



Jefferson Rodrigues de Souza

**Desenvolvimento de métodos para
determinação de Se total por ICP-MS
e de suas espécies por HPLC-ICP-MS
em suplemento alimentar e levedura
enriquecida isotopicamente**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadora: Prof^a Tatiana Dillenburg Saint`Pierre
Co-Orientadora: Dr^a Márcia Silva da Rocha

Rio de Janeiro

Março de 2017



Jefferson Rodrigues de Souza

**Desenvolvimento de métodos para
determinação de Se total por ICP-MS
e de suas espécies por HPLC-ICP-MS
em suplemento alimentar e levedura
enriquecida isotopicamente**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profª Tatiana Dillenburg Saint`Pierre

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Drª Márcia Silva da Rocha

Co-Orientadora

Profª María Luisa Fernández Sánchez

Universidad de Oviedo

Profº Ricardo Erthal Santelli

UFRJ

Profª Christiane Beatrice Duyck

UFF

Profº José Marcus de Oliveira Godoy

Departamento de Química - PUC-Rio

Profª Ricardo Queiroz Aucélio

Departamento de Química - PUC-Rio

Drº Rodrigo Caciano de Sena

INMETRO

Prof. Márcio da Silveira Carvalho

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 29 de março de 2017

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

Jefferson Rodrigues de Souza

Mestre em Química Analítica formado pela PUC-Rio em 2011 além de ser formado em Química Industrial pela Universidade Severino Sombra (Agosto de 2009). Possui formação técnica em química, tendo atuado em indústrias do ramo siderúrgico, papelheiro e bebidas. Atuou como pesquisador no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO.

Ficha Catalográfica

Souza, Jefferson Rodrigues de

Desenvolvimento de métodos para determinação de Se total por ICP-MS e de suas espécies por HPLC-ICP-MS em suplemento alimentar e levedura enriquecida isotopicamente / Jefferson Rodrigues de Souza ; orientadores: Tatiana Dillenburg Saint`Pierre ; Márcia Silva da Rocha. – 2017.

178 f. ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2017.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Suplemento alimentar. 3. Selênio. 4. Selenometionina. 5. ICP-MS. 6. HPLC-ICP-MS. I. Saint`Pierre, Tatiana Dillenburg. II. Rocha, Márcia Silva da. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Agradecimentos

A Deus, por ter me sustentado até aqui;

Às minhas orientadoras, Professoras Tatiana D. Saint’Pierre e Marcia Silva da Rocha pela orientação e estímulo durante a realização deste trabalho;

Ao CNPq e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado;

Aos amigos do laboratório de análise inorgânica do INMETRO pela convivência agradável e por todos os ensinados adquiridos;

Ao grupo do LABIO (INMETRO), em especial à Dani pela valiosa ajuda durante à etapa de manipulação e cultivo das células de levedura;

Aos colegas e amigos do programa de pós-graduação, pela amizade e companheirismo em meio as dificuldades;

Aos professores do Departamento de Química da PUC - Rio, pela contribuição na minha formação acadêmica;

Aos meus pais, Rusiel e Ademilde pelo constante incentivo e apoio;

À uma das pessoas mais especiais da minha vida, Juliana Souza Silva, por compreender minha ausência e por sempre me fornecer o suporte, apoio e carinho que me fizeram chegar até esse momento;

Aos professores que participaram da Comissão Examinadora. Aos funcionários do Departamento de Química da PUC – Rio, em especial à Fátima, pelo companheirismo e ajuda durante esses 8 anos.

À professora María Luíza Fernández Sanchez por todo suporte, tanto técnico quanto pessoal, toda atenção e conselhos que me ofereceu durante minha estadia em Oviedo;

Ao professor Alfredo Sanz Medel por ter me recebido de braços abertos em seu grupo de investigação, me senti parte da família;

A mis amigos españoles Sônia “la guapa”, Sara Maria “la maja”, Raquel “la profesora”, Patri “la señora de los immunoensaios”, los chicos del laboratorio de proteômica, Juan “el gran compañero” y a todos que mucho me enseñaran durante mi estancia en Oviedo; soy mejor después de conocer los;

Rafaela Peixoto, amizade para vida. Muito obrigado pela companhia super agradável na Espanha;

E a todos os meus amigos de longa data que compreenderam minha “década sabática” em prol de um sonho,

Muito obrigado a todos vocês que contribuíram de certa maneira para a realização desse trabalho.

