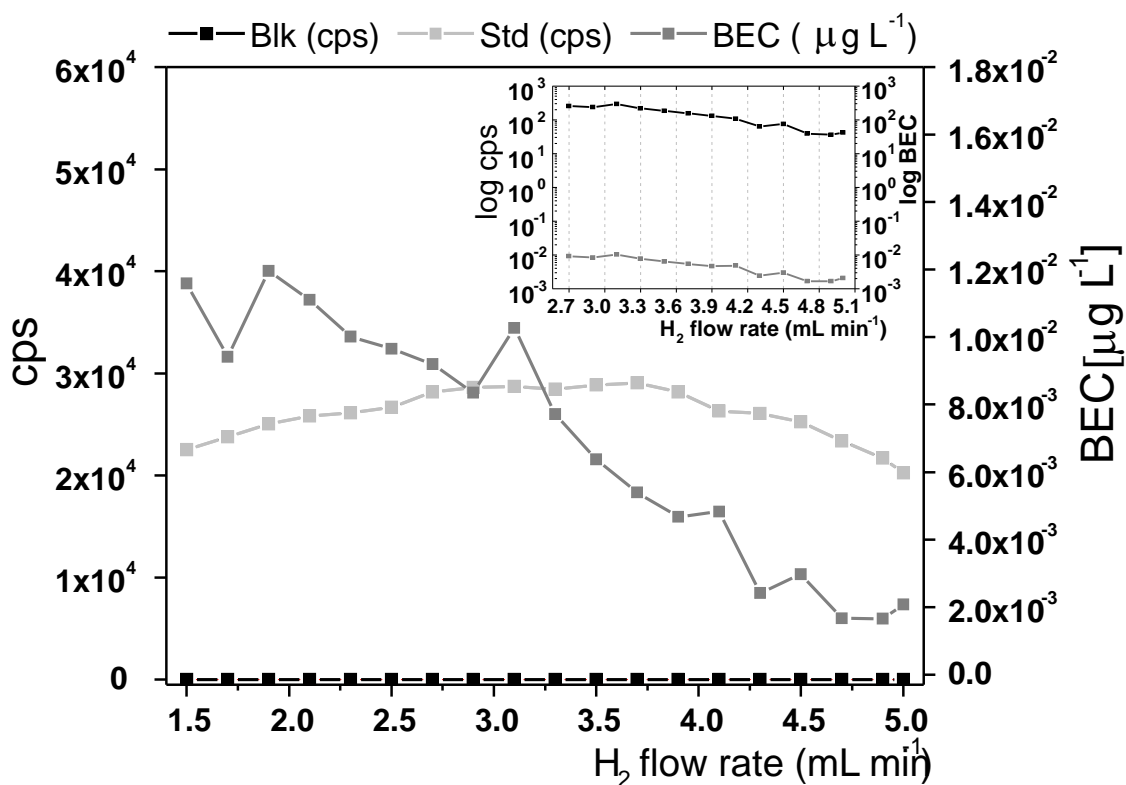


(a)

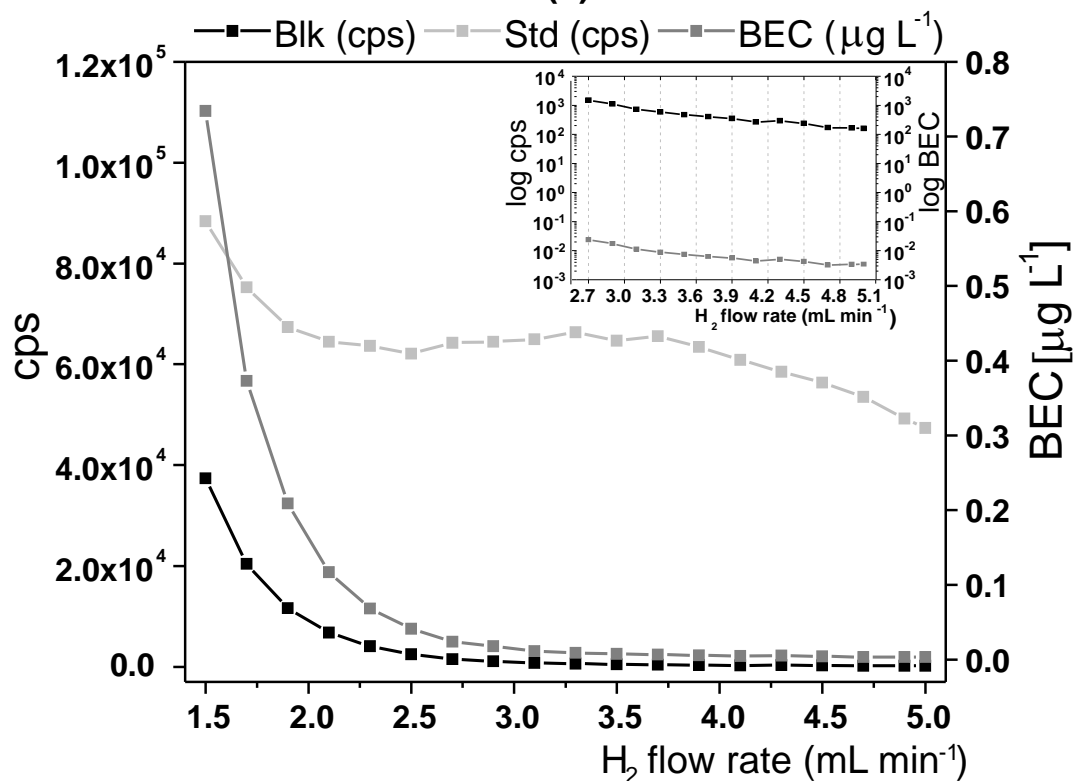


(b)

FIGURA 3.2. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se.

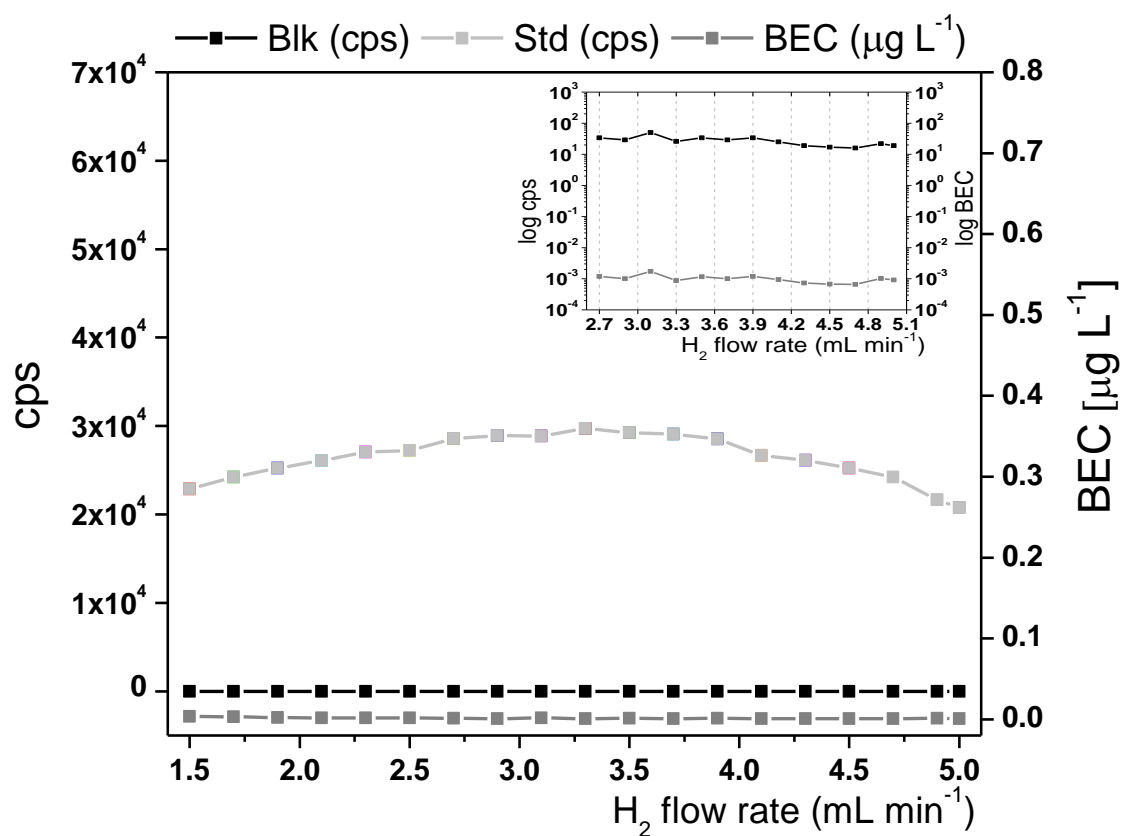


(a)

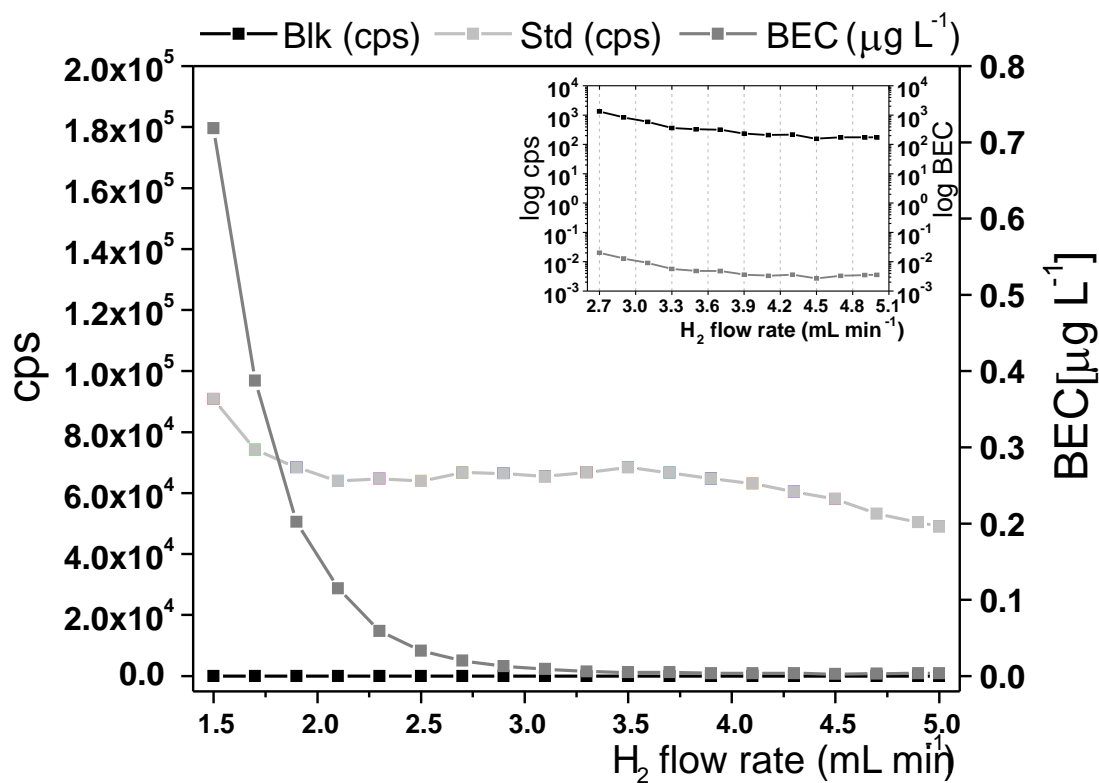


(b)

FIGURA 3.3. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se + $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Gd.

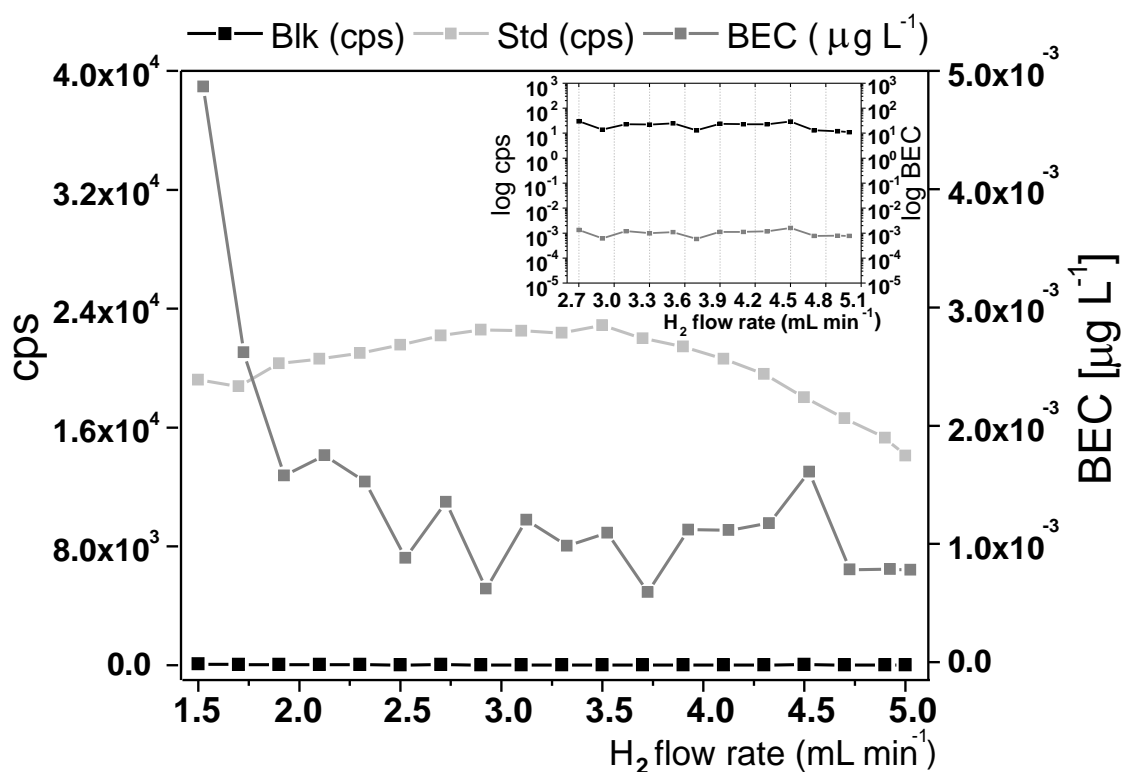


(a)

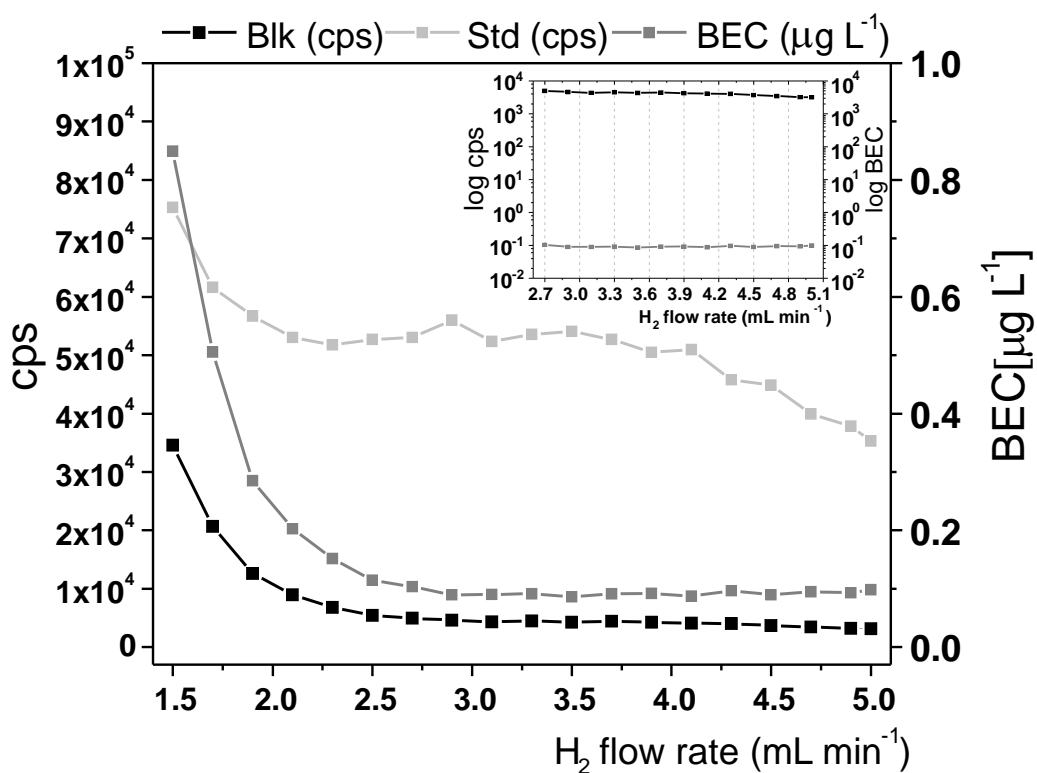


(b)

FIGURA 3.4. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se + $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Dy.

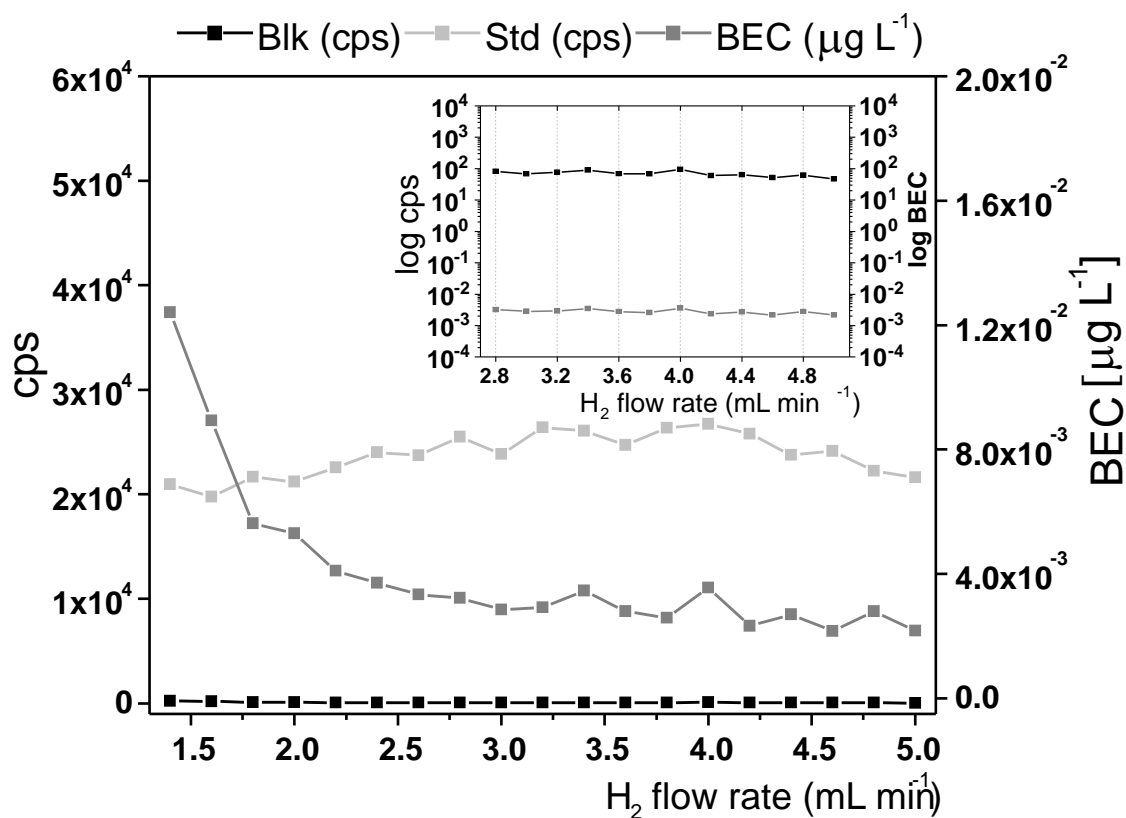


(a)

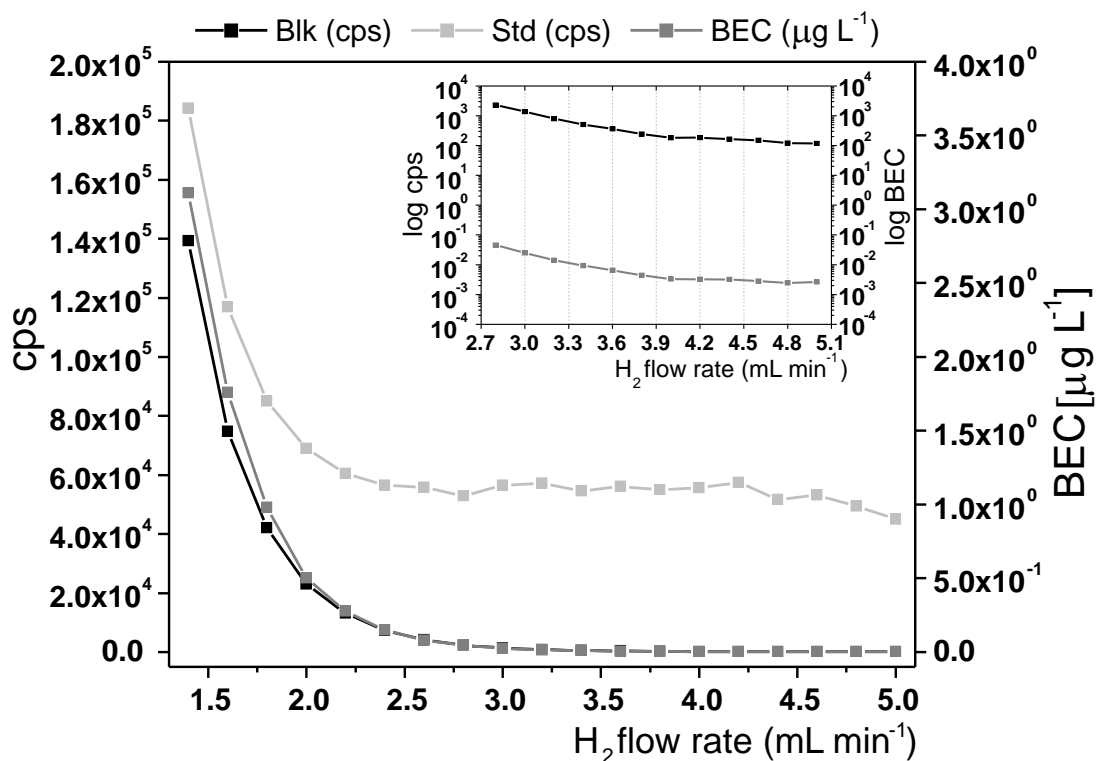


(b)

FIGURA 3.5. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se na presença de elementos que levem à formação de possíveis interferentes numa concentração 100x maior.

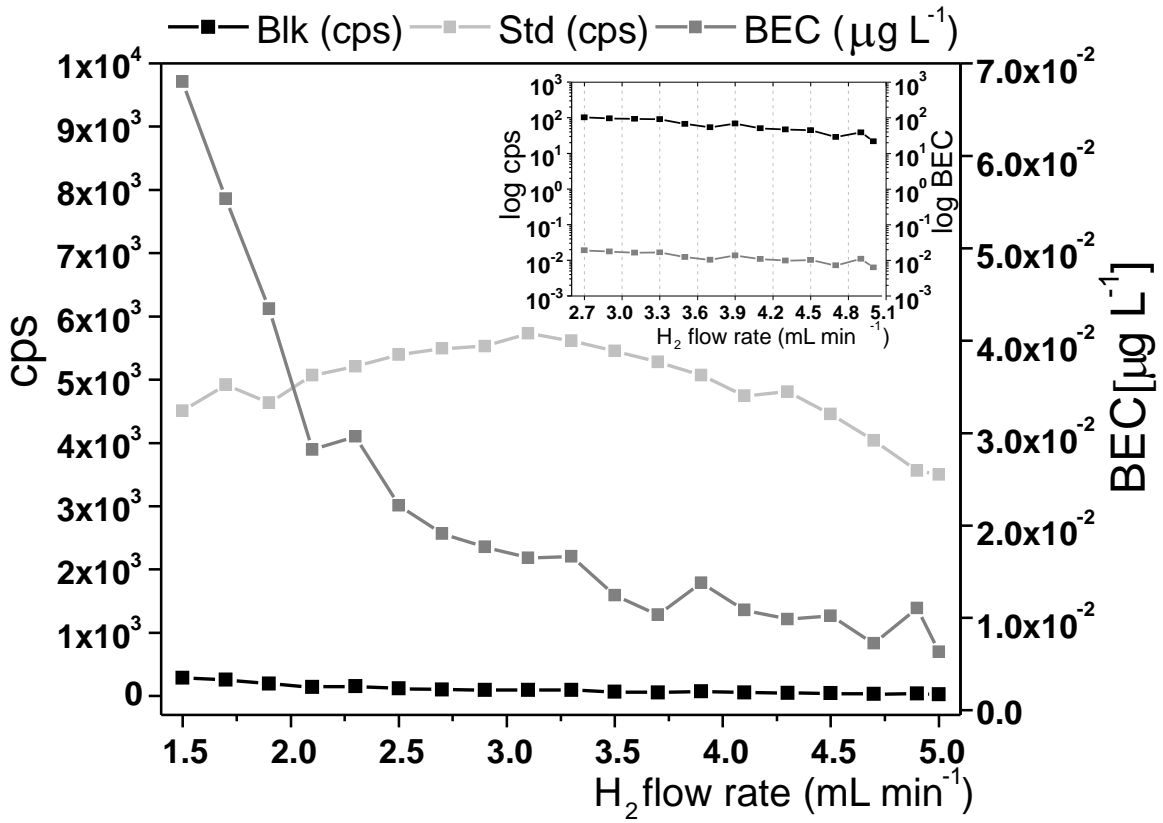


(a)

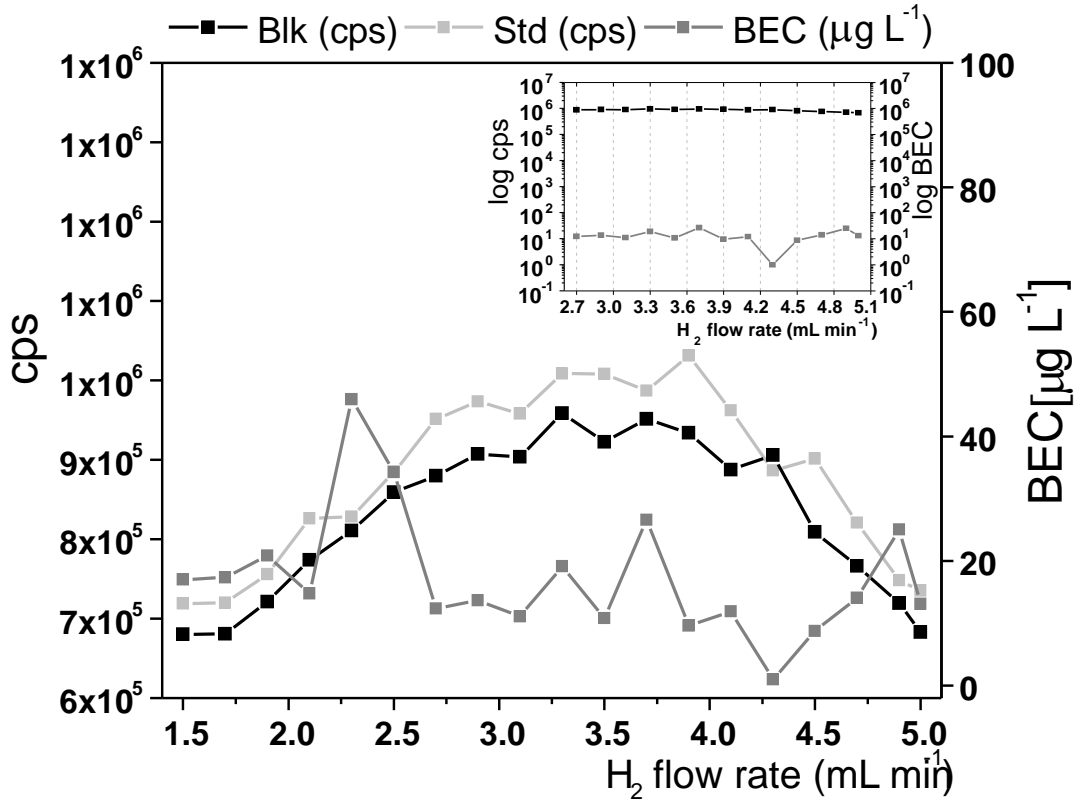


(b)

FIGURA 3.6. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se + $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Ca.

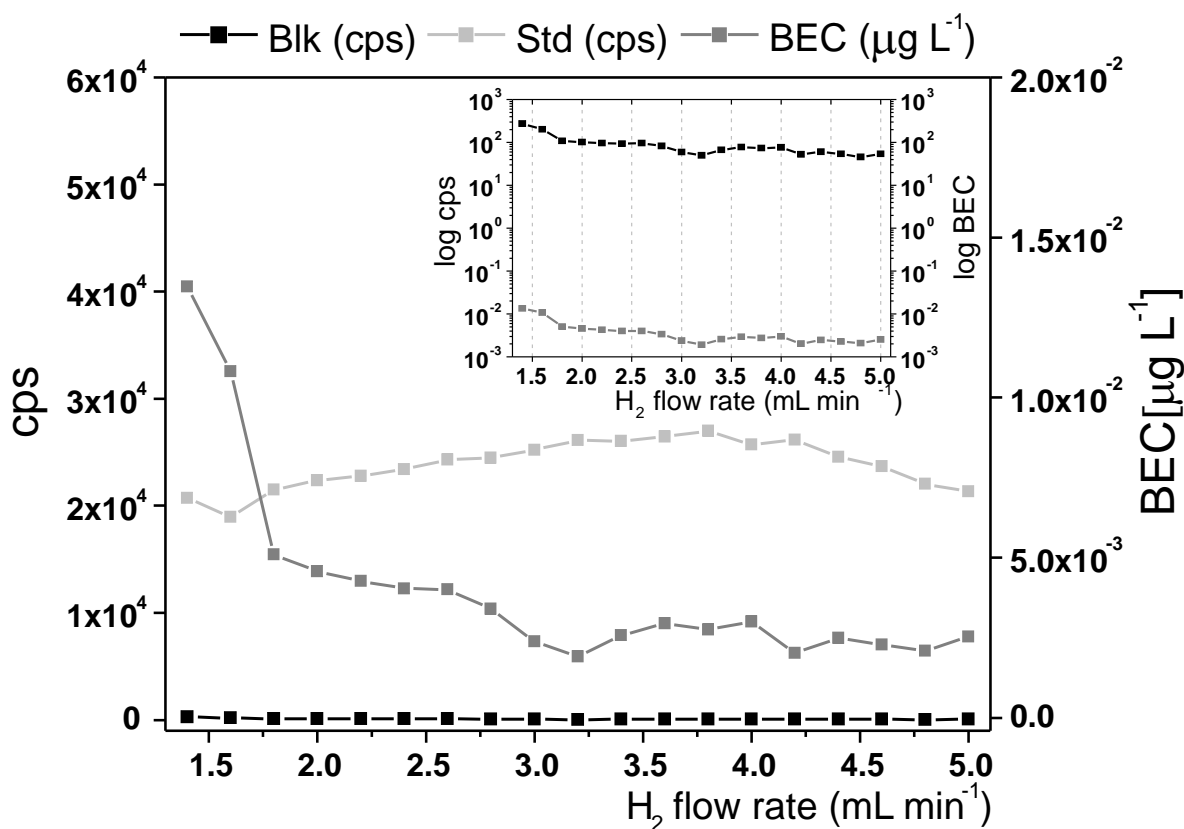


(a)

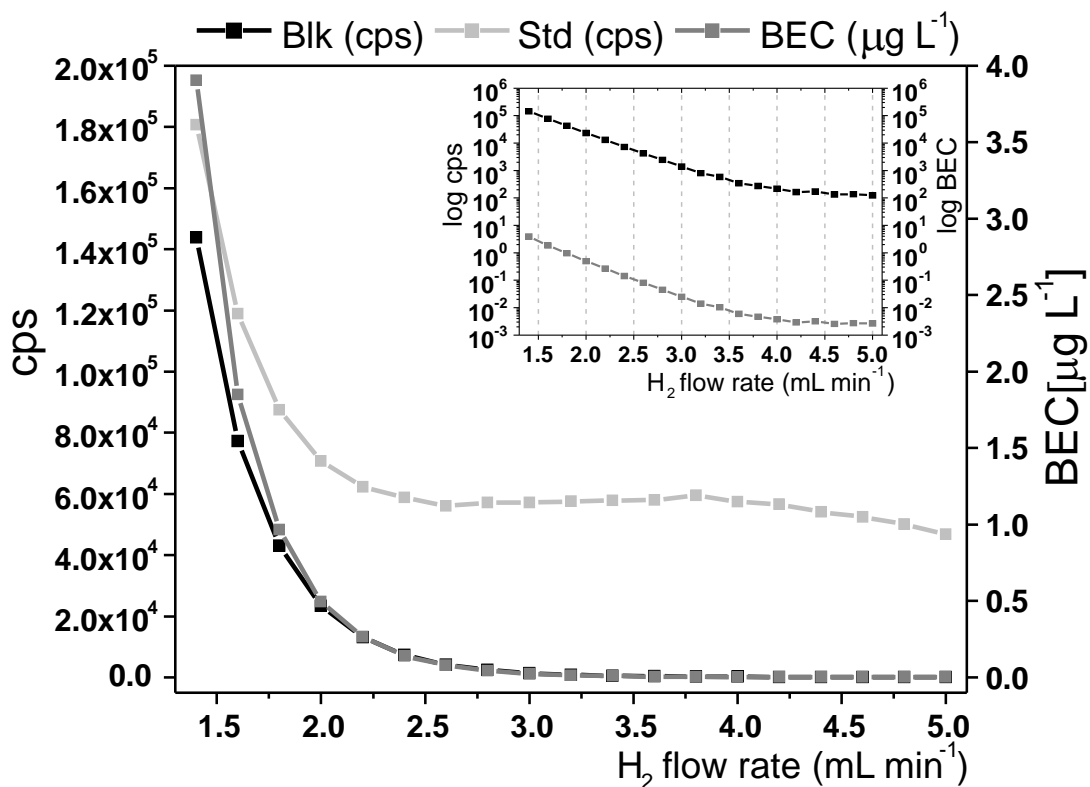


(b)

FIGURA 3.7. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ Se + $0,1 \% \text{ v}^{-1}$ HBr.

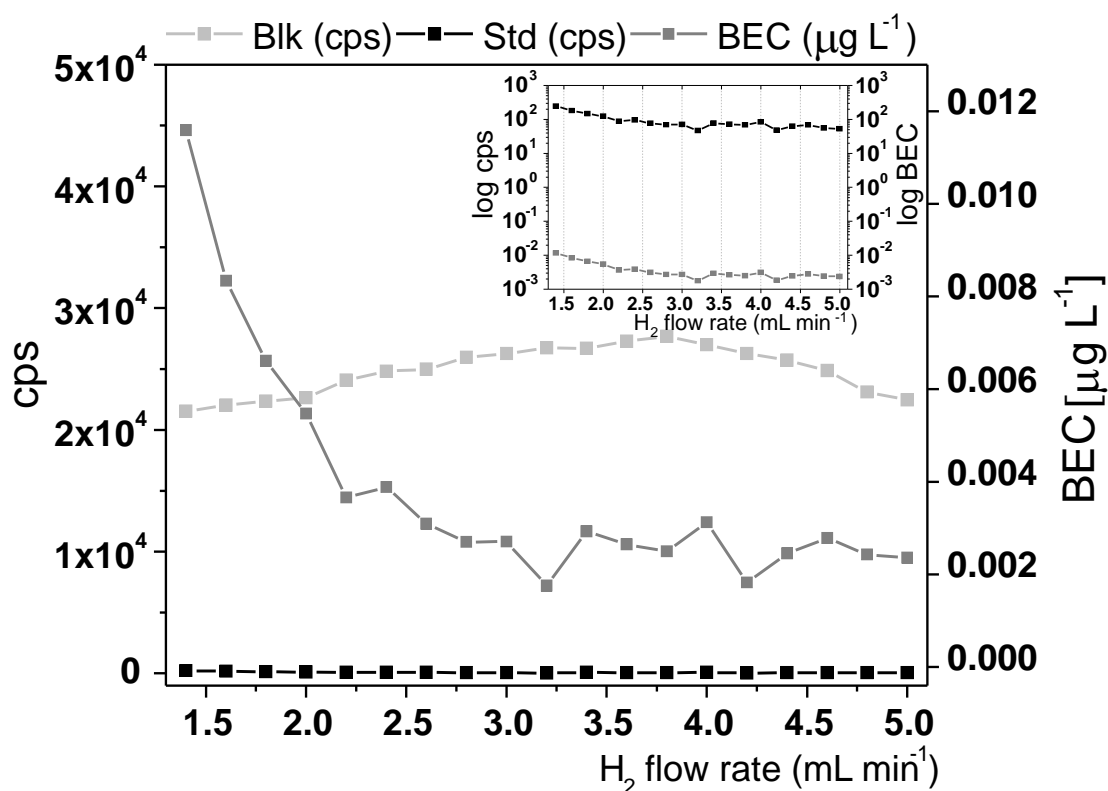


(a)

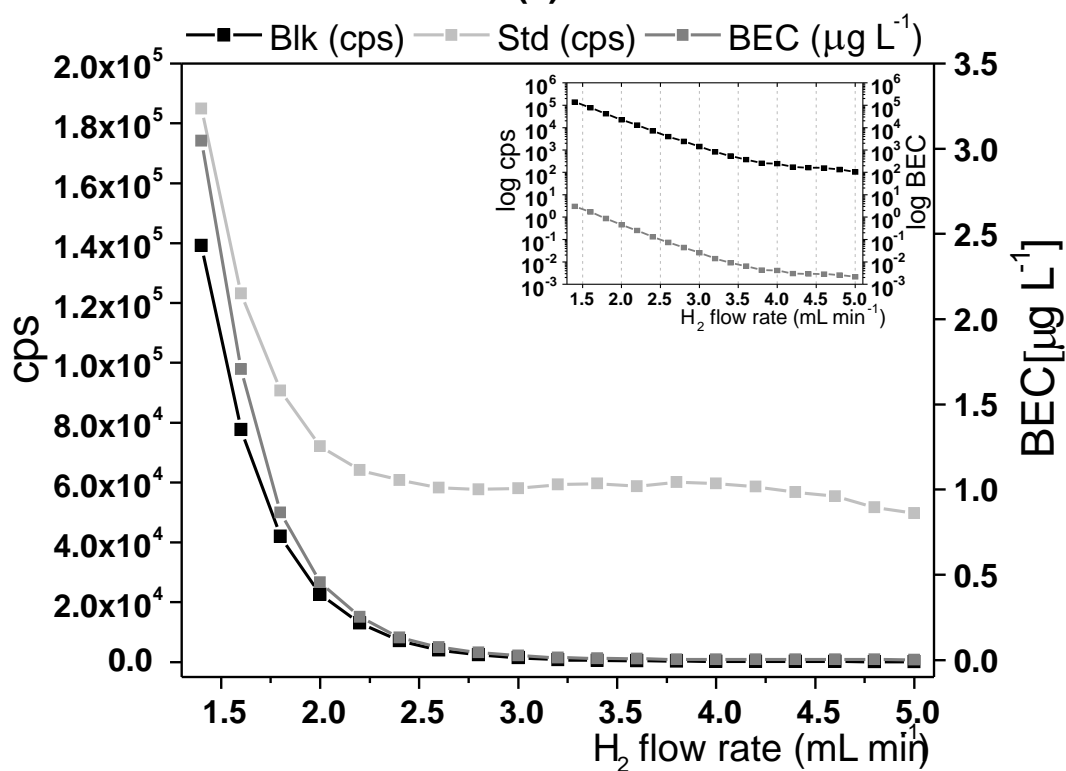


(b)

FIGURA 3.8. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ Se + $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ Cu.



(a)



(b)

FIGURA 3.9. Vazão de H_2 vs. sinal analítico e sinal de fundo para (a) $m/z=78$ e (b) $m/z=80$, respectivamente, para uma solução contendo $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ Se + $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ Zn.

O programa MassHunter do instrumento possui uma ferramenta que permite que o operador faça uma rampa da vazão do gás de reação, variando de 0,1 a 10,0 mL min⁻¹ para o hidrogênio. Para esse estudo variou-se a rampa da vazão de gás entre 1,5 a 5 mL min⁻¹. Os sinais da solução padrão, do branco e do sinal de fundo monitorados na $m/z= 80$ (b) decaem com o aumento da vazão de H₂. O mesmo não foi observado para a solução padrão e de branco para a $m/z= 78$, apenas para o sinal de fundo. A solução contendo apenas o padrão de Se foi usada para avaliar a formação do dímero de Ar. No gráfico a e b da Figura 3.2 é nítido que a partir da vazão de H₂ de 3,0 mL min⁻¹ o sinal de fundo causado pela formação do dímero de Ar é removido. Para assegurar a remoção da interferência espectral, o melhor sinal do analito e os menores sinais, de fundo e do branco foram considerados. A 2,5 mL min⁻¹ de H₂ o sinal do padrão oscila, mas é relativamente estável, porém, a partir de 3,75 mL min⁻¹ de H₂ a intensidade do sinal do padrão monitorado na $m/z= 80$ começa a decair. Dessa forma, a vazão de H₂ na ORS foi estabelecida em 3,7 mL min⁻¹. Considerando-se os gráficos para a $m/z= 80$ (b) apresentados na Figura 3.2 é notável, através dos gráficos com escala logarítmica, que a intensidade da solução padrão para a $m/z= 80$ se distingue do sinal de fundo utilizando o H₂ na ORS na vazão 3,7 mL min⁻¹, pois o sinal da solução de branco era maior que o sinal de fundo, sendo que esse sinal de fundo baixo indica que o sinal dos íons interferentes foi removido. Nos gráficos 3.3 e 3.4 (a e b), estão apresentados os resultados da avaliação da remoção do sinal de formação de espécies com dupla carga. Nessas figuras, para $m/z= 80$, os sinais da solução padrão, do branco e do sinal de fundo caem com o aumento da vazão de H₂ até que, na vazão 3,7 mL min⁻¹, o sinal de fundo foi praticamente removido, não comprometendo o sinal do padrão de Se.