Resumo

Souza, Jeferson Rodrigues de; Saint`Pierre, Tatiana Dillenburg; **Desenvolvimento de métodos para determinação de Se total por ICP-MS e de suas espécies por HPLC-ICP-MS em suplemento alimentar e levedura enriquecida isotopicamente.** Rio de Janeiro, 2017. 178p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O consumo de suplementos alimentares tem apresentado um aumento significativo nos últimos anos principalmente pelo grande apelo desse produto em relação a complementação da dieta com elementos essenciais e a melhora e manutenção da saúde. A combinação do crescente consumo e o livre acesso a esse produto, aliado a ausência de fiscalização por parte dos órgãos governamentais torna seu consumo descontrolado, um potencial risco a saúde da população. Nesse cenário o desenvolvimento de métodos analíticos destinados ao controle de qualidade incluindo a determinação da concentração de selênio total e de suas espécies torna-se uma necessidade. Para isso, foram desenvolvidas metodologias para a quantificação de selênio total por ICP-MS e suas espécies inorgânicas (Se IV e Se VI) e selenometionina por HPLC-ICP-MS em amostras de suplementos alimentares enriquecidos em selênio e em amostra de levedura enriquecida isotopicamente em ^{78}Se . A metodologia para determinação de selênio total, utilizando diferentes gases de reação, foi otimizada empregando planejamento experimental e os limites de detecção encontrados foram entre $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (CH_4) e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (NH_3) e a concordância com o MRC Selm-1 de entre 99% (NH_3) e 104% (CH_4). Os resultados encontrados referentes à concentração de selênio nas amostras de suplementos alimentares apresentaram uma discrepância em relação ao valor informado no rótulo entre -29% e +170% e, de maneira complementar, o acoplamento do HPLC ao ICP-MS permitiu realizar a especiação de selênio nas amostras de suplemento alimentar. O emprego das técnicas ICP-MS, HPLC-ICP-MS e ESI-MS possibilitou a caracterização de uma amostra de levedura enriquecida isotopicamente em ^{78}Se em termos de sua distribuição isotópica, concentração de selênio total e selenometionina bem como proteínas com peso molecular de aproximadamente 12 kDa.

Palavras-chave

Suplemento alimentar; Selênio; Selenometionina; ICP-MS; HPLC-ICP-MS

Abstract

Souza, Jefferson Rodrigues de; Saint’Pierre; Tatiana Dillenburg (Advisor); **Method development for the determination of total Se by ICP-MS and its species by HPLC-ICP-MS in food supplement and in isotopically enriched yeast.** Rio de Janeiro, 2017. 178p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The consumption of dietary supplements has a significant increase in recent years mainly for a great appeal of this product in relation to a complementation of the diet with essential elements and an improvement and maintenance of health. The combination of increased consumption and free access to this product, associated to the lack in the inspection by government, makes their consumption uncontrolled and a potential risk to the citizen health. In this scenario the development of analytical methods for quality control, including a determination of the total selenium concentration and its species becomes a primordial necessity. For this, methodologies were developed for quantification of total selenium by ICP-MS and its inorganic species (Se IV and Se VI) and selenomethionine by HPLC-ICP-MS in samples of selenium-based food supplements and in isotopically enriched yeast sample in ^{78}Se . The methodology for total selenium determination was optimized by experimental design and the limits of detection were in the range of $0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CH_4) and $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NH_3) and the agreement with the CRM Selm-1 were between 99% (NH_3) and 104% (CH_4). The results found for selenium content in the food supplements samples presented a discrepancy in relation to the labeled value between -29% and + 170% and, complementarily, coupling of HPLC to ICP-MS allowed an speciation analysis in the food supplements samples. The use of the ICP-MS, HPLC-ICP-MS and ESI-MS techniques enabled a characterization of a ^{78}Se isotopically enriched yeast sample in terms of its isotopic distribution, total selenium concentration and selenomethionine as well as proteins with molecular weight of approximately 12 kDa.