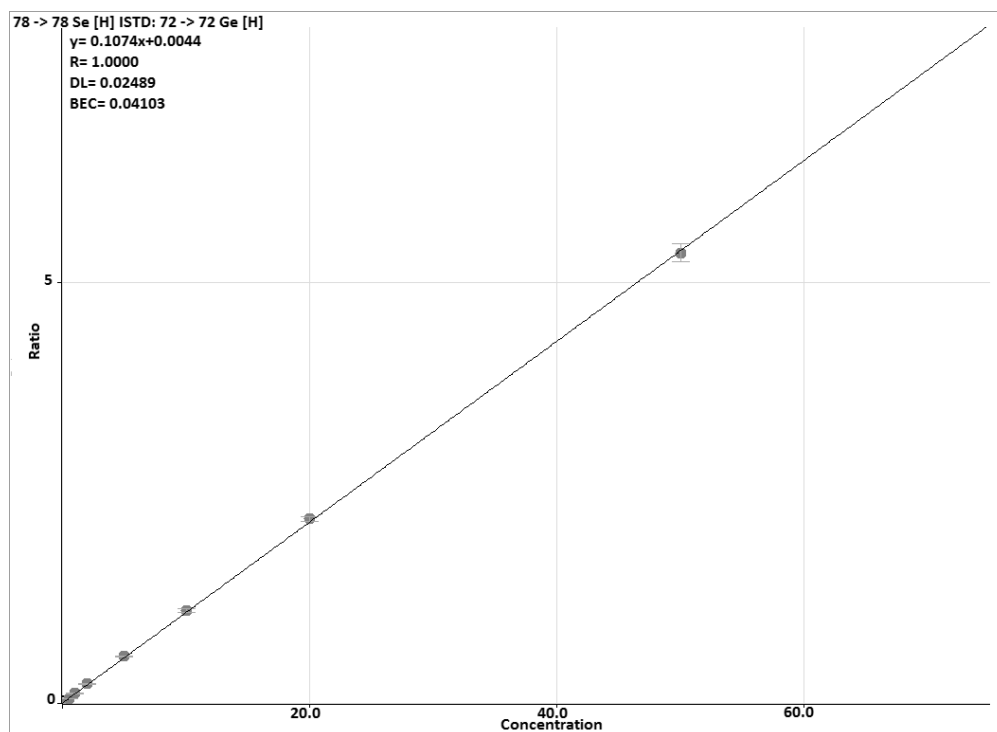
Os resultados para a avaliação da remoção da formação de óxidos são similares. Nos gráficos a e b da Figura 3.5 observa-se que o sinal de branco é maior que nas demais situações, no entanto o sinal da solução padrão monitorado pela $m/z= 80$ é alto se comparado com a intensidade da solução de branco para a mesma m/z . É importante notar que a intensidade do sinal da solução padrão para $m/z= 80$ é substancialmente maior que o sinal para $m/z= 78$, ainda que considerada a subtração do sinal da solução de branco para as respectivas m/z . Os gráficos (a) e (b) da Figura 3.6 confirmam que a formação de ArCa⁺ não é favorecida na presença de H₂, como proposto

por D'Illio et al. (2011). Observa-se no gráfico (a) da Figura 3.7 que o sinal não é afetado pela alta concentração de HBr (0,1 % v v⁻¹). Por outro lado, no gráfico (b) da Figura 3.7, há uma grande influência da presença HBr sobre o sinal da m/z= 80. Porém, apesar da influência desse interferente é possível distinguir o sinal do padrão do sinal do branco e do sinal de fundo. Entretanto, é importante notar que uma solução de concentração 0,1% v v⁻¹ de HBr é condição irreal para as amostras biológicas. O mesmo comportamento foi observado na presença de altas concentrações de Cu e Zn, elementos que podem levar à formação de óxidos, como pode ser observado nos gráficos (a e b) das Figuras 3.8 e 3.9, respectivamente.

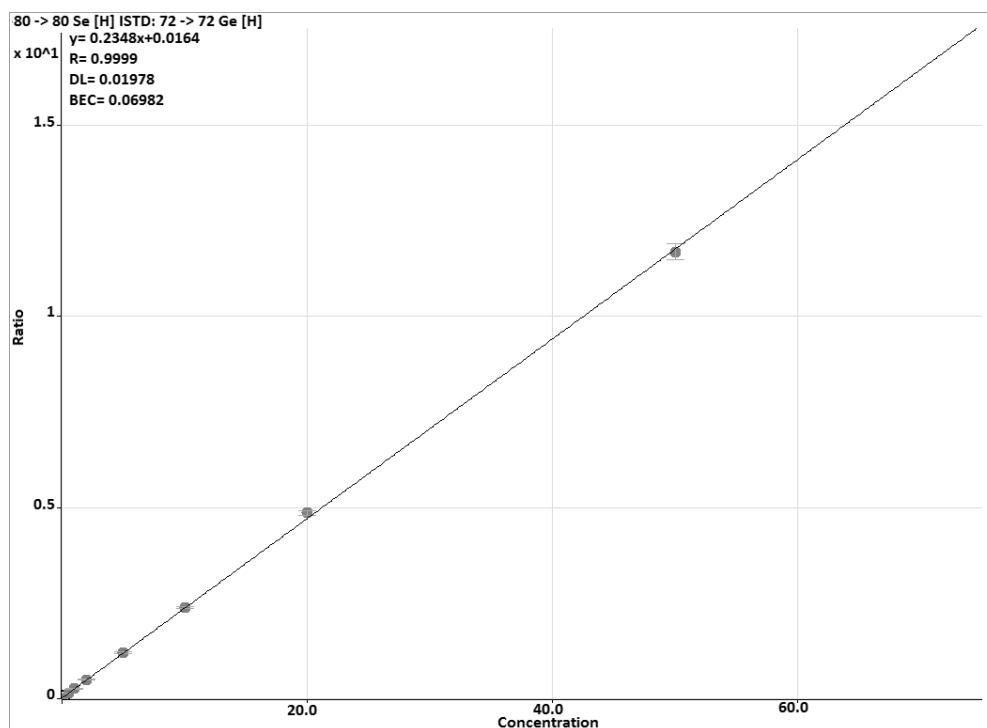
Para a determinação de Se, nas m/z= 78 e 80, curvas de calibração foram construídas a partir de soluções padrão de Se. Os limites de detecção (LOD) foram calculados de acordo com Thompsen et al. (2012), que incorporam os sinais de concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e os desvios relativos (RSD) no cálculo dos limites de detecção (LOD) Na sequência estão apresentadas as equações empregadas nesse cálculo. Os LOQs foram definidos como 3,3 vezes o LOD, calculados a partir do LOD.

$$(1) \text{BEC} = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad (2) \text{SBR} = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad (3) \text{LOD} = \frac{10 \times \text{BEC} \times \text{R.S.D.}}{100}$$

Nas quais C_{sr} é a concentração da solução referência (em $\mu\text{g L}^{-1}$), I_{sr} e I_{branco} são intensidades de sinal para a solução de referência e da solução do branco, respectivamente. As curvas de calibração para m/z= 78 e 80 estão apresentadas na Figura 3.10.



(a)



(b)

FIGURA 3.10. Curvas de calibração para Se por ICP-MS/MS usando H_2 a $3,7 \text{ mL min}^{-1}$ na ORS e Ge como padrão interno monitorando-se as m/z (Q_1 , Q_2): (a) 78, 78 e (b) 80, 80.

Cada curva de calibração possui sete pontos, variando entre 0,5 a 50 µg/kg. Os parâmetros das curvas de calibração, tanto para ⁷⁸Se como para ⁸⁰Se apresentaram valores satisfatórios e, portanto foram utilizados no cálculo das concentrações das amostras. Para ⁷⁸Se o R= 1,000 com limite de detecção de 0,0249 µg kg⁻¹ e para ⁸⁰Se, R= 0,9999 e limite de detecção de 0,0198 µg kg⁻¹, ou seja, um melhor desempenho para m/z= 80 se comparado a m/z= 78, sendo o ⁷⁸Se o isótopo mais comumente monitorado. Os LODs obtidos se mostraram inferiores aos obtidos para ⁸⁰Se. A fim de se avaliar a exatidão do método, dois diferentes CRMs foram analisados. Os valores certificados e determinados estão apresentados na Tabela 3.4.

TABELA 3.4. Resultados das análises dos CRMs por ICP-MS/MS.

Amostra	Valor certificado para Se (mg/kg)	Se 78			Se 80		
		Valor determinado (mg/kg)	Exatidão (%)	Recuperação (%)	Valor determinado (mg/kg)	Exatidão (%)	Recuperação (%)
NIST 1577c (Bovine Liver)	0,73 ± 0,06	0,81 ± 0,02	111	102	0,80 ± 0,01	109	92
NRC Dolt-4 (Fish Liver)	8,3 ± 1,34	8,53 ± 0,40	103	99	8,45 ± 0,06	102	98

$$*recuperação = \left[1 - \left(\frac{valor\ real - valor\ esperado}{valor\ esperado} \right) \right] * 100$$

Como apresentado na Tabela 3.4, a exatidão para os materiais de referencia variou entre 102-111 % e os valores de recuperação para o experimento de adição e recuperação variou entre 92-102 %, indicando eficiência do método na remoção das interferências espectrais.

3.5. Conclusões

O isótopo ⁸⁰Se pode ser facilmente monitorado pelo ICP-MS/MS operando no modo MS/MS usando hidrogênio como gás de reação para eliminação das interferências espectrais. Essa estratégia pode ser usada para melhorar a detecção de selênio em amostras com baixos teores desse elemento e para análises de especiação de selênio. Os resultados para precisão e exatidão calculados sugerem que a configuração do instrumento utilizado, caracterizado pela presença de dois quadrupolos intercalados pelo ORS favoreceu a determinação de Se em concentração traço em amostras biológicas.

Capítulo 4

**Desenvolvimento e aplicação
de método de especiação química
de selênio em amostras de
interesse agropecuário**

4. Desenvolvimento e aplicação de método de especiação química de selênio em amostras de interesse agropecuário

4.1. Introdução

O bem estar animal das inúmeras variedades pecuárias depende diretamente da qualidade da sua alimentação. As misturas de ração comercial geralmente atendem as necessidades nutricionais dos macronutrientes, mas não necessariamente para os micronutrientes, por questões econômicas e de qualidade. A concentração de minerais, vitaminas e antioxidantes nas rações desempenha um papel importante na saúde e na taxa de produção quando o gado é criado comercialmente.

O Se é um elemento essencial para a nutrição animal de mamíferos e está relacionado aos benefícios do sistema reprodutivo, músculo-esquelético e sistema imunológico. Para os mamíferos, concentrações apropriadas de selênio melhoraram o sistema imunológico, a saúde das glândulas mamárias e, o crescimento saudável, além de aumentar a atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) (EUA, 2003a).

A vitamina E é o nome coletivo dado a um grupo de compostos de ocorrência natural encontrado em oito formas diferentes: α -, β -, γ -, δ -tocoferol e α -, β -, γ -, δ -tocotrienol, antioxidantes que possuem diferentes níveis de atividade biológica, porém apenas o α -tocoferol é reconhecido para atender as necessidades humanas (EUA, 2013a). Essas moléculas atuam como antioxidantes que quebram a cadeia de reações e evitam a propagação da peroxidação lipídica (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

A combinação de Se e vitamina E na ração animal está associada ao melhoramento da nutrição animal e ao aumento da concentração de antioxidantes na dieta humana, bem como no aumento de armazenagem da carne bovina.

O óleo de canola é um óleo comestível extraído de diferentes tipos de plantas, rico em ômega 3 e ômega 6 e com um baixo teor de gordura saturada. No rúmen, as bactérias causam a saturação dos ácidos graxos, formando gorduras de baixa qualidade e que quando consumidas pelo ser humano podem implicar no aumento do colesterol ruim. Com a adição de óleo de canola e antioxidantes como a vitamina E e o selênio à ração animal, pretende-se preservar os ácidos graxos insaturados, formando

mais gorduras de alta qualidade, agregando valor a esse alimento (DUPONT et al., 1989).

4.2. Objetivo

Desenvolver um método de especiação química de Se em amostras de ração para gado enriquecidas com selênio e vitamina E e nas respectivas amostras da carne de bovinos submetidos às diferentes dietas. Os resultados podem ser empregados para avaliar as espécies químicas de Se presentes na carne e compreender como o gado metaboliza o selênio na presença de antioxidantes como a vitamina E.

Os objetivos específicos são:

- Verificar se houve o aumento da concentração de Se nas amostras de carne bovina dos animais que foram suplementados;
- Avaliar o desempenho do ICP-MS/MS para as determinações do teor total e da análise de especiação química nas amostras de ração e carne bovina;
- Desenvolver um procedimento de extração das espécies de selênio que seja facilmente aplicável para as diferentes matrizes (rações e carne bovina);
- Desenvolver um método de especiação química simples, com menor número de etapas possível e aplicável para diferentes matrizes, fazendo-se uso de uma coluna de fase reversa (C-18), a fim de que se torne um método de rotina.

4.3. Material e métodos

4.3.1. Amostras

As amostras de ração para bovinos enriquecida e a carne de bovinos que receberam dieta suplementada com selênio foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti, docente da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (Pirassununga, SP, Brasil). No experimento desenvolvido pelo Prof. Zanetti, 48 novilhos da raça Nelore foram submetidos a quatro dietas diferentes, portanto doze animais por grupo, durante 84 dias:

- (1) controle (ração animal não fortificada);

(2) óleo de canola (ração animal com adição de 3 % de óleo de canola na matéria seca (DM));

(3) antioxidantes (ração animal com 2,5 mg de selênio orgânico por kg de DM + 1000 IU de vitamina E por dia);

(4) óleo de canola + antioxidantes (ração animal com 3 % de óleo de canola em DM + 2,5 mg de selênio orgânico em DM + 1000 IU de vitamina E por dia).

As amostras de carne bovina foram obtidas do músculo *longissimus dorsi*, um músculo comercializado como contra-filé, localizado na parte traseira do animal. Preparou-se um *pool* das amostras de carne de todos os animais (n=12) de cada grupo (n=4). As amostras de ração e de carne bovina foram previamente liofilizadas, a fim de remover praticamente toda água das amostras e evitar processos oxidativos. Além disso, também foram moídas em moinho criogênico, considerando-se a futura etapa de extração, almejando-se o aumento da superfície de contato da amostra com a solução extratora. Após a moagem as amostras foram armazenadas em freezer (-18 °C) a fim de preservar a integridade das espécies originais, evitando interconversões. Antes de se iniciar as análises as amostras foram retiradas do freezer e utilizadas após atingirem a temperatura ambiente.

Dois CRMs foram empregados a fim de avaliar a exatidão do método de digestão total e a precisão do método de especiação química de Se. Os CRMs utilizados foram levedura selenizada (Selenized yeast, SELM-1, NRC, Montreal, Canada), usada para avaliar os resultados de ração animal; e o fígado bovino (Bovine Liver, NIST 1577b, Gaithersburg, MD, EUA) usado para avaliar os resultados de carne bovina. Apesar das diferenças matriciais, é importante considerar a escassez de CRMs que sejam semelhantes às matrizes avaliadas com valores certificados para os elementos de interesse. Cabe ressaltar que o CRM de levedura selenizada também foi empregado por apresentar valor certificado para SeMet.

4.3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18,2 MΩ cm), obtida em um sistema de purificação (EMD Millipore Corp., modelo Q-POD Milli-Q, Billerica, MA). Ácido nítrico ultrapuro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e peróxido

de hidrogênio 30 % m m⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) foram usados para a digestão da amostra de acordo com o programa de digestão apresentado na Tabela 3.3.

A partir de uma solução padrão de Se 10 mg L⁻¹ (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ) preparou-se uma solução intermediária de 100 µg L⁻¹. Sucessivas diluições foram realizadas na preparação das curvas de calibração para as determinações dos teores de selênio total das amostras. Uma solução multi-elementar contendo 100 µg mL⁻¹ de Ge (High-Purity Standards), usado como padrão interno, foi diluída, originando a uma solução intermediária de 500 µg L⁻¹, a qual foi adicionada às soluções padrão de calibração para se atingir a concentração final de 5 µg L⁻¹.

Para as análises de SEC, uma solução extratora contendo Tris(hidroximetil)aminometano > 99 % (Acros Organics, USA) – HCl (Fisher Scientific, Canada), dodecil sulfato de sódio (SDS) (MP Biomedical LLC) e um inibidor de protease, o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Fluka) foi preparada. A fase móvel utilizada nesse procedimento era 50 mM acetato de amônio (Fisher Scientific) em pH 7,5.

O procedimento de extração de Se das matrizes de ração, carne bovina e CRMs fez uso de uma solução salina contendo cloreto de cálcio dihidratado (5 mM), fosfato de sódio monobásico dihidratado (20 mM) e citrato de sódio monobásico (50 mM), todos adquiridos da Fisher Scientific. O pH foi ajustado com uma solução saturada de hidróxido de sódio até pH= 7,5. Um coquetel de enzimas em meio a solução salina contendo proteinase K (de *tritirachium album*), protease XIV (de *streptomyces griseus*) e pancreatina (de pâncreas suíno), todos da marca Sigma Aldrich, foi preparado.

Para o desenvolvimento e aplicação do método de especiação química soluções padrão de espécies de Se foram preparadas a partir de soluções estoque de ~1000 mg L⁻¹ feitas a partir da pesagem e diluição dos padrões sólidos de: SeMet (Acros Organics), SeCys₂, Se(IV) e Se(VI) (Sigma Aldrich). No preparo da solução de SeCys₂ algumas gotas de uma solução de HCl 3 mol L⁻¹ foram adicionadas, a fim de acidificar a solução e aumentar a solubilidade da espécie em água. A síntese do óxido de SeMet, Se-O-Met, foi baseado no trabalho de Krause et al. (2006) que propõe a oxidação do padrão de SeMet na presença de peróxido de hidrogênio. Para isso adicionou-se 500 µL de peróxido de hidrogênio 30 % m m⁻¹ ultrapuro (Fluka) ao padrão de SeMet pesados diretamente num frasco de polipropileno, sendo que a solução foi então deixada em

repouso por ~ 20 min. Em seguida adicionou-se água ultrapura e a solução que foi aquecida em banho-maria em chapa aquecedora por 1 h a 90 °C, a fim de eliminar o excesso de peróxido presente na solução. Os padrões foram transferidos para diversos frascos de polipropileno com capacidade para 2 mL e mantidos em freezer (-18 °C), sendo que um frasco de cada padrão era descongelado antes de iniciar-se as análises de especiação química.

A fase móvel utilizada nas análises de especiação química era composta por 50 mM fosfato de amônio (Fisher Scientific), 20 mM acetato de amônio (Fisher Scientific), 1 % (v v⁻¹) ACN (Fisher Scientific) e 0,1 % v v⁻¹ hidróxido de tetrabutilamônio (TBAH) em pH 6,5. O TBAH é o agente de pareamento iônico (IP, do inglês, *ion pairing*) e tem como função diminuir a polaridade dos compostos, aumentando a afinidade com a fase estacionária, no caso apolar.

4.3.3. Instrumentação

Todas as amostras foram pesadas em uma balança analítica (Mettler Toledo, modelo XS204, Vernon Hills, EUA). Os ajustes do pH das soluções foram feitos em um pHmetro (AB15, Fisher Scientific) previamente calibrado com soluções tampão (Fisher Scientific). As soluções foram agitadas em um agitador Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, EUA).

A etapa de digestão ácida das amostras foi realizada em um forno de radiação micro-ondas equipado com um rotor de 40 posições em frascos de 100 mL de PFA (MarsXpress, CEM). A determinação do teor total de Se foi realizada no mesmo ICP-MS/MS descrito no item 3.3.3, equipado com um autoamostrador (Agilent Technologies).

Para as análises de SEC, uma coluna cromatográfica TSK gel G4000SWxl (Tosoh Bioscience, LLC), cujo desempenho foi previamente avaliado fazendo uso de um padrão de filtração em gel (BioRad, USA) contendo agregados de proteínas (o qual sai logo após o volume morto da coluna cromatográfica), tiroglobulina bovina (670 kDa), Y-globulina (158 kDa), ovoalbumina (44 kDa), mioglobina equina (17 kDa) e vitamina B12 (1.35 kDa) foi usada em um sistema de HPLC (Agilent Technologies, 1100 Series HPLC) com uma bomba binária, um micro degaseificador, um autoamostrador e um

compartimento para a coluna cromatográfica termostatizado acoplado a um detector DAD com absorção na região do UV-Vis (Agilent Technologies). O resultado do desempenho da coluna cromatográfica está apresentado no cromatograma da Figura 4.1.

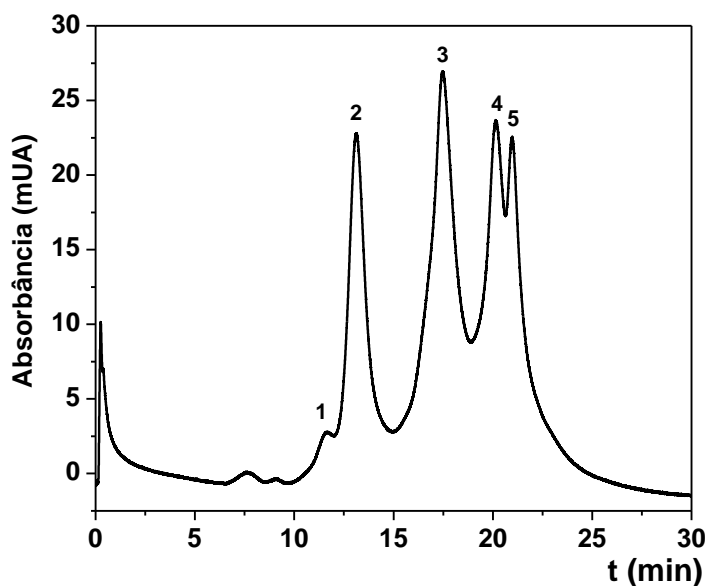


FIGURA 4.1. Cromatograma de SEC-UV-Vis dos padrões de proteínas: (1) tiroglobulina bovina (670 kDa) (RT= 11,6), (2) γ -globulina (158 kDa) (RT= 13,1), (3) ovoalbumina (44 kDa) (RT= 17,5), (4) mioglobina equina (17 kDa) (20,1) e (5) vitamina B12 (1,35 kDa) (RT= 20,9).

Para a etapa de extração de Se das amostras, uma sonda ultrassônica foi usada para promover a ruptura da parede celular das amostras operando a 80 % da potência de extrusão por 1 min, com um pulso de 1 s alternado com descanso de 1 s (Q-Sonica, Q125). Os extratos permaneceram em uma incubadora (New Brunswick Scientific, Innova 4230) e, em seguida, foram filtrados em uma microcentrífuga (Fisher Scientific, model AccuSpin™ Micro 17). Os extratos das proteínas para análise por SEC-UV-Vis-ICP-MS e das digestões enzimáticas para análise de especiação química foram centrifugados em frascos de polipropileno de 2 mL contendo um filtro com membrana de acetato de celulose não-estéril de porosidade 0,45 μm (Spin-X Centrifuge Tube Filter, Costar, EUA).