Keywords

Food supplement; Selenium; Selenomethionine; ICP-MS; HPLC-ICP-MS

Sumário

1	Introdução	16
1.1.	Selênio	16
1.2.	Essencialidade do selênio	19
1.3.	Toxicidade do selênio	21
1.4.	Legislação do Ministério da Saúde – (ANVISA)	22
1.5.	Técnicas analíticas empregadas para a determinação de selênio	24
1.5.1.	ICP-MS (quadrupolo-Q)	25
1.5.2.	ICP-MS (<i>high resolution</i> -HR)	26
1.5.3.	Interferências em espectrometria de massas	28
1.6.	Diluição isotópica	30
1.7.	Cromatografia líquida de alta eficiência	40
1.8.	Especiação de selênio	42
1.8.1.	Métodos de preparo e preservação das amostras contendo selênio	43
1.8.2.	Técnicas analíticas empregadas na análise de especiação de selênio	45
1.8.3.	Qualidade dos resultados em análises de especiação	51
1.9.	Preparo de amostra de levedura enriquecida isotopicamente	53
2	Objetivos	55
2.1.	Objetivos Gerais	55
2.2.	Objetivos Específicos	55
3	Materiais, equipamentos e métodos	56
3.1.	Reagentes e Soluções	56
3.2.	Equipamentos	57
3.3.	Métodos	58
3.3.1.	Selênio total	58
3.3.2.	Espécies de selênio (selenometionina)	62
3.3.3.	Produção da levedura enriquecida isotopicamente	64
3.4.	Preparo das amostras de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para identificação de proteínas	68

3.4.1. Extração das proteínas	68
3.4.2. Determinação de proteínas em amostras de levedura	68
3.4.3. Digestão trípica	69
4 Resultados e Discussão	72
4.1. Determinação de selênio total em suplemento alimentar por ICP-MS do tipo quadrupolo com célula de reação dinâmica (DRC II e Nexlon) (por curva analítica)	72
4.1.1. Otimização das condições operacionais da célula de reação dinâmica	72
4.1.2. Validação e aplicação analítica	80
4.2. Determinação de selênio total em suplemento alimentar por ICP-MS do tipo quadrupolo com célula de reação dinâmica (DRC II) (por diluição isotópica)	87
4.2.1. Validação e aplicação analítica	94
4.3. Especificação de selênio em suplemento alimentar por HPLC-ICP-MS	98
4.4. Produção e caracterização de levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se)	104
4.4.1. Produção da levedura	104
4.4.2. Caracterização da levedura enriquecida isotopicamente	108
4.4.3. Quantificação de selenometionina em levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se) por IDA espécie-específica e espécie-não específica usando HPLC-ICP-MS	115
4.4.4. Tratamento de amostras	129
5 Conclusão	136
6 Referencias bibliográficas	138
7 Anexos	151