Para as análises de especiação química uma coluna de fase reversa, Zorbax SB-C18 4.6 x 250 mm, 5 μm column (Agilent Technologies), foi utilizada num sistema de HPLC (1100 Series, Agilent Technologies) acoplado ao ICP-MS/MS no modo MS/MS usando H_2 como gás de reação. As condições operacionais dos instrumentos estão apresentadas na Tabela 4.1. O programa do instrumento, MassHunter (Agilent Technologies) foi usado para monitorar o sinal de Se na $m/z=78$ e $m/z=80$ e o programa ChemStation foi usado para monitorar o sinal de UV.

TABELA 4.1. Condições operacionais do HPLC e do ICP-MS para análise de SEC e especiação química de Se.

Análise de exclusão por tamanho (SEC)	
Coluna	TSK gel G4000SWxl 7,5 x 300 mm, 8 μm
Vazão da fase móvel	0,55 mL min^{-1}
Fase móvel/ eluente	50 mM acetato de amônio em pH 7,5
Volume de injeção	100 μL
Modo de eluição	Isocrático
Análise de especiação química de Se (RP-HPLC-ICP-MS)	
Coluna cromatográfica	Zorbax SB-C18 4,6 x 250 mm, 5 μm
Vazão da fase móvel	1,2 mL min^{-1}
Fase móvel/ eluente	50 mM fosfato de amônio, 20 mM acetato de amônio, 1 % (v v ⁻¹) ACN, 0,1 % TBAH em pH 6,5
Volume de injeção	20 μL
Modo de eluição	Isocrático
ICP-MS/MS	
Potência de RF	1600 W
Profundidade de amostragem	8,3 mm
Vazão do gás de nebulização	0,95 L min^{-1}
Temperatura da câmara de nebulização	2 °C
Câmara de nebulização	Duplo passo (<i>Double-pass</i>)
Nebulizador	Micromist
Makeup/Dilution gas	0,11 L min^{-1}
Gás de reação	H_2 a 3,7 mL min^{-1}
Tempo de integração	0,3 s para análise de especiação e 1 s para determinação total de Se
Isótopos monitorados	$^{78}\text{Se} \rightarrow ^{78}\text{Se}$ $^{80}\text{Se} \rightarrow ^{80}\text{Se}$ $^{72}\text{Ge} \rightarrow ^{72}\text{Ge}$

4.3.4. Determinação do teor total de selênio

O procedimento de digestão das amostras de ração e de carne bovina, bem como dos CRMs descritos neste capítulo seguiram as mesmas etapas descritas no procedimento de preparo de amostras do item 3.3.3.

4.3.5. Extração para análise de SEC

Uma extração das proteínas solúveis foi realizada com as amostras de ração e carne bovina moídas, a fim de avaliar a incorporação de Se nas proteínas. O extrato preparado para as análises de SEC foi baseado no procedimento proposto por Pacheco, Hanley e Figueroa (2014) objetivando a extração de proteínas solúveis. Para isso, 2 mL de uma solução 30 mM Tris-HCl em pH 7,5, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,08 % m v⁻¹ e fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM foram adicionados à ~ 100 mg de amostra, misturados e macerados por ~ 3 min em um almofariz e pistilo de ágata. Os extratos foram imediatamente coletados e filtrados em um tubo de polipropileno contendo um filtro (*spin filter*) que foi centrifugado a 4000 g por 5 min. Os extratos foram analisados usando SEC-UV-Vis-ICP-MS. Duplicatas de cada amostra foram analisadas para avaliar a reprodutibilidade. A detecção dos padrões de proteínas e aminoácidos foi realizada por UV em 280 nm.

4.3.6. Extração para análise de especiação química

O procedimento consistiu na pesagem das amostras diretamente em frascos de polipropileno, sendo que, a massa pesada variou entre 50 mg e 300 mg, a depender da concentração de Se determinada ou certificada. Para amostras com alto teor de Se utilizou-se uma massa menor, e o oposto para amostras com baixa concentração desse elemento. Às amostras foram adicionados 3 mL da solução salina e essa mistura foi sonicada por 1 min, alternando-se entre 1 s ligada e 1 s desligada. Em seguida adicionou-se o coquetel de enzimas preparado no mesmo meio salino e todos os frascos foram envolvidos com papel alumínio para evitar desnaturação das enzimas pela luz. Os tubos foram levados à incubadora (37,1 °C), onde permaneceram por 24 h.

Decorrido o período de incubação os extratos foram centrifugados, filtrados em membrana 0,45 µm (*spin filter*) em uma microcentrífuga, transferidos para frascos de vidro de HPLC com septo de borracha inerte (ambos Agilent Technologies), os quais também foram envolvidos em papel alumínio para evitar interação com a luz, degradação da amostra ou interconversão de espécies. Algumas amostras foram diluídas de 2 a 10 x com a fase móvel, a fim de manter o pH próximo a 6,5 e se enquadrar no intervalo linear da curva de calibração (2 a 50 µg L⁻¹). Isso ocorreu devido a alta concentração de

Se em algumas amostras, o que sobrecarregava a coluna cromatográfica, sendo o ajuste de pH recomendado para evitar alteração dos tempos de retenção.

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Determinação do teor total

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir dos sinais analíticos das quatro replicatas das soluções de branco considerando-se o fator de diluição e a massa de amostra pesada, sendo os valores obtidos de 5,5 e 18,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Se, respectivamente (THOMPSEN, 2012). A exatidão calculada para o CRM de levedura selenizada (Selm-1) foi de 96,9 % em relação ao valor certificado ($2059 \pm 64 \text{ mg kg}^{-1}$).

Os resultados da determinação de selênio total estão apresentados na Tabela 6.2. Como esperado, a incorporação de Se pode ser observada nos resultados das amostras de carne bovina dos animais suplementados, sendo que para essas amostras a concentração de Se é três vezes maior quando comparada a amostra controle. A adição de óleo de canola nas rações não alterou significativamente a absorção ou incorporação do Se no músculo.

TABELA 4.2. Concentração de selênio total em matéria seca (mg kg^{-1}) de ração e carne bovina determinada por ICP-MS.

Amostra	Média \pm SD (n= 3) / (RSD (%))
Ração (controle)	0,25 \pm 0,01 (4,0)
Ração + óleo de canola	0,28 \pm 0,02 (7,1)
Ração + antioxidantes (selênio + vitamina E)	5,31 \pm 0,19 (3,6)
Ração + óleo de canola + antioxidantes	4,43 \pm 0,20 (4,5)
Suplemento de selênio	963 \pm 58 (5,9)
CRM SELM-1 (Valor certificado para Se: 2059 \pm 64)	1990 \pm 41 (2,0)
Carne (controle)	0,30 \pm 0,01 (3,3)
Carne + óleo de canola	0,60 \pm 0,01 (1,7)
Carne + antioxidantes	1,84 \pm 0,12 (6,5)
Carne + óleo de canola + antioxidantes	2,62 \pm 0,16 (6,1)

De acordo com a Association of American Feed Control Officials (AAFCO) (EUA, 2010) há normativas para selênio em rações animais não-suplementadas, apenas para a quantidade de selênio adicionada. O selênio pode ser adicionado à ração

completa e não deve exceder $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se em matéria seca. O Código Federal de Leis dos EUA (CFR) (EUA, 2014) preconiza o consumo de selênio em 3 mg por cabeça de gado por dia. Os resultados indicam que a ração e a ração + óleo de canola contêm $\sim 0,25 \text{ mg de Se kg}^{-1}$, e as rações suplementadas contêm $\sim 5 \text{ mg Se kg}^{-1}$. Os resultados indicam que a concentração de selênio está de acordo com as normativas da AAFCO, e a suplementação (com adição de antioxidantes) implicou num aumento da concentração num fator de ~ 20 .

4.4.2. Caracterização das amostras por LC-SEC

As análises de LC-SEC acoplado aos detectores de UV e ICP-MS em série foram realizadas para caracterizar as amostras e avaliar a necessidade da extração enzimática de selênio das proteínas. De forma geral, os resultados apresentaram a mesma tendência para cada grupo, de rações animal e carne bovina, e por essa razão será apresentado apenas um cromatograma de cada grupo. Um extrato de uma amostra de carne bovina também foi analisado após a extração enzimática, com o propósito de remover o Se ligado às proteínas das matrizes. Na Figura 4.2 estão apresentados os cromatogramas obtidos após os extratos passarem pela coluna de exclusão por tamanho de: (a) ração animal, e (b) carne bovina.

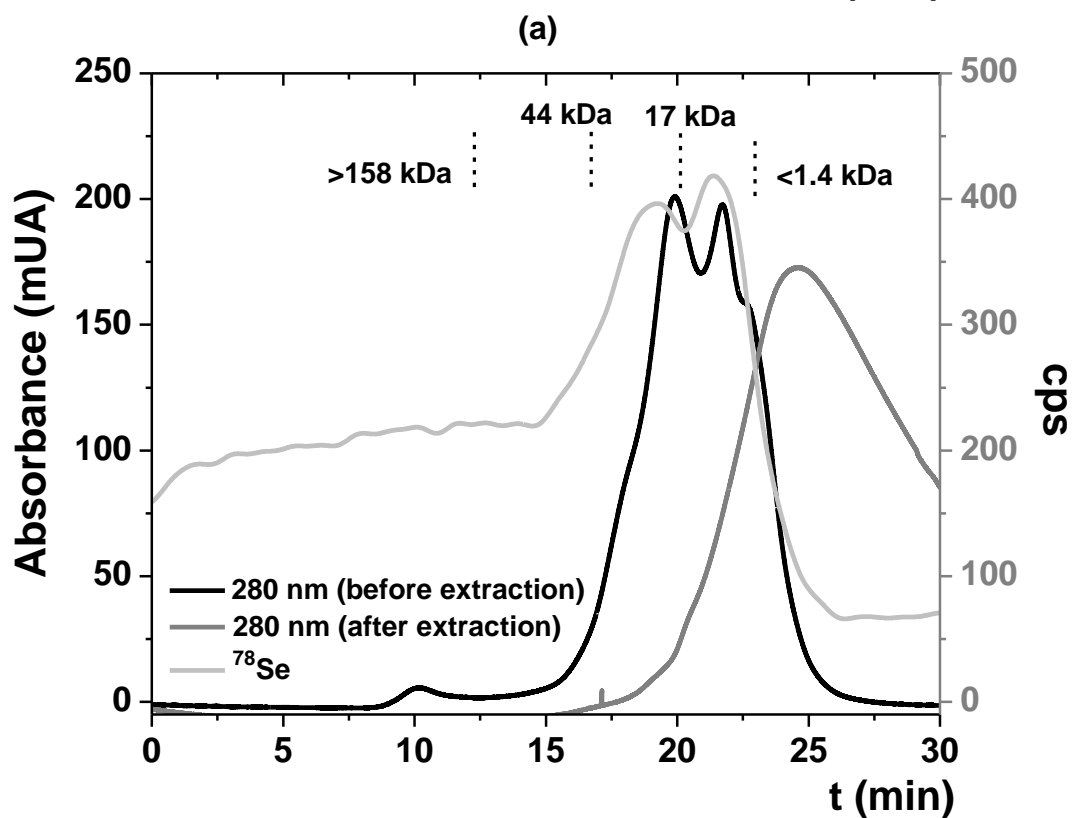
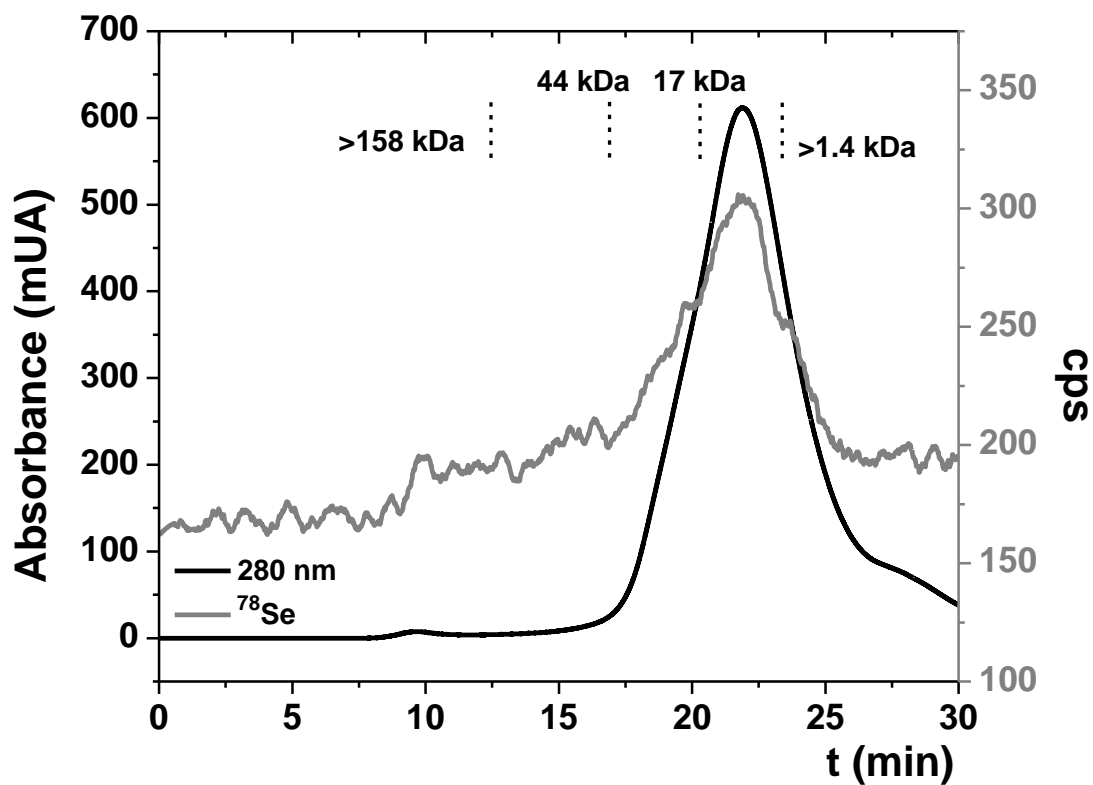


FIGURA 4.2. Cromatogramas de SEC-UV-ICP-MS para $\lambda = 280$ e $m/z = 78$ e nm para amostras de (a) ração animal e (b) carne bovina, respectivamente.

Na cromatografia de exclusão por tamanho a coluna cromatográfica funciona como uma peneira molecular, separando as frações que variam de alta massa molecular (HMW) como DNA, RNA e outros, até frações de baixa massa molecular (LMW) de proteínas de cadeia curta e/ou aminoácidos.

Observa-se na Figura 4.2 que na ração animal o selênio está ligado à fração de média massa molecular, enquanto na carne o selênio está incorporado em frações de média e baixa massas moleculares. Daun et al. (2004) fizeram análises de SEC-ICP-MS para diferentes tecidos animais, incluindo músculo bovino e encontraram que picos que variaram entre 2 e 200 kDa podem representar proteínas contendo selênio.

De forma geral, os cromatogramas apresentados na Figura 4.2 indicam que o selênio está basicamente incorporado à fração de média massa molecular. Uma extração enzimática foi realizada a fim de promover a extração de Se das matrizes. A curva de calibração foi construída (sem a coluna cromatográfica) integrando-se a área dos cromatogramas e estimou-se que o selênio extraído da fração analisada corresponde a ~ 80 % do selênio total das amostras de carne bovina. Os cromatogramas de SEC-UV-ICP-MS apresentados na Figura 4.2 (b) foram obtidos de extratos coletados de uma amostra de carne liofilizada e moída e da mesma amostra após ser submetida ao procedimento de extração enzimática de selênio. Nesses cromatogramas é possível observar que as amostras que sofreram a digestão enzimática não contém uma concentração substancial de proteínas intactas, pois não há absorvância registrada antes do marcador de massa molecular em 1,3 kDa.

4.4.3. Extração de selênio e análise de especiação química

Na análise de especiação química a etapa de extração é considerada a mais laboriosa e complexa. Para esse estudo diversos procedimentos de extração foram testados, dentre esses: (a) água; (b) metanol 5 % (v v⁻¹); (c) enzimática (proteínase K, pancreatina, tripsina) em meio de tampão Tris-HCl pH= 7,5; (d) enzimática (proteínase K, protease XIV e pancreatina) em meio de tampão Tris-HCl pH= 7,5; e (e) enzimática (proteínase K, protease XIV e pancreatina) em meio salino (cloreto de cálcio, fosfato de sódio e citrato de amônio) pH= 7,5. Na digestão enzimática diversos parâmetros foram

avaliados e otimizados: pH, concentração dos solventes, combinação de enzimas, tempo e temperatura de incubação. Os melhores resultados em função da exatidão calculada considerando-se o teor total como valor de referência e o teor de Se encontrado nos extratos após filtrá-lo e submetê-lo a uma digestão ácida foi obtido com o procedimento de extração (e) incubado a 37,1 °C por 24 h. Esse procedimento foi baseado em artigo publicado por Phipps et al. (2008), no qual foi realizada a extração de selênio em amostras complexas, tais como; sangue, leite e queijo.

Na literatura muitos trabalhos combinam técnicas com o intuito de aprimorar a eficiência de extração de Se. Capelo et al. (2004) propuseram o uso da sonda ultrassônica para efetuar a hidrólise enzimática em levedura para estudos de especiação de selênio, e a partir dos resultados pode-se observar que, após otimização do tempo de sonicação a exatidão do método alcançou 87 %. Cuderman et al. (2010) utilizaram nitrogênio líquido para promover a quebra da parede celular antes da adição de enzimas e isso implicou num aumento de 20 % para mais de 50 % na extração de Se(VI). Para o procedimento adotado, baseou-se no valor certificado de Se no CRM Selm-1 (levedura selenizada) para avaliar a exatidão do procedimento das amostras de ração, determinada por ICP-MS. Foi obtido o teor de $2124 \pm 255,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($n = 2$) (RSD = 12%), valor próximo ao valor certificado. A eficiência de extração para as amostras de ração para gado alcançou $60 \pm 5\%$ de exatidão calculada, sendo que os teores nas amostras variaram entre $47,6 (\pm 2,2) - 89,5 (\pm 0,1)\%$. Para avaliar a exatidão desse procedimento para as amostras de carne bovina utilizou-se o material certificado de fígado bovino e obteve-se $99 \pm 14\%$ de exatidão calculada, sendo que os teores nas amostras variaram entre $103 (\pm 5) - 123 (\pm 11)\%$. A separação das espécies foi realizada fazendo uso de padrões individuais e seus correspondentes tempos de retenção (RTs). Na Figura 4.3 estão apresentados os cromatogramas dos padrões individuais e da solução contendo a mistura desses.

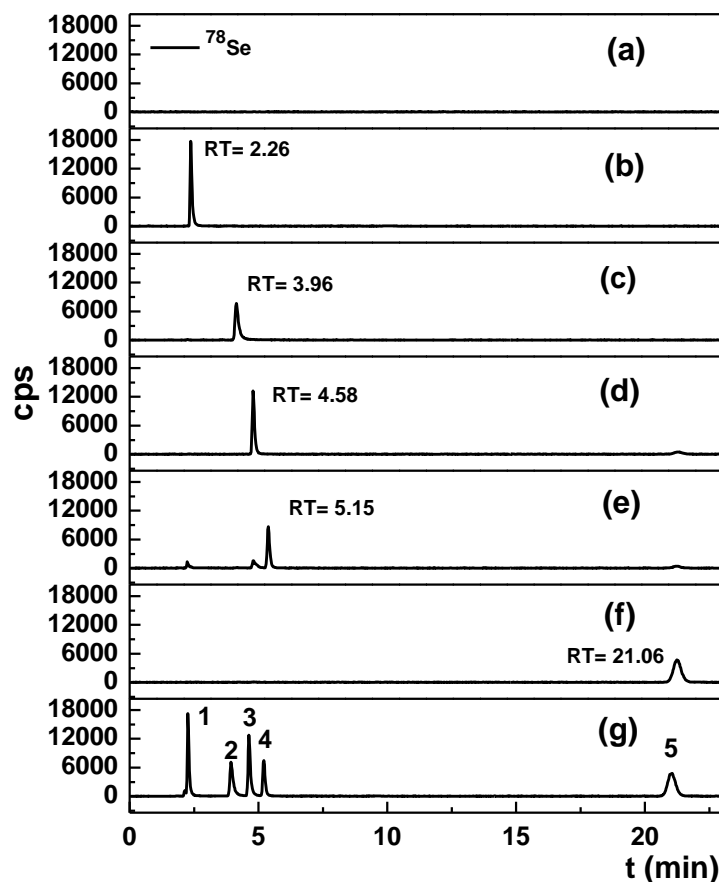


FIGURA 4.3. Cromatogramas de RP-ICP-MS para soluções padrão de espécies de Se $20 \mu\text{g L}^{-1}$: (a) fase móvel, (b) SeCys₂ (RT = 2,3), (c) SeMet (RT = 3,9), (d) Se(IV) (RT = 4,6), (e) Se-O-Met (RT = 5,1), (f) Se(VI) (RT = 21,1), e (g) solução contendo padrões de Se em meio de fase móvel: SeCys₂ (RT₁ = 2,3), SeMet (RT₂ = 3,9), Se(IV) (RT₃ = 4,6), Se-O-Met (RT₄ = 5,2), e Se(VI) (RT₅ = 20,3).