Lista de figuras

Figura 1: Rota metabólica de selênio em animais superiores. Adaptado de (IGLESIAS, 2010)	17
Figura 2: Configuração esquemática do ICP-MS (<i>multicollector</i> -MC) (Neptune Plus, Thermo). Adaptado do manual do equipamento (www.thermofisher.com).....	27
Figura 3: Cromatograma obtido por RP-HPLC-ICP-MS (A) e cromatograma de fluxo mássico (3B).....	34
Figura 4: Estimativa do tempo morto do detector (hipotético)	38
Figura 5: Curva de propagação de erro para otimização/planejamento da diluição isotópica	40
Figura 6: Esquema gráfico de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
Figura 7: Acoplamento HPLC-ICP-MS.....	63
Figura 8: Avaliação inicial de contaminação da cepa de levedura por outros microorganismos	65
Figura 9: Efeito da vazão de NH_3 sobre o sinal obtido para m/z 80 ($R_{pq} = 0,4$).	73
Figura 10: (A) Gráfico de Pareto e (B) superfície de resposta obtida pelo design composto central do R_{pq} e da vazão de NH_3	75
Figura 11 Efeito do CH_4 como gás de reação sobre o sinal obtido para a m/z 80 ($R_{pq} = 0,45$)	76
Figura 12: Efeito do O_2 como gás de reação sobre o sinal obtido para (A) m/z 96 ($^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$) e (B) m/z 80 (^{80}Se) ($R_{pq} = 0,65$).	78
Figura 13: Efeito do hélio como gás de colisão sobre as intensidades obtidas para m/z 80	80
Figura 14: Avaliação de padrão interno para correção de interferência não espectral.....	82
Figura 15: Diagrama de Ishikawa e a relação entre as fontes de i ncerteza.....	84
Figura 16 Influência de cada fonte sobre a incerteza global com diferentes gases de reação (A) Oxigênio - ^{80}Se , (B) Oxigênio – SeO , (C) Metano e (D) Amônia.....	84
Figura 17: Contribuição das fontes individuais de incerteza.....	86

Figura 18. Superfície de resposta do planejamento composto central	88
Figura 19. Gráfico de probabilidade acumulada dos resíduos da superfície de resposta	89
Figura 20. Estimativa do efeito da discriminação de massas por DRC-ICP-MS	93
Figura 21. Influência da concentração da solução analítica sobre o erro médio na determinação da razão isotópica	94
Figura 22: Fator de propagação de erro empregando um padrão de selênio isotópico enriquecido em ^{78}Se	95
Figura 23: Contribuição relativa das fontes individuais de incerteza sobre a incerteza padrão combinada.....	97
Figura 24: Separação cromatográfica dos padrões: selenito de sódio, selenato de sódio e selenometionina.....	99
Figura 25: Especificação das amostras de suplemento alimentar	101
Figura 26: Avaliação do crescimento da levedura nos diferentes meios de cultivo	104
Figura 27: Estudo cinético do crescimento da levedura	105
Figura 28: Perfil cromatográfico do padrão de selênio enriquecido.....	106
Figura 29: Procedimento para enriquecimento da levedura em ^{78}Se	107
Figura 30: Perfil cromatografico da amostra de levedura após processo de enriquecimento. Coluna Luna C18; Fase Móvel: TBAAc 0,5 mM + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5 mM + 1% ACN	108
Figura 31: Fator de propagação de erro empregando um padrão de selênio isotópico enriquecido em ^{74}Se frente à amostra enriquecida isotopicamente em ^{78}Se	110
Figura 32: Simulação de sinal transiente para determinação da razão isotópica	110
Figura 33: Regressão linear para determinação da razão isotópica por ICP-Q-MS.....	111
Figura 34: Regressão linear para determinação da razão isotópica por MC-ICP-MS	114
Figura 35: Perfil cromatográfico para extração enzimática do CRM SELM-1	117
Figura 36: Perfil cromatográfico para extração enzimática do CRM SELM-1 após adição de mercaptoetanol	117
Figura 37: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da	