O uso da cromatografia líquida no modo gradiente está associado à variação da concentração e/ou composição dessa. A variação na composição da fase móvel é o aumento da porcentagem de composição do solvente orgânico numa taxa constante ao longo da corrida cromatográfica, o que implica na eluição mais rápida dos compostos. No caso do cromatograma apresentado na Figura 4.3 (g), se operado no modo gradiente levaria ao aumento da concentração de ACN a partir dos 5 primeiros minutos da corrida e promoveria o deslocamento da última espécie a ser eluída (Se(VI)) para um tempo de retenção menor, diminuindo o tempo da corrida cromatográfica. Por outro lado, o aumento da concentração do solvente orgânico na fase móvel acarretaria a deposição de carbono nos cones de amostragem e *skimmer*, além da desestabilização

e extinção do plasma. Dessa forma optou-se pelo uso do modo isocrático mesmo que isso implicasse num tempo de corrida cromatográfica mais longo, porém mantendo a robustez do método (MONTASER, 1998).

As curvas de calibração foram preparadas diariamente em meio da fase móvel e sua faixa linear variava entre 2 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. É importante ressaltar que a saturação da curva de calibração através da injeção de altas concentrações de padrão pode levar a efeitos de memória, com eluição de espécies nas corridas subsequentes e, implicar na alteração dos RTs uma vez que os sítios ativos estejam ocupados. Por essa razão é ideal que a curva de calibração seja feita com baixas concentrações. As curvas de calibração foram elaboradas com os resultados da integração da área dos picos cromatográficos pelo programa MassHunter. Na Figura 4.4 estão apresentadas as curvas de calibração, bem como equação e coeficiente de correlação (R^2) das retas.

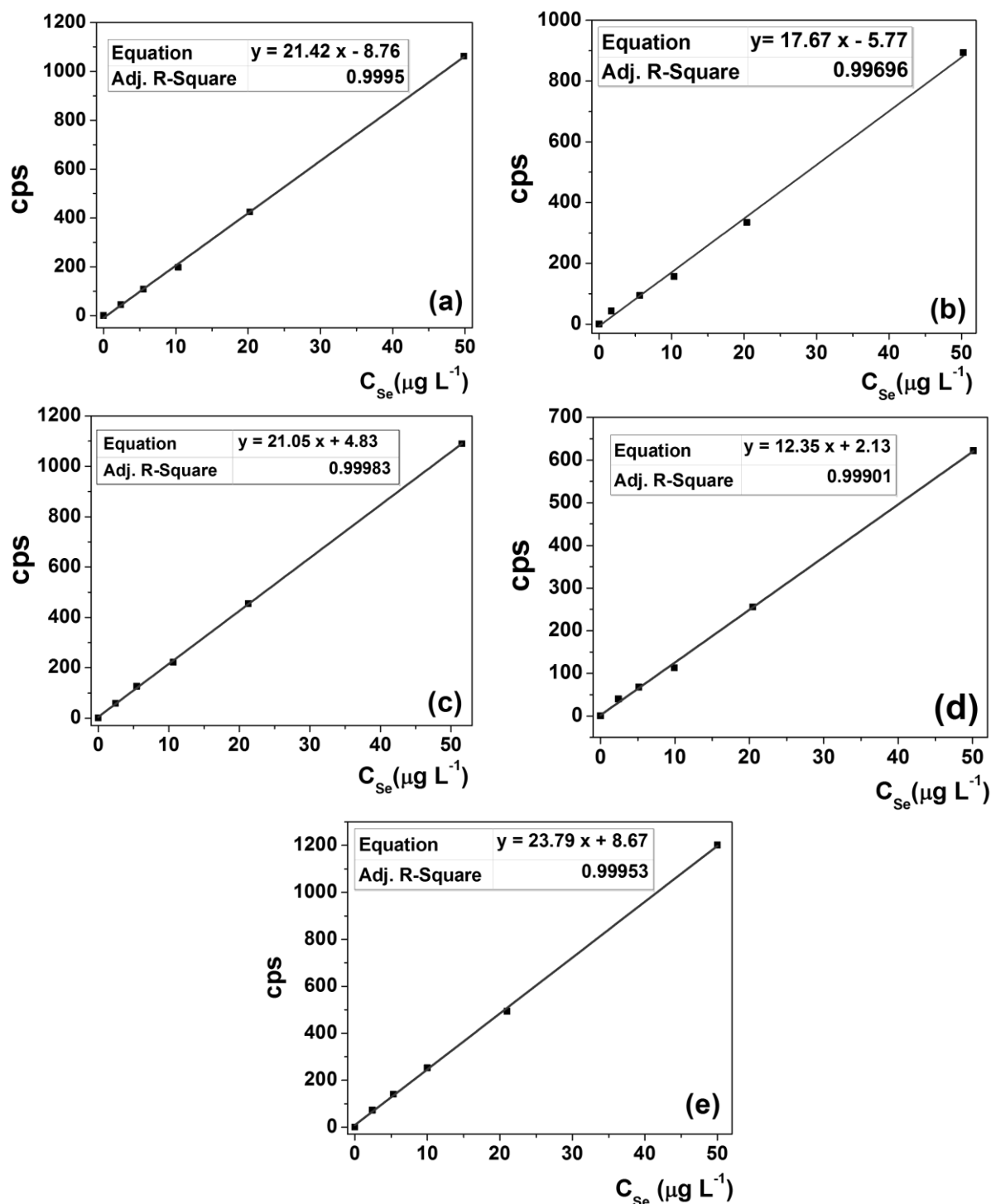


FIGURA 4.4. Curvas de calibração dos padrões de Se obtidas por RP-ICP-MS (2 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$): (a) SeCys_2 , (b) SeMet , (c) Se(IV) , (d) Se-O-Met , e (e) Se(VI) .

Um teste de avaliação da coluna cromatográfica foi realizado para avaliar se houve retenção de espécies na mesma. Esse teste foi realizado com os extratos das

amostras de carne bovina. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.3 e pode-se inferir que a coluna apresentou desempenho adequado comparando-se os resultados obtidos para a soma das espécies majoritárias das análises realizadas com uso da coluna em relação ao resultado de recuperação do teste sem a coluna.

TABELA 4.3. Teste de recuperação com e sem coluna cromatográfica de fase reversa.

Condição	Amostras	SeCys ₂		SeMet		Soma das espécies	
		[Se] (mg kg ⁻¹)	% Rec	[Se] (mg kg ⁻¹)	% Rec	Sum of [Se] (mg kg ⁻¹)*	Sum of %
Com coluna	Carne (controle)	0,16	54,0	0,17	57,0	0,33	111
	Carne + óleo de canola	0,23	38,2	0,37	61,8	0,60	100
	Carne + antioxidantes	0,10	5,3	1,83	99,3	1,93	105
	Carne + óleo de canola + antioxidantes	0,07	2,5	2,96	113	3,02	115
Sem coluna	Amostras	[Se] (mg kg ⁻¹)**	% Rec				
	Carne (controle)	0,26	86,9				
	Carne + óleo de canola	0,48	105				
	Carne + antioxidantes	2,96	158				
	Carne + óleo de canola + antioxidantes	3,63	144				

*Resultados de especiação química.

**Resultados baseados na curva de calibração (10-250 µg L⁻¹) por HPLC-ICP-MS sem fase estacionária (y= 42,4 x + 40,1, r²=0,9999).

Os cromatogramas apresentados na Figura 4.5 são correspondentes às amostras de todas as rações, sendo: (a) ração (controle), (b) ração + óleo de canola, (c) ração + Se + vitamina E, (d) ração + Se + vitamina E + óleo de canola, (e) suplemento selênico, e (f) CRM SELM-1.

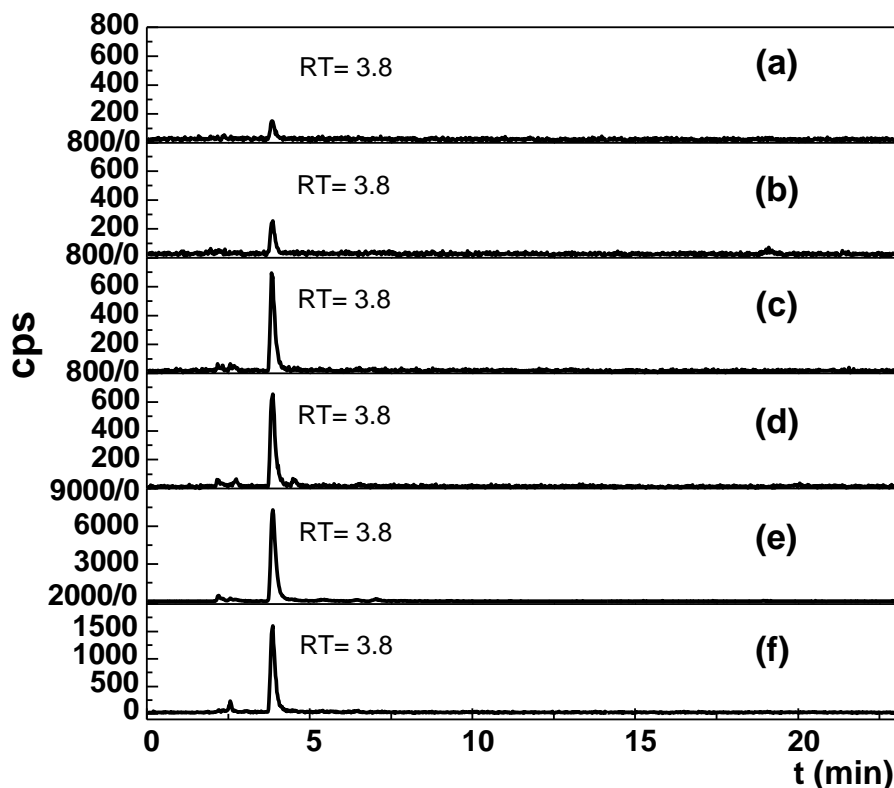


FIGURA 4.5. Cromatogramas obtidos por RP-ICP-MS da análise de especiação de selênio das amostras de rações: (a) ração controle, (b) ração + óleo de canola, (c) ração + antioxidantes, (d) ração + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM SELM-1. Os RTs estão baseados na separação das espécies de Se apresentado na Figura 4.3.

Para todas as rações, independente do tipo, SeMet foi a espécie majoritária encontrada nos extratos, representando no mínimo 90% da área cromatográfica de selênio. Os cromatogramas apresentados na Figura A1 do Apêndice A pertencem às amostras de ração animal com adição de padrão das espécies de selênio, e a partir da área integrada dos picos cromatográficos, calculou-se os valores de recuperação e a soma das porcentagens das espécies de Se referente à adição de padrão de cada espécie ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de ração e CRM de levedura. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.4.

TABELA 4.4. Porcentagens de recuperação da adição de padrão de espécies de selênio ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de rações e CRM de levedura (SELM-1) para RP-ICP-MS, e soma das porcentagens de cada espécie.

Amostras Espécies	Branco das rações	Ração (controle)	Ração + óleo de canola	Ração + antioxidantes	Ração + óleo de canola + antioxidantes	Suplemento de selênio	CRM SELM-1
% SeCys ₂	63,0	63,2	77,8	70,9	63,9	129	187
% SeMet	107	185	149	159	124	200	213
% Se(IV)	93,6	144	73,3	118	107	216	243
% Se-O-Met	118	166	138	133	107	203	226
% Se(VI)	99,2	175	147	131	115	244	264
Σ espécies (%)	-	52,4	58,2	62,1	70,2	78,4	89,5

As recuperações de SeMet para todas as amostras de ração variaram entre 100- 185% (Tabela 4.4). Os altos valores de recuperação podem estar associados a diversas fontes de inserção de erros como: (1) pesagem de baixas massas (de amostras) a fim de atender aos (2) altos fatores de diluição (~ 500 x) e (3) sobrecarga da fase estacionária devido às altas concentrações de Se.

Foram realizadas análises de especiação para as amostras de carne bovina pelo acoplamento RP-ICP-MS, sendo os cromatogramas apresentados na Figura 4.6, na qual: (a) ração controle, (b) ração + óleo de canola, (c) ração + antioxidantes, (d) ração + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM SELM-1.

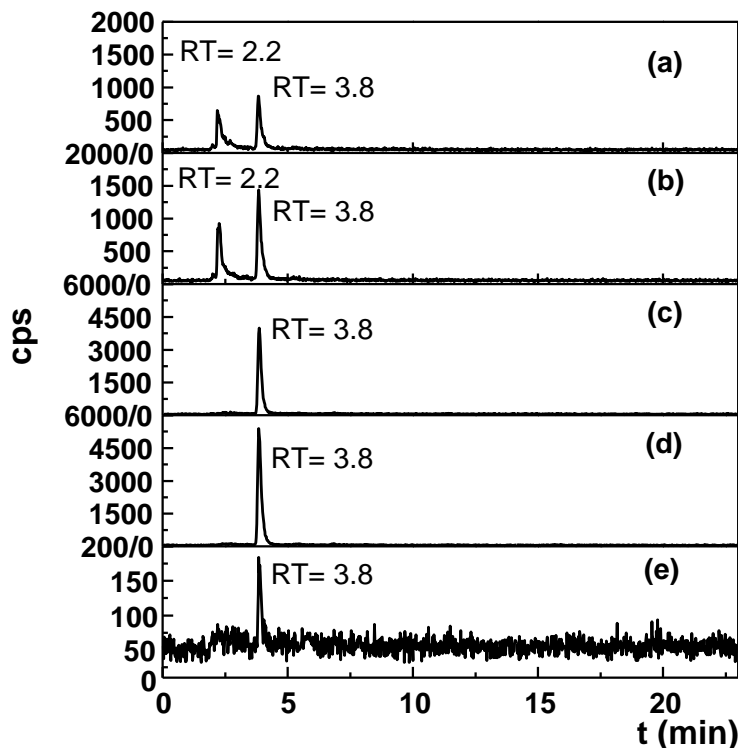


FIGURA 4.6. Cromatogramas obtidos por RP-ICP-MS da análise de especificação de selênio das amostras de carne bovina: (a) carne controle, (b) carne + óleo de canola, (c) carne + antioxidantes, (d) carne + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM de fígado bovino. Os RTs estão baseados na separação das espécies de Se apresentado na Figura 4.3.

Para as amostras controle e sob dieta com “+ óleo de canola” os picos coincidem os com RT das espécies SeCys_2 e SeMet (Figura 4.6 (a) e (b)). A SeMet foi a única espécie detectada nas amostras de carne submetidas a dieta com adição de “+ antioxidantes” e “+antioxidantes + óleo de canola” (Figura 4.6 (c) e (d)). A Figura 4.6 (e) é referente ao extrato do SRM de fígado bovino, o qual contém SeMet como espécie primária. Na Tabela 4.5 estão apresentados os resultados de recuperação e a soma das porcentagens das espécies de Se referente à adição de padrão de cada espécie ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de carne bovina e CRM de fígado bovino.

TABELA 4.5. Porcentagens de recuperação da adição de padrão de espécies de selênio ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de carne bovina e CRM de fígado bovino (NIST 1577b) para RP-ICP-MS, e soma das porcentagens de cada espécie.

Amostras Espécies	Branco para carne	Carne (controle)	Carne + óleo de canola	Carne + antioxidantes	Carne + óleo de canola + antioxidantes	SRM <i>Bovine</i> <i>Liver</i> (1577b)
% SeCys ₂	85,7	68,7	105	47,3	23,4	49,0
% SeMet	129	116	176	87,6	127	96,5
% Se(IV)	82,1	54,8	73,0	66,5	24,2	67,0
% Se-O-Met	95,1	2,22	3,44	102	51,4	74,1
% Se(VI)	86,9	67,3	101	88,1	40,4	67,4
Σ espécies (%)	-	112	104	110	123	53,6

A partir dos resultados pode-se inferir que não houve interconversão de espécies a partir das amostras de rações enriquecidas para a carne bovina, ou a SeMet biodisponível foi incorporada pelas proteínas. Como esperado, a concentração de SeMet nas amostras de carne bovina são maiores nas amostras enriquecidas em comparação às amostras não enriquecidas. No entanto, esse aumento (~ 3 vezes) foi inferior ao esperado, com base na concentração de SeMet presente nas respectivas dietas (uma diferença de ~20 vezes entre ração enriquecida e controle).

A presença de SeCys₂ indica que a SeMet estava originalmente presente nas amostras de ração e foi metabolizada pelo gado para formar outras espécies de Se (talvez selenoaminoácidos), que não a SeMet. Estudos prévios na literatura sugerem que a detecção de SeCys₂ depende da presença de selenoproteínas com SeCys incorporada, visto que a SeCys₂ é um dímero da SeCys. Dernovics e Lobinski (2008) avaliaram os metabólitos do extrato aquoso de levedura selenizada para verificar quais espécies estariam presentes, e verificaram a formação de SeCys₂ mesmo relatando que a SeCys tinha sido extraída da fração não incorporada à proteínas. Entretanto, o composto aqui reportado com o mesmo tempo de retenção da SeCys₂ (confirmada pela adição de padrão), será apresentado como SeCys₂, embora conclusões não possam ser tiradas sobre sua forma original (em particular como parte da selenoproteína, SeCys), removida pelo processo de extração de dentro do tecido da carne. Porém, isso representa uma potencial via metabólica para a incorporação direta de SeMet de uma selenoproteína.

Pedrero et al. (2011) realizaram análise de especiação química de selênio em amostras de tecido de peixes incluindo músculo, no qual foi detectada SeMet como espécie predominante. No entanto, observou-se que a distribuição de

selenoaminoácidos está relacionada ao tipo de tecido animal. No fígado constatou-se que a SeCys₂ era a espécie predominante, apesar da cautela relacionada a análise da espécie SeCys₂, enquanto nos rins ambas as espécies, SeMet e SeCys₂, foram reportadas. A mesma tendência foi observada para vacas leiteiras lactantes submetidas a uma dieta com suplementação com selenito de sódio e levedura selenizada; a especiação de selênio em amostras de sangue, leite e queijo confirmou os resultados (PHIPPS et al., 2008). Os resultados indicaram que nas amostras de sangue a concentração de SeCys₂ era superior a de SeMet, e a maior concentração foi obtida a partir da suplementação com a levedura selenizada. O oposto foi observado para amostras de leite, nas quais a concentração de SeMet era substancialmente superior a de SeCys₂. Essa diferença ainda foi ampliada com o aumento da quantidade de levedura selenizada na dieta. É notável que nos dois trabalhos, Pedrero et al. (2011) e Phipps et al. (2008), os métodos considerados apropriados foram baseados no trabalho de Dernovics e Lobinski (2008).

4.5. Conclusões

O método de especiação química de Se desenvolvido, aplicável a dois tipos de matrizes, rações e carne bovina, consistiu numa extração enzimática com um coquetel de proteases e no emprego de uma coluna de fase reversa fazendo uso de um íon de pareamento acoplado ao ICP-MS. O procedimento de extração foi considerado eficiente em relação aos resultados reportados na literatura, e o método foi robusto, provando sua utilidade em aplicações similares no futuro. SeMet foi considerada a espécie prevalecente em todas as amostras de ração usadas nesse estudo, mesmo para as rações sem adição de Se. A adição de óleo de canola na ração animal não influenciou a absorção ou o metabolismo do Se. Um aumento de 20 vezes no Se orgânico nas rações enriquecidas causou um aumento de 3 vezes na concentração de Se e na síntese de selenoproteínas nas amostras de carne bovina dos animais suplementados. As amostras de carne bovina de animais não suplementados com Se orgânico continham SeMet e possivelmente SeCys₂. Para as amostras dos animais com adição de Se orgânico na dieta apenas SeMet foi detectado. Essa é uma evidência que sustenta o conceito da dosagem baseada na adição de Se orgânico, que espécies orgânicas são mais bioacessíveis.

Capítulo 5

**Especiação de selênio em rações
animais comercializáveis
(para aves, suínos e bovinos)**

5. Especiação de selênio em rações animais comercializáveis (para aves, suínos e bovinos).

5.1. Introdução

Nos EUA a necessidade da suplementação animal surgiu a partir de estudos no solo que comprovaram a heterogeneidade na distribuição de selênio na superfície do país, como apresentado na Figura 5.1 (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012; EUA, 2012). Essa prática está atrelada ao benefício desse elemento ao animal e ao consumidor final quando ingeridas em concentrações adequadas, como descrito no item Revisão da Literatura.

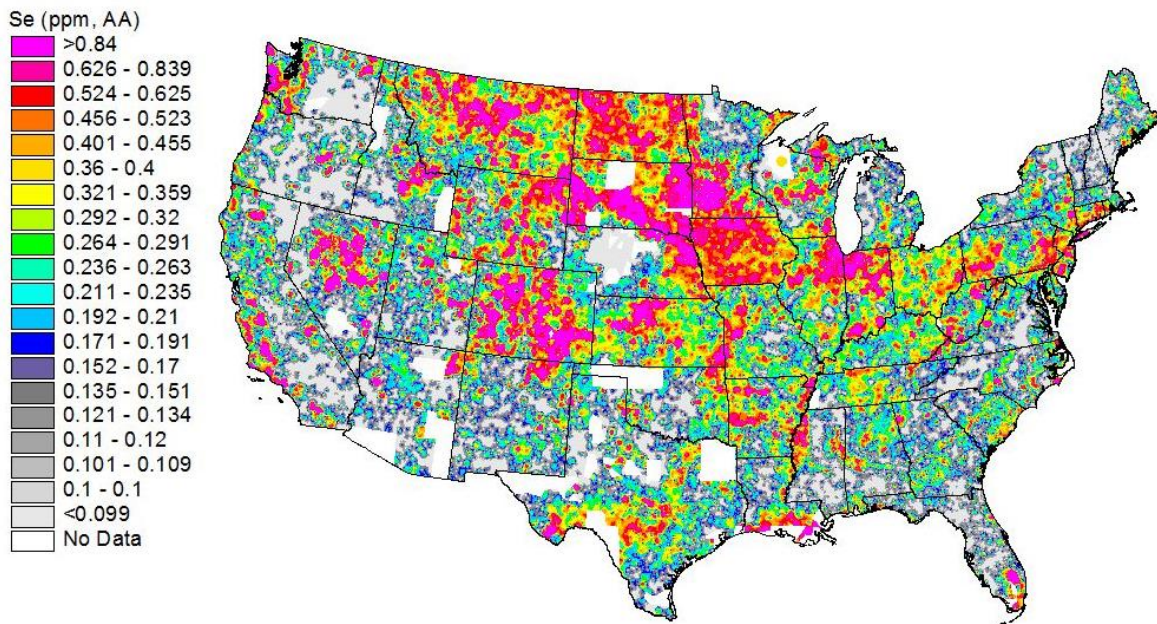


FIGURA 5.1. Mapa dos EUA da distribuição de selênio em amostras de solo coletado em diferentes localidades. Fonte: http://mrddata.usgs.gov/geochem/map/image/lower48/se_aa.jpg

Selênio é comumente adicionado às rações animais de suínos, aves, ovinos, gado de leite e corte, além dos caprinos, patos, cavalos, búfalos, peixes (no caso da piscicultura) e outros. Das formas de selênio adicionadas às rações animal estão o selenato de sódio (Na_2SeO_4) e selenito de sódio (Na_2SeO_3), que são fontes mais baratas de suplementação, e o selênio orgânico, geralmente adicionado às rações através de leveduras selenizadas (*Saccharomyces cerevisiae*). Aproximadamente 10 x mais caro

que as fontes inorgânicas, são fungos cultivados que, em presença de selênio inorgânico metabolizam e produzem grande quantidade de SeMet (> 65%) (ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY, 2015).