amostra de levedura enriquecida	118
Figura 38: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida com 0,1 mM de TBAAc.....	119
Figura 39: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida – Troca aniônica.....	120
Figura 40: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida – Troca Aniônica	121
Figura 41: Constantes termodinâmicas (pKa) da selenometionina	122
Figura 42: Estrutura química do HFBA	123
Figura 43: Perfis cromatográficos obtidos para (A) padrão de selenometionina e (B) extração enzimática da amostra de levedura enriquecida isotopicamente – HFBA como par iônico	124
Figura 44: Fator de propagação de erro empregando um padrão de selênio de abundância natural frente à amostra de levedura enriquecida em ^{78}Se	125
Figura 45: Resultado da cromatografia 2D (A - fase reversa e B - troca aniônica) para quantificação de selenometionina por IDA espécie-específica; ^{78}Se ^{80}Se	126
Figura 46: Procedimento para identificação de proteínas por LC-ESI-MS	128
Figura 47: Perfil cromatográfico obtido para extração aquosa da amostra de levedura enriquecida (SEC-ICP-MS).....	129
Figura 48: Perfil cromatográfico obtido da extração aquosa da amostra de levedura enriquecida por UV (A) e ICP-MS (B)	131
Figura 49: Sequência de aminoácidos identificados na proteína heat shock 12 kDa nas leveduras comercial e enriquecida em ^{78}Se	133
Figura 50: Proteínas identificadas na fração de 12 kDa da levedura comercial	134
Figura 51: Proteínas identificadas na fração de 12 kDa da levedura enriquecida isotopicamente em ^{78}Se	134

Lista de tabelas

Tabela 1: Programa de decomposição do HPA-S.....	59
Tabela 2: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP-MS (DRC II e Nexlon)	59
Tabela 3: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP OES.....	60
Tabela 4: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP-MS (Agilent 7700x)	61
Tabela 5: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP-MS (MC)	62
Tabela 6: Condições operacionais do acoplamento HPLC-ICP-MS para especiação de selênio em levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se)	64
Tabela 7: Composição dos meios de cultura à base de açúcar mascavo	66
Tabela 8: Condições operacionais para obtenção do perfil proteico por SEC-HPLC	69
Tabela 9: Condições operacionais do acoplamento HPLC-ESI-Q-TOF-MS para a análise do extrato peptídico	70
Tabela 10: Condições operacionais e figuras de mérito analítico do método para determinação de Se em levedura.	81
Tabela 11: Fração mássica de selênio em levedura enriquecida. Resultados expressos como $\bar{x} \pm U(n=5; p=0.05)$	83
Tabela 12: Fração mássica de selênio em suplementos alimentares comerciais. Resultados expressos como μg por comprimido; $\bar{x} \pm U(k=2; n=5)$	85
Tabela 13: Matriz de experimentos para planejamento composto central.....	88
Tabela 14: Teste de ANOVA do modelo matemático da superfície de resposta	90
Tabela 15: Razão isotópica de selênio obtida por DRC-ICP-MS.....	92
Tabela 16: Razão isotópica de selênio por DRC-ICP-MS considerando o efeito da discriminação de massas	93
Tabela 17: Exatidão e incerteza relativa do método para a determinação	

de Se total por diluição isotópica usando ICP-MS do tipo quadrupolo com DRC II.....	95
Tabela 18: Fração mássica de selênio em suplemento alimentar. Resultados expressos como média \pm incerteza expandida ($k=2$; $p=0,05$)	97
Tabela 19: Informações sobre as espécies de selênio informadas no rótulo dos suplementos alimentares	102
Tabela 20: Resultado do estudo de viabilidade celular da levedura em diferentes meios de cultivo.	104
Tabela 21: Composição isotópica da levedura enriquecida em ^{78}Se	109
Tabela 22: Efeito da correção do <i>spectral skew</i> sobre a medida da razão isotópica.....	112
Tabela 23: Fração mássica de selênio total por ICP-Q-MS (Agilent 7700). Resultados em mg kg^{-1}	112
Tabela 24: Fração mássica de selênio total por ICP-Q-MS e MC-ICP-MS. Resultados expressados como média \pm U em mg kg^{-1} ; $k=2$	115
Tabela 25: Condições instrumentais para a determinação de selenometionina em levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se) por HPLC-ICP-MS	116
Tabela 26: Condições instrumentais para a determinação de selenometionina em levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se) por SAX-HPLC-ICP-MS	120
Tabela 27: Condições instrumentais para separação cromatográfica utilizando acetato de amônio.	121
Tabela 28: Condições instrumentais do HPLC com fase reversa utilizando HFBA como par iônico.	123
Tabela 29: Resumo das diferentes abordagens para quantificação de selenometionina.....	127
Tabela 30: Condições instrumentais utilizadas para análise por HPLC-ESI-MS	132