Para as aves, a GPx participa dos processos antioxidantes celular, desempenhando o papel de defesa da célula até mesmo dentro do ovo, sendo, a espécie orgânica, diz-se SeMet, a mais efetiva, apesar das espécies inorgânicas (selenito e selenato) serem mais amplamente usadas nas dietas suplementadas. Sem reserva de Se o animal não tem capacidade de sintetizar selenoproteínas, e sob condições de estresse há a superprodução de radicais livres e oxidação lipídica que implica no decréscimo da produtividade e no desempenho reprodutivo, além do aumento da susceptibilidade de morte. Atualmente a deficiência ou o excesso de Se na dieta não é comum na produção de aves e a suplementação é um fator crucial na manutenção da alta produtividade e na reprodução de aves em larga escala (SURAI, 2002a; SURAI, 2002b).

Na dieta de gado leiteiro e de corte, o selênio desenvolve o mesmo papel na proteção dos danos causados pelo processo oxidativo, e as espécies orgânicas são mais facilmente absorvidas pelo organismo do animal (SUBCOMMITTEE ON BEEF CATTLE NUTRITION, 1978; SUBCOMMITTEE ON DAIRY CATTLE NUTRITION, 1984). Casos de prejuízo em larga escala foram notificados em países europeus, nos quais o rebanho apresentou insuficiência reprodutiva, crescimento irregular, doença do músculo branco, que atinge principalmente cordeiros e bezerros e envolve um conjunto de alterações bioquímicas que ocorre nos músculos em função da deficiência de selênio, de vitamina E ou de ambos os elementos, que levam a debilidade muscular, tremores ou até mesmo a morte súbita do animal (MAAS et al., 2006).

No caso dos suínos as espécies orgânicas são absorvidas pelo organismo, mas numa taxa menor se comparada à absorção das espécies inorgânicas. No entanto, após absorvido e incorporado o papel desenvolvido é o mesmo, retardar processos oxidativos naturais, além de aprimorar o sistema imunológico e reprodutivo (MILLER, ULLREY E LEWIS, 1991).

Baseado nas normativas vigentes 21 CRF 573 (EUA, 2015) e no manual de elaboração, modelo e formatação de rótulos para comida animal (EUA, 2010) o Dr. Kevin Kubachka

do U.S. FDA Forensic Chemistry Center e o Dr. Joseph Caruso do Metallomics Center do Departamento de Química da Universidade de Cincinnati, Cincinnati, OH, nos EUA estabeleceram uma parceria para o desenvolvimento de um método oficial que envolvesse a análise do teor total e de espécies de selênio em diversas amostras de ração animal (de aves, suínos e bovinos) a fim de assegurar que o produto comercial atenda às necessidades do animal e seja apropriado para o consumo, além de avaliar se as embalagens estão adequadas no que diz respeito ao conteúdo e ao modo de uso. O desenvolvimento de um método oficial de uma agência regulamentadora deve ser robusto, envolver procedimentos exequíveis e simples, considerar possíveis interferentes, ter limites de detecção e/ou quantificação desejáveis e fazer uso de equipamentos existentes e comercializados. O outro objetivo do projeto era avaliar se a espécie de selênio detectada na ração era condizente com a informação disponível no rótulo. Os rótulos das embalagens dos produtos comercializados de ração animal, misturas multivitamínicas e suplementos devem conter as informações descritas de composição da fórmula e concentração adicionadas ao composto. O não cumprimento dessas normas é enquadrada como violação à lei.

Das violações a essas leis considera-se: (1) adição de uma concentração inferior à informada no rótulo do produto; (2) concentração muito superior à informada no rótulo; (3) espécie de selênio detectada diferente da informada considerada adulteração com benefício econômico.

5.2. Objetivos

Desenvolver métodos analíticos que levem ao cumprimento nas normativas americanas vigentes supracitadas no que diz respeito a concentração de selênio usado como aditivo (ou medicamentoso) em rações animal.

Os objetivos específicos são:

- Determinar o teor total de Se em diversas amostras de ração animal comerciais utilizando o método oficial 4.7 do manual de análise elementar (EAM, do inglês *elemental analysis manual*) do FDA (FDA EAM 4.7) dos EUA e, verificar se os resultados atendem a legislação e são concordantes com o valor disposto no rótulo do produto;

- Desenvolver um procedimento de extração das espécies de selênio que seja facilmente aplicável para essa matriz;
- Aplicar o método de especação química de selênio desenvolvido e apresentado no Capítulo 4 em amostras de ração enriquecida para aves, suínos e gado por RP-ICP-MS. Essa informação pode ser usada para avaliar as espécies presentes nessas rações para futuro estudo de biodisponibilidade das espécies para os animais.

5.3. Material e métodos

5.3.1. Amostras

As amostras utilizadas nesse estudo foram gentilmente doadas pelo Departamento de Agricultura do estado de Minnesota nos EUA. A seguir é apresentada a lista das amostras empregadas neste estudo, e no Apêndice B estão dispostas as reprografias das embalagens das mesmas.

- (1) Ração completa para frangos- embalagem sugere adição de selenito de sódio.
- (2) Ração completa para suínos- embalagem sugere adição de levedura selenizada.
- (3) Ração completa para frangos- embalagem não indica a fonte de selênio na lista de ingredientes.
- (4) Premix para suínos- embalagem sugere adição de selenito de sódio
- (5) Ração completa para suínos- embalagem sugere adição de selenito de sódio e levedura selenizada.
- (6) Sal mineral para gado de corte- embalagem sugere adição de selenito de sódio

Algumas definições sobre as amostras utilizadas:

- Premix (vitaminas, minerais e microingredientes): são adicionados às rações a fim de atender as necessidades nutricionais do animal;
- Ração animal completa: é preparada de forma a atender as necessidades nutricionais do animal.

5.3.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes e soluções utilizados são os mesmos descritos nos itens 3.3.2 e 4.3.2, respectivamente.

5.3.3. Instrumentação

Todos os equipamentos utilizados no preparo de amostra e análise dessas amostras são os mesmos descritos nos itens 3.3.1 e 4.3.3, respectivamente.

5.3.4. Determinação do teor total de selênio

As etapas envolvidas no preparo de amostras para a determinação do teor total de selênio nas amostras de ração animal estão descritas no item 3.3.3.

5.3.5. Extração de proteínas solúveis para análise de SEC

A descrição da etapa de extração de proteínas solúveis para análise de SEC está descrita no item 4.3.5.

5.3.6. Extração de selênio para análise de especiação química

A descrição da etapa de selênio para análise de especiação química está descrita no item 4.3.6.

5.4. Resultados e discussão

5.4.1. Determinação do teor total

A determinação da concentração total de Se nas amostras de rações animais foram realizadas em diferentes laboratórios: U.S. FDA Forensic Center, Laboratório de toxicologia química do Departamento de Agricultura de Minnesota e Metallomics Center no Departamento de Química da Universidade de Cincinnati. Os resultados da determinação de selênio total estão dispostos na Tabela 5.1 e, a partir destes pode-se observar que os resultados estão concordantes para o conjunto

interamostral, e os resultados obtidos para os CRMs indicaram exatidão calculada de 99,2 % para farinha de arroz e 96,7 % para levedura selenizada.

Para as amostras 2, 4, 5 e 6 os teores determinados são superiores a concentração mínima informada no rótulo dos produtos, portanto há conformidade sob esse aspecto. No entanto, para as amostras 2 e 5 o teor determinado é ~ 3 vezes superior ao informado no rótulo e para a amostra 4 o teor é ~2 vezes superior ao informado. Nas amostras 1 e 3 não há informação no rótulo sobre o teor de Se adicionado. A amostra 3 não traz informação sobre a forma de selênio adicionada ao produto, caracterizando uma não-conformidade.

TABELA 5.1. Concentrações de selênio determinados (mg kg^{-1}) e rotulados para rações animal e material de referência certificado de farinha de arroz (NIST SRM 1568b) e levedura selenizada (NRC SELM-1).

Amostra	Descrição	(1)	(2)	(3)	Rotulado
Ração #1	Ração completa para frangos + Na_2SeO_3	$0,622 \pm 0,009$	-	$0,61 \pm 0,03$	Não informado
Ração #2	Ração completa para suínos + Se-yeast	$0,90 \pm 0,012$	0,94	$0,92 \pm 0,06$	Mínimo de 0,3
Ração #3	Ração completa para frangos	$0,676 \pm 0,086$	-	$0,64 \pm 0,02$	Não informado
Ração #4	Premix para suínos + Na_2SeO_3	$1,41 \pm 0,12$	1,34	$1,51 \pm 0,04$	Mínimo de 0,7
Ração #5	Ração completa para suínos + levedura selenizada e Na_2SeO_3	$0,952 \pm 0,072$	0,86	$0,97 \pm 0,03$	Mínimo de 0,3
Ração #6	Sal mineral para gado de corte + Na_2SeO_3	$43,2 \pm 0,32$	44,6	-	Mínimo de 35
SRM 1568b	Farinha de arroz	$0,362 \pm 0,015$	-	-	$0,365 \pm 0,029$
SRM SELM-1	Levedura selenizada	-	-	$1990 \pm 41^*$	2059 ± 64

(1) Resultados fornecidos pelo o U.S. FDA Forensic Chemistry, Cincinnati, OH, EUA, Center pelo Dr. Kevin Kubachka (\pm representa 2 σ).

(2) Resultados fornecidos do Laboratório de Toxicologia Química do Departamento de Agricultura de Minnesota, Saint Paul, MN, EUA, sob supervisão do Dr. Treeske Ehresmann. Não foram fornecidos os valores de desvio padrão para essas determinações.

(3) Análises realizadas no Metallomics Center, no Departamento de Química da Universidade de Cincinnati, Cincinnati, OH, EUA, nesta tese (n=3).

* Valor reportado na Tabela 4.2

5.4.2. Caracterização das amostras por SEC

Os cromatogramas de SEC-ICP-MS estão apresentados nas Figuras 5.2, sendo: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte. É possível observar que nos cromatogramas apresentados nas Figuras 5.2 (a), (c), (d) e (f) o perfil proteico é de MMW e LMM, e com exceção do sal mineral para gado de corte pode-se considerar que essas são majoritariamente selenoproteínas. No caso do sal mineral (Figura 5.2 (f)), o selênio está ligado a proteínas de MMW. Nas Figuras 5.2 (b) e (e) estão apresentados os cromatogramas de SEC correspondentes às amostras de ração completa para suínos, nos quais pode-se observar proteínas de HMW e MMW e para a ração #2 (Figura 5.2 (b)) é que há selênio ligado à proteínas de HMW, mas majoritariamente ligado à proteínas de MMW. No caso da ração #5 (Figura 5.2 (e)) o selênio está ligado a uma pequena fração de HMW, provavelmente DNA ou RNA, mas não comparável a área cromatográfica correspondente à MMW.

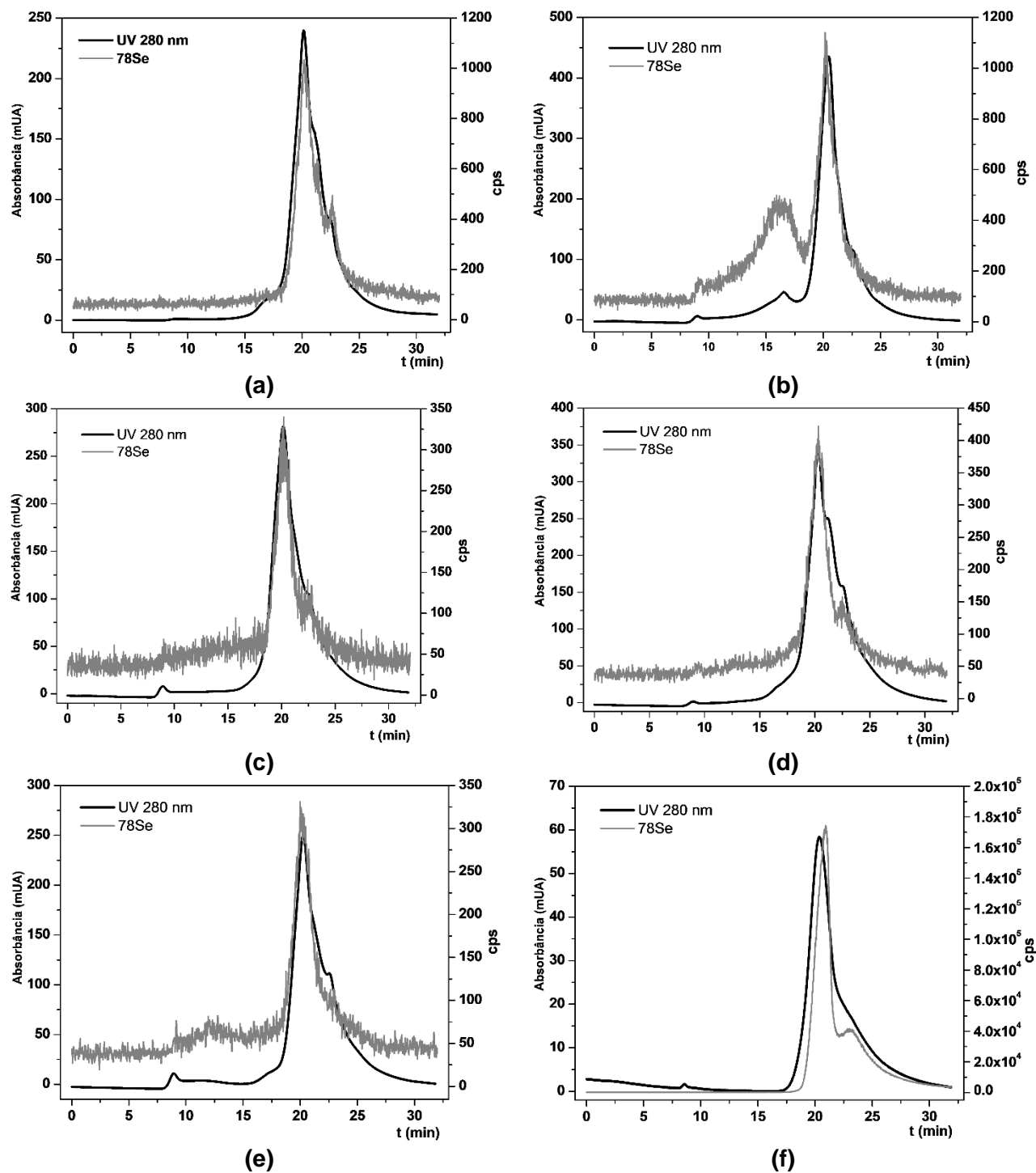


FIGURA 5.2. Cromatogramas de SEC-ICP-MS das amostras de ração animal, sendo: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte.

5.4.3. Extração de selênio e análise de especiação química

Diversos testes de extração de selênio das amostras foram realizados com diferentes extratores como água, metanol, coquetel enzimático e extração enzimática em meio salino. Na Tabela 5.2 estão apresentados os resultados da eficiência de extração com esses extratores para cada amostra de ração. A extração considerada mais eficiente corresponde a extração enzimática em meio salino.

TABELA 5.2. Eficiência de extração de selênio das amostras de ração animal para diferentes extratores.

Tipo de extrator	Água	Metanol ^(a)	Coquetel de enzimas ^(b)	Solução salina ^(c)
Ração #1 Completa para frangos	39	33	67	45
Ração #2 Completa para suínos	40	27	60	71
Ração #3 Completa para frangos	42	21	49	59
Ração #4 Premix para suínos	35	15	32	97
Ração #5 Completa para suínos	33	23	68	130
Ração #6 Sal mineral para gado de corte	41	44	50	69

(a) Solução de metanol 5% (v v⁻¹).

(b) Coquetel das enzimas: proteinase K, protease XIV e pancreatina, em solução tampão Tris-HCl de pH 7,5.

(c) Coquetel das enzimas: proteinase K, protease XIV e pancreatina, em meio salino composto por cloreto de sódio, fosfato de sódio e citrato de sódio em pH 7,5.

Stadlober e Sager (2001) avaliaram a extração de selênio em amostras de cereais com adição de selênio inorgânico e obtiveram baixa eficiência de extração, o que atribuíram à possível presença de selênio elementar nas amostras. Para os extratos aquosos foi observado apenas 3- 9 % de eficiência. Os melhores resultados foram obtidos com hidrólise enzimática (com enzima pronase) em meio de tampão fosfato e citrato com agitação em banho-maria por 4 h a 37 °C, cuja eficiência variou de 70 a 85%.

A partir dos extratos das amostras de ração empregando o extrator salino fez-se análise de especiação química de selênio por RP-ICP-MS. Os cromatogramas apresentados na Figura 5.3 correspondem a: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte, respectivamente. No Apêndice C estão apresentados os cromatogramas dos extratos fortificados com padrões das espécies de Se. Os tempos de retenção das soluções dos padrões de selênio apresentados na Figura 4.3 são: SeCys₂ (RT=2,2), SeMet (RT= 3,9), Se(IV) (RT=4,6); Se-O-Met (RT=5,2) e Se(VI) (RT=20,3).

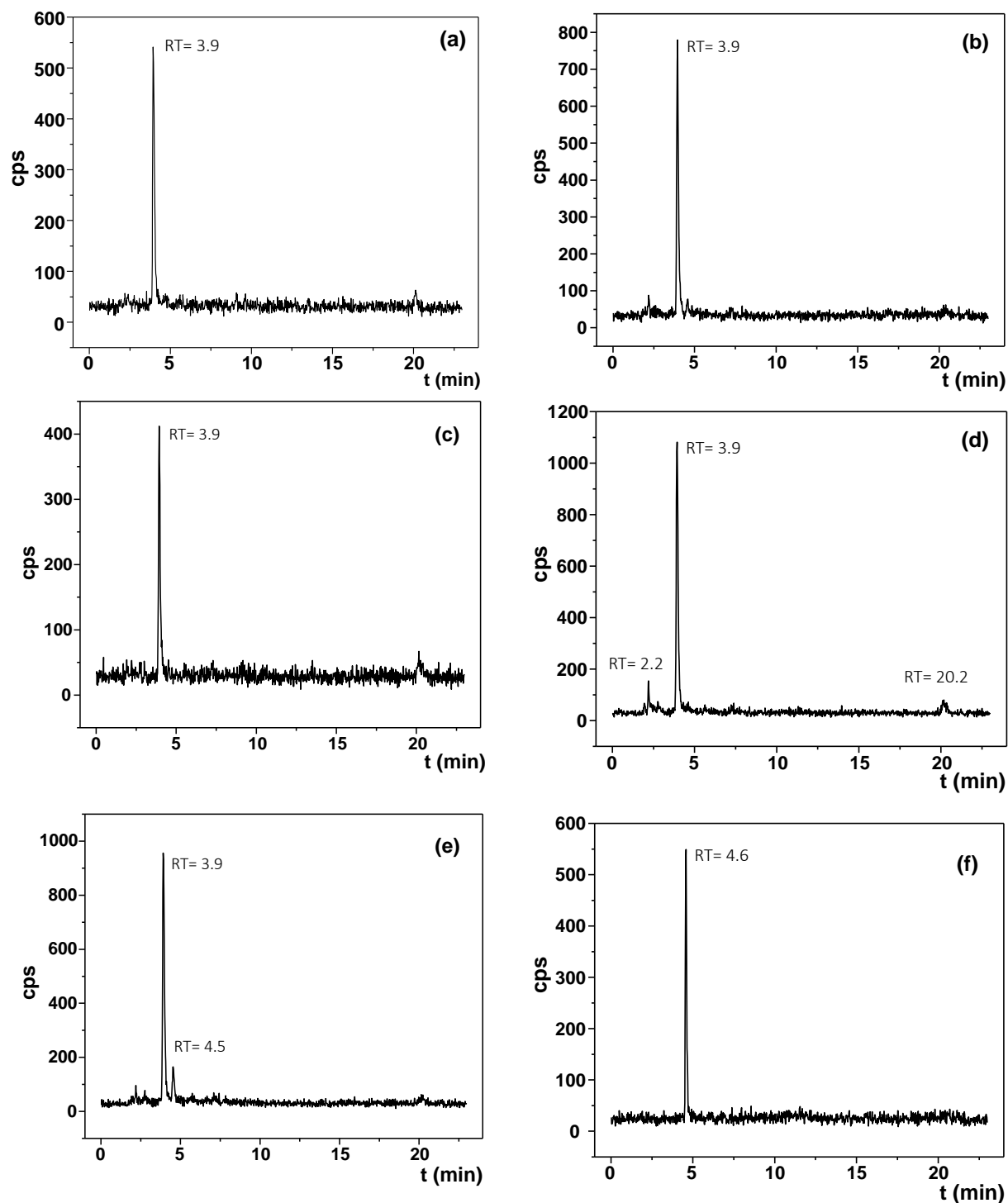


FIGURA 5.3. Cromatogramas de RP-ICP-MS para as amostras de: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte.

Observa-se que nos cromatogramas apresentados na Figura 5.3 (a) até (e) é observada a SeMet como espécie majoritária independente da fonte de selênio na matriz (RT= 3,9). Nesses mesmos cromatogramas observa-se uma protuberância próximo a RT referente a espécie Se(VI) (~ 20 min). Na Figura 5.3 (d) também está presente um pico cromatográfico no mesmo tempo de retenção da SeCys₂ (~ 2,2 min). Na Figura 5.3 (e) observa-se uma pequena concentração de Se(IV). Na Figura 5.3 (f) o Se(IV) é a única espécie observável nesse extratos nessas condições, e está concordante com o esperado, uma vez que o selenito de sódio foi a fonte de selênio adicionada ao sal mineral. De forma geral, acredita-se que tenha ocorrido a interconversão da espécie Se(IV) em SeMet, na presença de bactérias possivelmente presentes nas amostras sem manipulação, que durante o período de incubação teriam metabolizado a fonte de selênio. Outra hipótese seria a interconversão durante o período de processamento dos produtos, caso Se(IV) tenha sido a fonte de selênio adicionada às rações, o que não teria ocorrido para o premix e para o sal mineral, nos quais, por serem produtos com menos etapas de pré-processamento, pode-se observar essa espécie de selênio (Se(IV)).

5.5. Conclusões

Todas as embalagens das rações animais continham informação sobre a fonte de Se adicionada, exceto a ração completa para aves (ração 3), atendendo a normativa. As determinações de Se realizadas em diferentes laboratórios apresentaram resultados concordantes entre si e muito próximas à concentração sugerida na embalagem das quais forneciam esse valor. Estudos preliminares indicam que SeMet é a espécie majoritária de todas as amostras analisadas. Baseado nas informações contidas nas embalagens dos produtos comerciais, observa-se que há interconversão de espécies nos casos em que as concentrações são relativamente baixas. Tal fenômeno ainda não pode ser explicado com base nos estudos realizados. Estudos futuros incluindo análise com ESI-MS/MS podem confirmar a presença das espécies adicionadas ao suplemento, bem como das espécies determinadas por análise de especificação química de Se dos extratos.

Capítulo 6

Conclusões gerais

6. Conclusões gerais

Dos estudos desenvolvidos ao longo dessa tese de doutorado pode-se tirar as seguintes conclusões:

- Com os resultados obtidos utilizando-se a ferramenta para otimização da vazão do gás de reação e colisão é possível escolher a melhor vazão em função da razão sinal/ruído;
- A escolha da melhor vazão de hidrogênio usado como gás de reação implicou na melhoria dos limites de detecção para determinação de Se nas $m/z=78$ e 80 ;
- Os resultados obtidos para os CRMs escolhidos, de fígado bovino e fígado de peixe, por conter diferentes concentrações de Se estavam concordantes com os valores certificados para este elemento;
- O limite de detecção para ^{80}Se foi inferior ao valor obtido para o isótopo ^{78}Se , apesar do valor não expressivo;
- O método de especiação química desenvolvido foi considerado robusto, sendo aplicado tanto para amostras de carne bovina, como para amostras de rações animais;
- As análises por LC-SEC geraram resultados que inferem que pelo menos 80 % do Se esteja ligado à proteínas de média e baixa massa molecular;
- Com base nos resultados obtidos por LC-SEC optou-se pelo desenvolvimento de um procedimento de extração enzimática para remoção de Se das amostras;
- O procedimento de extração de Se foi avaliado por análise da concentração total de Se nos extratos de diferentes soluções extratoras, e a solução salina contendo uma mistura de enzimas apresentou resultados satisfatórios avaliando-se diferentes tipos de amostras. No entanto, é possível que estudos futuros adotem uma condição ainda melhor e mais robusta;
- Observou-se que para as amostras de ração bovina enriquecida com antioxidantes houve um aumento de ~ 20 x na concentração de Se orgânico e, um aumento de ~ 3 x na concentração de Se nas amostras de carne bovina dos animais suplementados;
- SeMet foi a espécie majoritária encontrada em todas as amostras;
- Os resultados das amostras de carne bovina dos animais que não tiveram antioxidantes adicionados à sua dieta continham SeMet, e possivelmente SeCys₂, o que infere que a SeMet é uma espécie mais biodisponível;
- Os resultados das amostras de rações animais para aves, suínos e bovinos analisadas em três diferentes laboratórios estavam bastante concordantes entre si e com os valores sugeridos nas embalagens quando fornecidas pelos fabricantes;
- Todas as amostras continham as informações previstas pela legislação, exceto a ração completa para aves que não fornecia a fonte de selênio adicionada;
- Análises qualitativas de especiação química para as amostras de rações animais indicaram que SeMet foi a espécie majoritária detectada;
- Baseado nas informações oferecidas pelos fabricantes das rações animais nota-se que pode ter ocorrido interconversão de espécies. No entanto, é necessário um estudo mais aprofundado para confirmação das espécies nas matrizes e nos extratos das amostras para a confirmação dos dados.

Capítulo 7

Referências

7. Referências

AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent 8800 triple quadrupole ICP-MS**: hardware maintenance manual. Agilent Technologies, Inc.: EUA, 2014. 184 pp. Manual de manutenção de hardware.

ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY (ADM). **The Role of Selenium Yeast in Ruminant Feeding Programs**. Disponível em: <<http://www.admani.com/animal%20health/Products/Animal%20Health%20Minerals%20Selenium%20Yeast.htm>>. Acesso em: 21/11/2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE CARNES (ABIEC). **Exportações Brasileiras de Carne Bovina no ano de 2014**. 2015. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/Jan%20-%20Dez%20-%202014.pdf>>. Acesso em: 27/10/2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE CARNES (ABIEC). **Relatório de produção, exportação, importação e consumo mundial de carne bovina no período de 2005 a 2011**. 2012. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf>. Acesso em: 27/10/15.

BANDURA, D. R.; BARANOV, V. I.; TANNER, S. D. Reaction chemistry and collisional processes in multipole devices for resolving isobaric interferences in ICP-MS. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 370, p. 454-470, 2001.

BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **J Endocrinol.**, v. 184, n. 3, p.455-465, 2005.

BÉLGICA. Scientific Committee on Food (SCF). **Opinion of the scientific of food of the tolerable upper intake level of selenium**. Brussel, 2000. 18 p. Relatório SCF/CS/NUT/UPPLEV/25Final.

BIANCHI, S. R. **Avaliação de estratégias analíticas para reduzir interferências em ICP-MS e ICP OES**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 269**, de 22 de setembro de 2005. O regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC_269_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 04/11/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Exportação**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 17/09/15.

- CAPELO, J. L., et al. Enzymatic probe sonication: enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bond to proteins in yeast. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 233-237, 2004.
- CASIOT, C. et al. Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 14, p. 645-650, 1999.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.
- CHANG, J. C., et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006. 456 p.
- CUDERMAN, P., et al. Extraction of Se species in buckwheat sprouts grown from seeds soaked in various Se solutions. **Food Chem.**, v. 123, p. 941–948, 2010.
- D'ILIO, S., et al. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: still a challenge? A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 69, p. 6-13, 2011.
- DAUN, C., et al. Separation of soluble selenium compounds in muscle from seven animal species using size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 19, p. 129-134, 2004.
- DERNOVICS, M.; LOBINSKI, R. Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast. Part 1: identification of new species by multi-dimensional liquid chromatography with parallel ICP-MS and electrospray Q-TOFMS/MS detection. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 23, p. 72-83, 2008.
- DUPONT, J., et al. Food safety and health effects of canola oil. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 8, p. 16, 1989.
- ETTRE, L. S.; SAKODYNSKII, K. I. M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: early work (1899–1903). **Chromatographia**, v. 35, n. 3, p. 223-231, 1993.
- EUA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Toxicological profile for Selenium**, Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2003a.
- EUA. National Institutes of Health (NIH). Office of dietary supplements. **Vitamin E: Fact sheet for health professionals**. 2013a. Disponível em: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/>. Acesso em: 18/11/2015.
- EUA. The Association of American Feed Control Official (AAFCO). **Non-pet food: label, design and format guide**. 2010, 36 pp.

- EUA. U.S. Department of Agriculture. Department of Human and Health Service. National Institutes of Health. **Selenium**: dietary supplement fact sheet. In:_____. **Office of Dietary Supplements**. 2013b. Disponível em: <<http://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>>. Acesso em: 21/11/2015.
- EUA. U.S. FDA. Food and Drugs Administration. **Qualified Health Claim**: final decision letter on selenium and certain cancers (Docket No. 02P-0457). 2003b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm072780.htm>>. Acesso em: 03/11/2015.
- EUA. U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA). **Code of Federal Regulations (CFR). Title 21, volume 6, section 573.920- Selenium**. 2015. Food additives permitted in feed and drinking water of animals. Silver Spring, revised in 2015.
- EUA. U.S. Geological Survey. Mineral Resources On-line Spatial Data (USGS). **Analysis of Selenium by Hydride-generation Atomic Absorption Spectrometry (USGS and XRAL laboratories)**. 2012. Disponível em: <<http://mrdata.usgs.gov/geochem/doc/selenium.htm>>. Acesso em: 21/11/2015.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (ESFA); PANEL ON ADDITIVES AND PRODUCTS OR SUBSTANCES USED IN ANIMAL FEED (FEEDAP). Scientific opinion on safety and efficacy of selenium in the form of organic compounds produced by the selenium-enriched yeast *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R646 (Selemax 1000/2000) as feed additive for all species. **EFSA Journal**, v. 10, n. 7, p. 2778-2795, 2012.
- FANG, Y., et al. Identification of selenium compounds using HPLC-ICPMS and nano-ESI-MS in selenium-enriched rice via foliar application. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 24, p. 1657-1664, 2009.
- FELDMANN, I.; JAKUBOWSKI, N.; STUEWER, D. Application of a hexapole collision and reaction cell in ICP-MS Part I: instrumental aspects and operational optimization. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 365, p. 415-421, 1999.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION FOR WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Human vitamin and mineral requirements**. Bangkok, Thailand, 2001. 303 p. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements.
- FORDYCE, F. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus, O. *et al.* (Ed.). **Essentials of medical geology**: impacts of the natural environment on public health. London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 373-415.
- FORDYCE, F. Selenium geochemistry and health. **Ambio**, v. 36, p. 1, 2007.
- GERGELY, V., et al. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v 1101, p. 94-102, 2006.

- GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regul. Toxicol. Pharm.**, v. 38, n. 2, p. 232-242, 2003.
- INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD (FNB). **Dietary reference intakes**: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. National Academy Press, Washington, DC, 2000.
- JACKSON, B. P.; LIBA, A.; NELSON, J. Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 30, p. 1179-1183, 2015.
- KOKARNIG, S., et al. Concurrent quantitative HPLC–mass spectrometry profiling of small selenium species in human serum and urine after ingestion of selenium supplements. **J. Trace Elem. Med Biol.**, v. 29, p. 83-90, 2015.
- KESKINEN, R. **Selenium fertilization**: plant uptake and residuals in soil. 2012. 47 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Agricultura e Silvicultura, University of Helsinki, Helsinquia, Finlândia, 2012.
- KOTREBAI, M., et al. Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. **Analyst**, v. 125, p. 71-78, 2000.
- KRAUSE, R. J. et al. Oxidative Metabolism of Seleno-L-methionine to L-Methionine Selenoxide by Flavin-Containing Monooxygenases. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 19, n. 12, 1643-1649, 2006.
- KUBACHKA, K. **Selenium Speciation in Animal Feed**. In: EUROPEAN WINTER PLASMA CONFERENCE, 2015, Munique.
- MAAS, J., et al. Degeneração muscular nutricional. In: SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 1279- 1282.
- MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; LEWIS, A. J. **Swine nutrition**. 2. ed. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1991. 702 p.
- MISTRY, H. D., et al. Selenium in reproductive health. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 1, p. 21-30, 2012.
- MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry**. 2 ed. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998.
- MONTES-BAYÓN, M.; et al. Selenium speciation in wild-type and genetically modified Se accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 17, p. 872-879, 2002.

- PACHECO, P.; HANLEY, T.; FIGUEROA, J. A. L. Identification of proteins involved in Hg-Se antagonism in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Metallomics**, v. 6, p. 560-571, 2014.
- PEDRERO, Z., et al. Selenium speciation in different organs of African catfish (*Clarias garuepinus*) enriched through a selenium-enriched garlic based diet. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 26, p. 116-125, 2011.
- PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 634, p. 135-152, 2009.
- PERKIN ELMER SCIEX. **Isotope Abundances, Interferences and DRC information**. 2008. Tabela de abundância de isótopos, interferências e informações sobre DRC da Perkim Elmer.
- PHIPPS, R. H., et al. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effects on milk production and total selenium content and speciation in blood, milk and cheese. **Animal**, v. 2, n. 11, p. 1610-1618, 2008.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, p. 1256-1268, 2012.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.
- RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health. **Br. J. Nutr.**, v. 100, p. 238-253, 2008.
- RUZIK, L. Speciation of challenging elements in food by atomic spectroscopy. **Talanta**, v. 93, p. 18-31, 2012.
- SHAH, M., et al. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 19, p. 381-386, 2004.
- SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (SNA). 2015. **Brasil será o maior produtor mundial de carne bovina em cinco anos, prevê Abiec**. Disponível em: <<http://sna.agr.br/brasil-sera-o-maior-produtor-mundial-de-carne-bovina-em-5-anos-preve-abiec/>>. Acesso em: 17/09/2015.
- SPEARS, J. W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **J. Nutr.**, v. 133, n. 5, p. 1506S-1509S, 2003.
- STADLOBER, M.; SAGER, M. Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals: identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. **Food Chem.**, v. 73, n. 3, p. 357-366, 2001.
- SUBCOMMITTEE ON BEEF CATTLE NUTRITION, et al. **National requirements of beef cattle**. 7. ed. Washington: National Academy Press, 2000.

- SUBCOMMITTEE ON DAIRY CATTLE NUTRITION, et al. **National requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washington: National Academy Press, 2001.
- SUCHAROVA, V. Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 26, p. 1756-1762, 2011.
- SURAI, P. F. Selenium in poultry nutrition 1: antioxidant properties, deficiency and toxicity. **World Poultry Sci. J.**, v. 58, n. 3, p. 333-347, 2002a.
- SURAI, P. F. Selenium in poultry nutrition 2: reproduction, egg and meat quality and practical applications. **World Poultry Sci. J.**, v. 58, n. 4, p. 431-450, 2002b.
- TANNER, S. D.; BARANOV, I. V.; BANDURA, D. R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 7, p. 1361-1452, 2002.
- TEMPLETON, D. M., et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements: definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure Appl. Chem.**, v. 72, p. 1453-1470, 2000.
- THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS: part XII- a review of interferences. **Spectroscopy**, v. 17, p. 24-31, 2002.
- THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS**: a tutorial for beginners. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. 446 p.
- THOMPSEN, V. Spectral background radiation and the "background equivalent concentration" in elemental spectrochemistry. **Spectroscopy**, v. 27, p. 3, 2012.
- TROFAST, J. Berzelius' discovery of selenium. **Chem. Inter.**, v. 33, n. 5, p. 16-19, 2011.
- VACCHINA, V., et al. Simultaneous speciation of selenomethionine and 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid by HPLC-ICP MS in biological samples. **J. Chromatogr. B**, v. 878, p. 1178-1180, 2010.
- VONDERHEIDE, A. P., et al. Characterization of selenium species in brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5722-5728, 2002.
- WEEKLEY, C. M.; HARRIS, H. H. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. **Chem Soc Rev.**, v. 42, n. 23, p. 8870-8894, 2013.
- ZOCOLO, G. J. **Princípios e aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. Araraquara: Conselho Regional de Química-IV Região (SP). 106 p. Apostila. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc_araraquara_2012_site.pdf> Acesso em: 26/10/2015.

Apêndice A

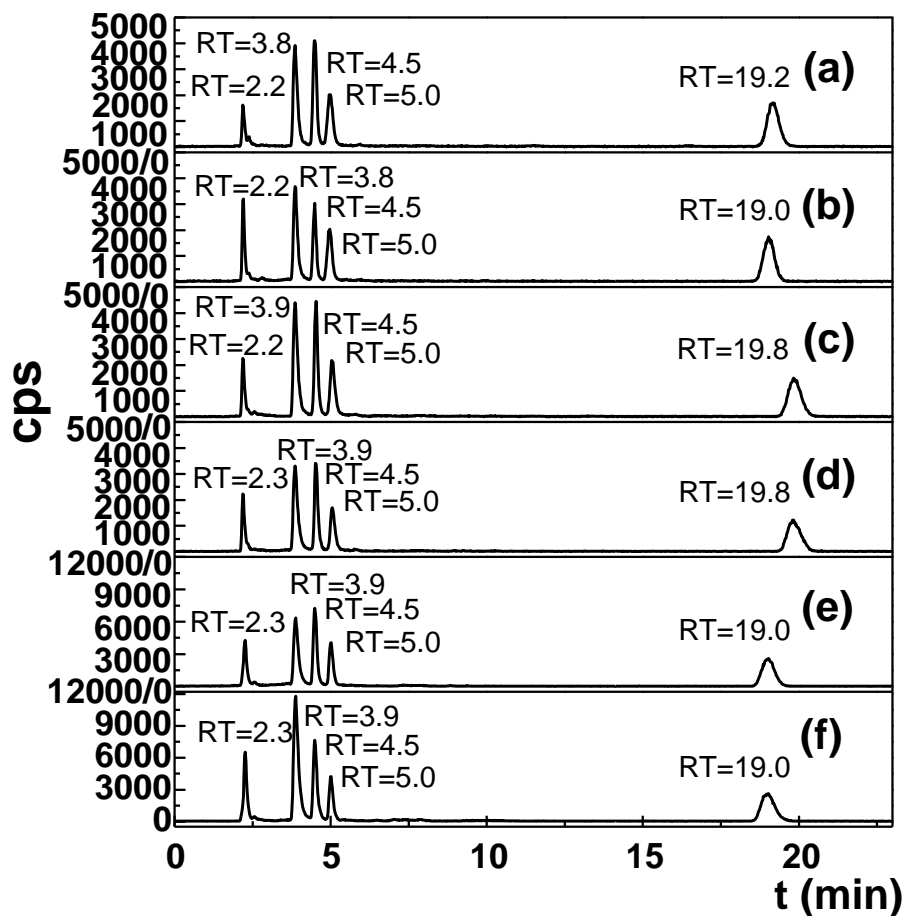


FIGURA A1. Cromatogramas de especiação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de ração animal com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) ração controle, (b) ração + óleo de canola, (c) ração + antioxidantes, (d) ração + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) CRM SELM-1.

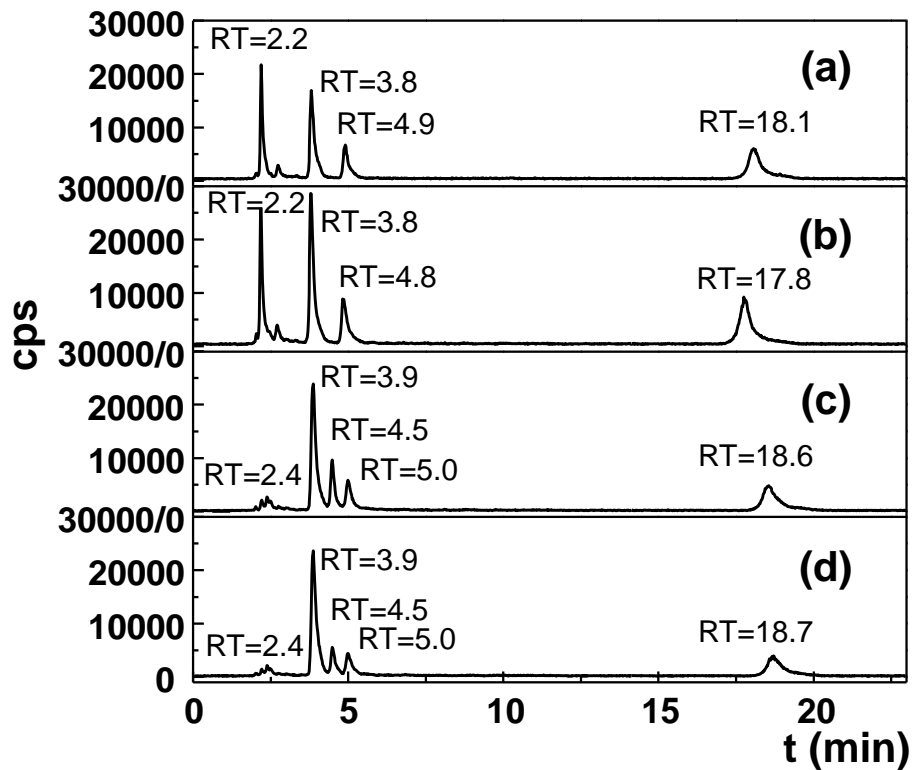


FIGURA A2. Cromatogramas de especiação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de carne bovina com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) carne controle, (b) carne + óleo de canola, (c) carne + antioxidantes, (d) carne + óleo de canola + antioxidantes, (e) suplemento de selênio, e (f) SRM bovine liver.

Apêndice B

20 % Chick Grower

-Guaranteed Analysis-

Crude Protein, Min....	20%
Crude Fat, Min.....	3.8%
Crude Fiber, Max.....	4.5%
Calcium(Ca), Min....	0.9%
Calcium(Ca), Max....	1.2%
Phosphorus(P), Min..	0.6%
Salt, Min.....	0.2%
Salt, Max.....	0.4%

2283

-Ingredients-

Corn, Soybean Meal, Meat Meal, Dehydrated Alfalfa Meal, Ethoxyquin(a preservative), Condensed Fish Solubles, Processed Grain By-Products, Monocalcium Phosphate, Dicalcium Phosphate, Calcium Carbonate, Salt, Animal Fat preserved with BHT, Vitamin A Acetate, D-Activated Animal Sterol(Source of VitaminD3), Menadione Dimethylpyrimidinol Bisulfate(Source of Vitamin K Activity), Riboflavin Supplement, Niacin Supplement, Calcium Pantothenate, Vitamin B12 Supplement, Vitamin E Supplement, Choline Chloride, Methionine Hydroxy Analogue Calcium, L-Lysine, Manganous Oxide, Iron Carbonate, Copper Oxide, Calcium Iodate, Magnesium Oxide, Zinc Oxide, Sodium Selenite

*Feed As Sole Source Of
Feed To Growing Chickens*

Sample for Kevin Kubachka
#1:

- Complete Feed for Chicken
- Labeled to contain Sodium Selenite ONLY

FIGURA B1. Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para frangos (Ração 1).

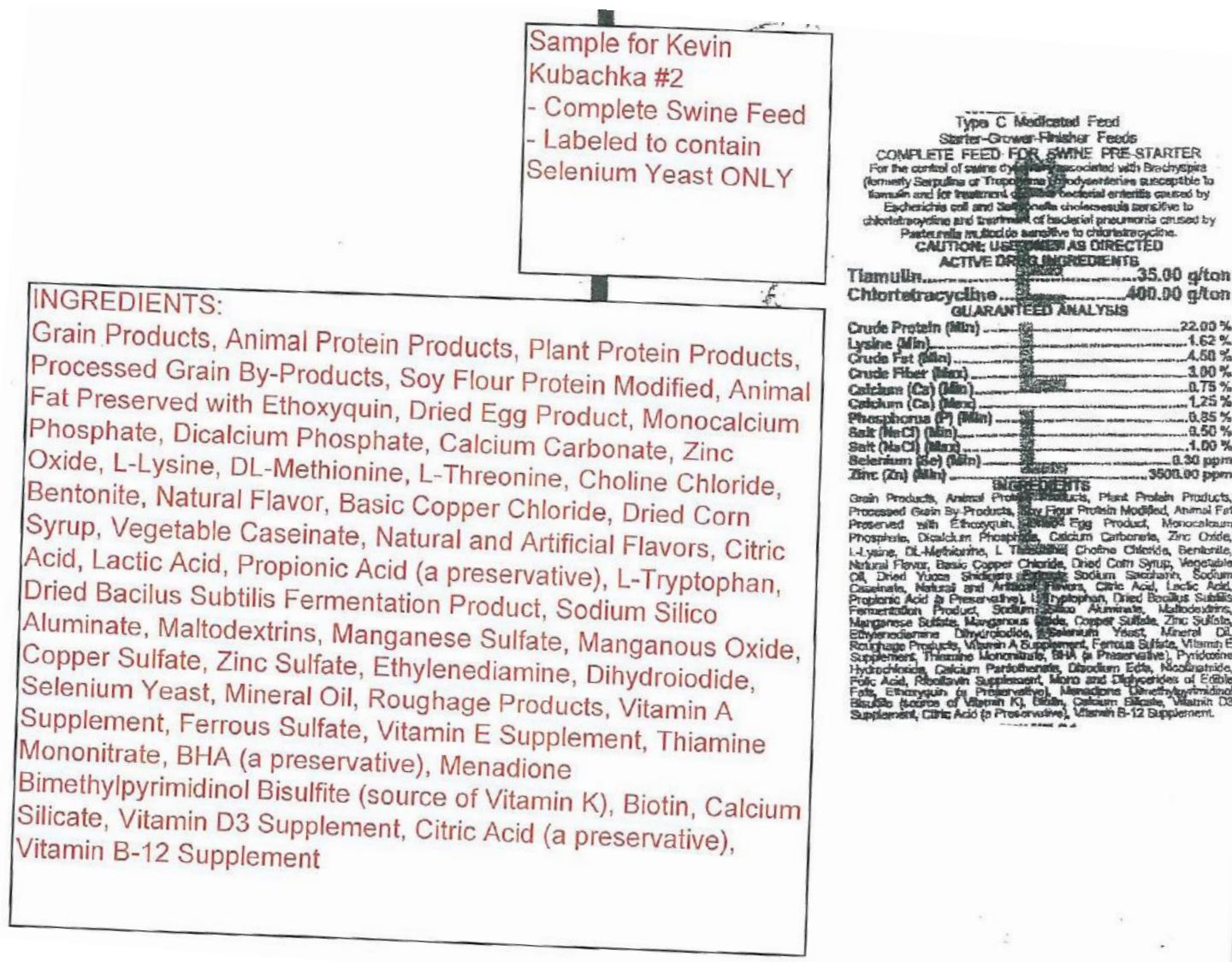


FIGURA B2. Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para suínos (Ração 2).

Sample for Kevin Kubachka #3:
 - Complete feed for Chickens
 - Not labeled to contain any added Selenium

16% ALL MASH LAYER

GUARANTEED ANALYSIS

Crude Protein	16.0%
Crude Fat, not less than	2.5%
Crude Fiber, not more than	5.0%

INGREDIENTS

Corn, Soybean Meal, Oats, Dehydrated Alfalfa Meal, Calcium Carbonate, Dicalcium Phosphate, Salt, Choline Chloride, dl-Methionine, Niacin, Vitamin A Acetate (stability improved), D-Activated Animal Sterols (source of Vitamin D-3 Activity), dl-Alpha Tocopheryl Acetate (source of Vitamin E Activity), Menadione Sodium Bi-sulfite Complex (source of Vitamin K Activity), d-Calcium Pantothenate, Riboflavin, Pyridoxine, Hydrochloride, Vitamin B-12 Supplement, Biotin, Folic Acid, Iron Sulfate, Zinc Oxide, Manganous Oxide, Copper Oxide, Ethylenediamine Dihydriodide, Lignin Sulfonate, Ethoxyquin (a preservative).

FEEDING DIRECTIONS: Feed continuously as the sole ration to laying hens.

NET WEIGHT 50 LB. or BULK

FIGURA B3. Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para frangos (Ração 3).

Sample for Kevin Kubachka #4
 - Premix for Swine
 - With Sodium Selenite ONLY

For further mixed grower and finisher swine feeds. Contains phytase to increase the digestibility of phytin bound phosphorus in swine diets.

GUARANTEED ANALYSIS

Crude Protein	(Min)	43.0 %	Phosphorus (P)	(Min)	1.3 %
Lysine	(Min)	3.1 %	Salt (NaCl)	(Min)	1.0 %
Crude Fat	(Min)	4.6 %	Salt (NaCl)	(Max)	1.5 %
Crude Fiber	(Max)	5.0 %	Selenium (Se)	(Min)	0.7 ppm
Calcium (Ca)	(Min)	2.4 %	Zinc (Zn)	(Min)	270 ppm
Calcium (Ca)	(Max)	2.8 %	Phytase	(Min)	654 FTU ² /lb

(*Aspergillusoryzae*,
Schizosaccharomycespombe)

INGREDIENT STATEMENT

Dehulled Soybean Meal, Animal Protein Products, Corn Distillers Dried Grains with Solubles, Salt, L-Lysine, Calcium Carbonate, DL-Methionine, L-Threonine, Potassium Chloride, Ferrous Sulfate, Zinc Oxide, Manganese Sulfate, Dried *Aspergillusoryzae* Fermentation Product, Roughage Products, Zinc Sulfate, Dried *Schizosaccharomycespombe* Fermentation Product, Vitamin E Supplement, Sodium Selenite, Dried *Trichoderma longibrachiatum* Fermentation Product, Niacin Supplement, Mineral Oil, Calcium Pantothenate, Copper Chloride, Menadione Nicotinamide Bisulfite, Riboflavin Supplement, Vitamin A Supplement, Vitamin B12 Supplement, Vitamin D3 Supplement, Dried *Aspergillusniger* Fermentation Product, Ethylenediamine Dihydrochloride.

06/03/2014

MIXING/FEEDING DIRECTIONS

Weight range (lb)	30 - 50	50 - 125	125 - 200	200 - Market
	400	1500	1600	400

FIGURA B4. Foto do rótulo contido na embalagem de premix para suínos (Ração 4).

For starter pigs weighing 25 to 50 pounds.
MEDICATED
 Increased rate of weight gain and improve feed efficiency in swine when fed in accordance with directions for use.

ACTIVE DRUG INGREDIENT

Carbadox.....0.00275% (25 g / t)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude Protein, min.....21.80%
 Lysine, min 1.35%
 Crude Fat, min 4.70%
 Crude Fiber, max 4.30%
 Calcium, min 0.60%
 Calcium, max 1.10%
 Phosphorus, min 0.60%
 Salt, min0.20%
 Salt, max0.70%
 Selenium, min 0.30 ppm
 Zinc, min120 ppm

INGREDIENTS

Grain Products, Plant Protein Products, Processed Grain Products, Porcine Animal Fat (preserved with BHA), Calcium Carbonate, Mono-Dicalcium Phosphate, Salt, L-Lysine HCL, DL Methionine, Threonine, Vitamin E Suppl., Niacin Suppl., Calcium Pentathionate Crystalline, Menadione Sodium Bisulfite Complex, Riboflavin Suppl., Vitamin A Acetate D-3 Suppl., Vitamin B12 Suppl., Biotin, Folic Acid, Pyridoxine Hydrochloride, Choline Chloride, Iron Sulfate, Zinc Sulfate, Manganese Sulfate, Tribasic Copper Chloride, Sodium Selenite, Calcium Iodate, Selenium Yeast, Brewers Dried Yeast, Yucca Studigera Extract.

FEEDING DIRECTIONS

Feed as the sole ration to pigs from 25 to 50 pounds body weight.

Caution: Not for use in pregnant swine or swine intended for breeding purposes. Do not mix in feeds containing bentonite.

Warning: Do not feed to swine within 42 days of slaughter.

Sample for Kevin Kubachka #5
 - Complete Swine Feed
 - Labeled to Contain BOTH Sodium Selenite AND Selenium Yeast

FIGURA B5. Foto do rótulo contido na embalagem da ração completa para suínos (Ração 5).

Sample for Kevin Kubachka #6:

- Cattle Mineral Mix
- Guaranteed to contain 35 ppm of Selenium (via Sodium Selenite), actual Selenium concentration is 44.6 ppm.

BEEF COW MINERAL

FOR STOCK COWS, BULLS,
GROWING AND BREEDING HEIFERS

GUARANTEED ANALYSIS

Calcium (Min.)	11.0%
Calcium (Max.)	13.0%
Phosphorus (Min.)	8.0%
Salt (Min.)	29.0%
Salt (Max.)	31.0%
Magnesium (Min.)	3.4%
Potassium (Min.)	0.5%
Copper (Min.)	1000 ppm
Iodine (Min.)	100 ppm
Selenium (Min.)	35 ppm
Zinc (Min.)	5000 ppm
Vitamin A (Min.)	421,000 IU/Lb.
Vitamin D3 (Min.)	56,000 IU/Lb.
Vitamin E (Min.)	700 IU/Lb.

INGREDIENTS STATEMENT

Monocalcium Phosphate, Salt, Calcium Carbonate, Magnesium Oxide, Potassium Sulfate, Magnesium Sulfate, Cobalt Sulfate, Copper Sulfate, Ferrous Sulfate, Manganese Sulfate, Zinc Sulfate, Sodium Selenite, Ethylenediamine Dihydriodide, Vitamin A Supplement, Vitamin D3 Supplement, Vitamin E Supplement, Cane Molasses.

FEEDING DIRECTIONS

Free-choice to stock cows, bulls, growing and breeding heifers at the rate of 3 oz/hd/day.

CAUTION

→ Follow label directions. The addition to feeds of higher levels of this mineral containing selenium is not permitted. ←

This product was made in a feed manufacturing facility that does not handle or store products containing animal proteins prohibited in ruminant feed.

FIGURA B6. Foto do rótulo contido na embalagem de sal mineral para gado de corte (Ração 6).

Apêndice C

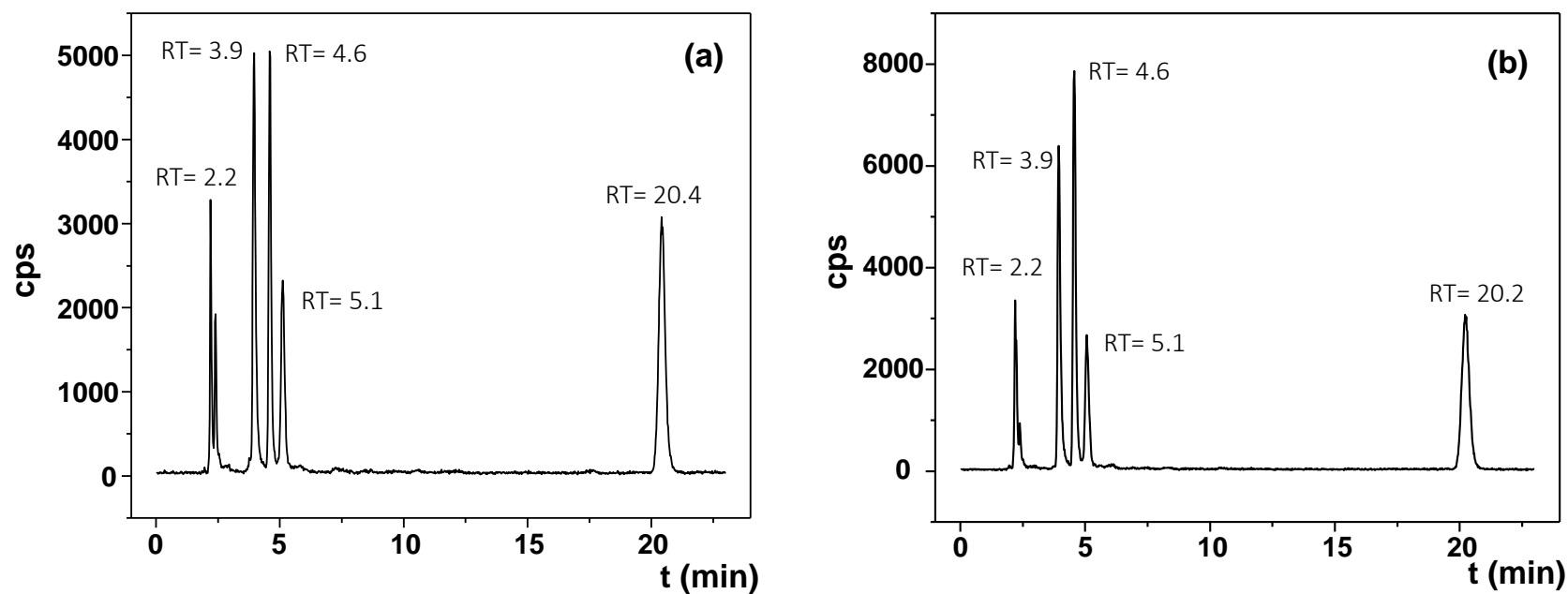


FIGURA C1. Cromatogramas de especificação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de ração animal com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte.

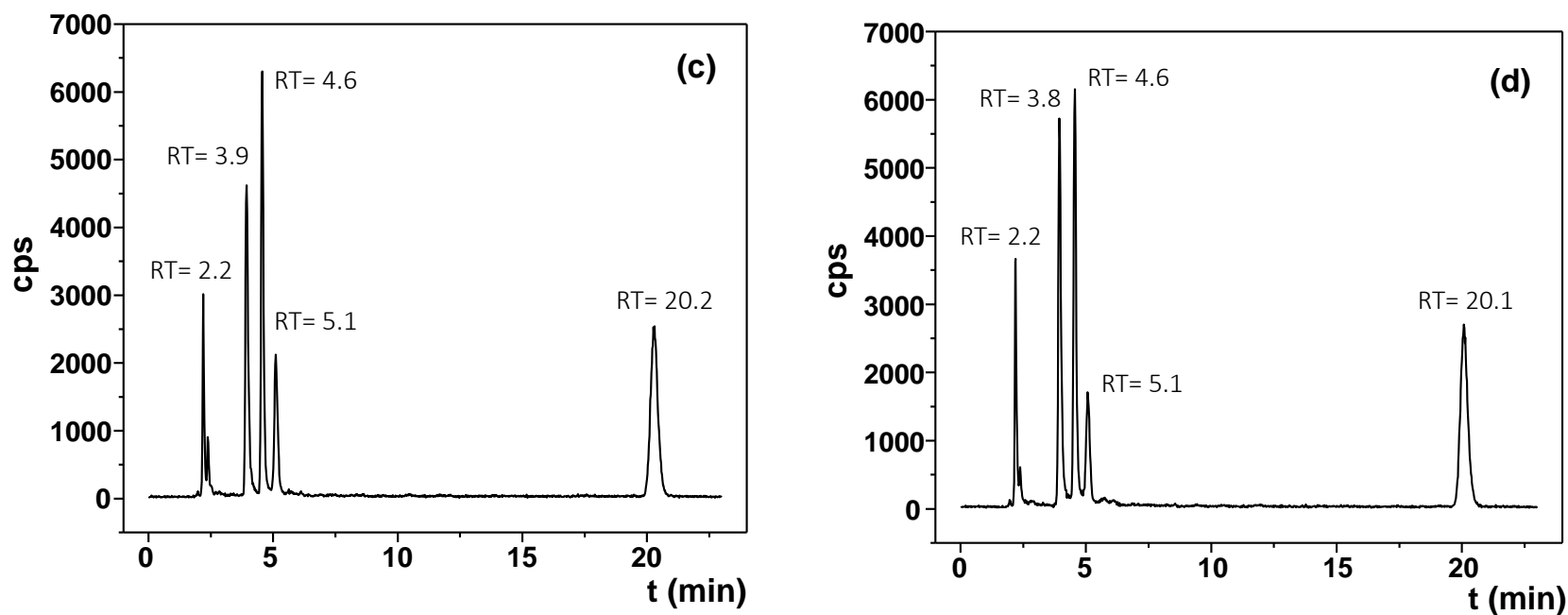


FIGURA C1. Cromatogramas de especiação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de ração animal com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte. **(continuação)**

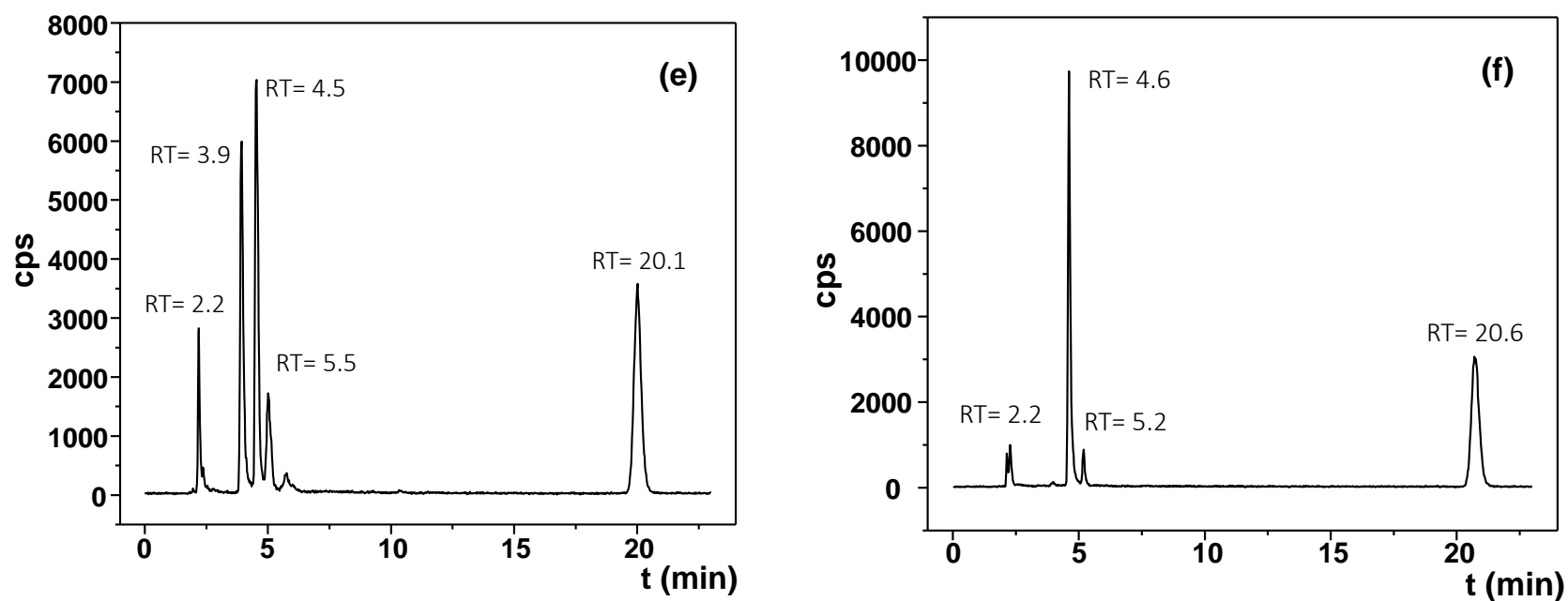


FIGURA C1. Cromatogramas de especiação química de selênio por RP-ICP-MS das amostras de ração animal com adição de padrão ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) de cada espécie de selênio: (a) ração completa para frangos, (b) ração completa para suínos, (c) ração completa para frangos, (d) premix para suínos, (e) ração completa para suínos, e (f) sal mineral para gado de corte. **(continuação)**