“O verdadeiro químico vê Deus em todas as formas diversas do mundo exterior. E assim, à medida que contemplar a variedade e beleza do mundo exterior, e lhe penetrar as maravilhas científicas, saberá sempre se elevar até a Sabedoria Infinita, cuja bondade lhe permite provar as alegrias da ciência; tornar-se-á melhor ao mesmo tempo em que mais sábio. ”

*Humphry Davy
Químico Inglês séc. XIX*

1

Introdução

1.1. Selênio

O selênio (Se) é um elemento essencial que atua em diversos processos bioquímicos do corpo humano e pode apresentar-se nas formas inorgânicas como Se IV, Se VI e também nas formas orgânicas como selenocisteína e selenometionina, que são análogos aos aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina, respectivamente (ALMONDES et al., 2010). Na natureza o Se pode ser encontrado no solo, nas plantas e animais e em sistemas aquáticos (SIMMONS; WALLSCHLÄGER, 2005), sendo a alimentação, a principal fonte de selênio para o ser humano. Dessa forma, uma dieta regrada e balanceada é capaz de suprir as necessidades do corpo humano. Contudo o teor desse elemento nos alimentos pode ser heterogêneo e estar diretamente relacionado às concentrações de selênio no solo, onde os alimentos são cultivados (DUMONT; VANHAECKE; CORNELIS, 2006). Em países como a China, problemas de saúde pública podem estar relacionados à deficiência desse elemento na alimentação, provavelmente devido a solos com baixas concentrações de selênio. O papel essencial que desempenham muitos elementos traço, a exemplo do selênio, suas implicações na prevenção de uma série de doenças, além das baixas concentrações encontradas na dieta de muitos países, são a origem do crescente interesse na investigação, desenvolvimento e comercialização de suplementos alimentares enriquecidos com esses elementos (MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009).

A importância do selênio como elemento essencial na dieta humana foi reconhecida após a descoberta da doença de Keshan, uma cardiomiopatia que atinge crianças e mulheres jovens (CHEN et al., 1980; GE; YANG, 1993) com alta incidência em algumas regiões áridas da Austrália, nordeste, centro e sul da China, norte da Coreia do Norte, Nepal e Tibete onde o solo é extremamente pobre nesse elemento. Outra doença relacionada com a deficiência de selênio foi registrada também em áreas da China, doença de Kaschin-Beck que é uma enfermidade articular deformativa caracterizada pelos danos oxidativos de

cartilagens que resultam em deformação da estrutura óssea (GE; YANG, 1993; TINGGI, 2003).

A deficiência de selênio, também pode resultar em mialgia, degeneração pancreática, sensibilidade muscular e maior suscetibilidade ao câncer. Em concentrações elevadas no organismo, o selênio torna-se tóxico podendo gerar fadiga muscular, enfraquecimentos das unhas, queda de cabelo, dermatite, alteração do esmalte dos dentes, etc sendo muito estreito, o limite entre a essencialidade e a toxicidade (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008; REID et al., 2004).

No organismo, o selenato é reduzido a selenito e posteriormente a seleneto, base para a biossíntese essencial das selenoproteínas envolvendo a glutathione peroxidase nesse processo de redução. O seleneto é então transformado em selenocisteína de maneira similar ao metabolismo do enxofre. A selenometionina pode ser metabolizada para adenosil-selenometionina e seleno-metil-selenometionina que poderá ser convertida em seleno-metil-selenocisteína e γ -glutamil-seleno-metil-selenocisteína. Em teores elevados de selênio, a seleno-metil-selenocisteína torna-se o composto predominante, embora outros compostos também possam estar presentes, porém em baixas concentrações (WHANGER, 2007). Um esquema simplificado da rota metabólica do selênio no organismo é apresentado na Figura 1.

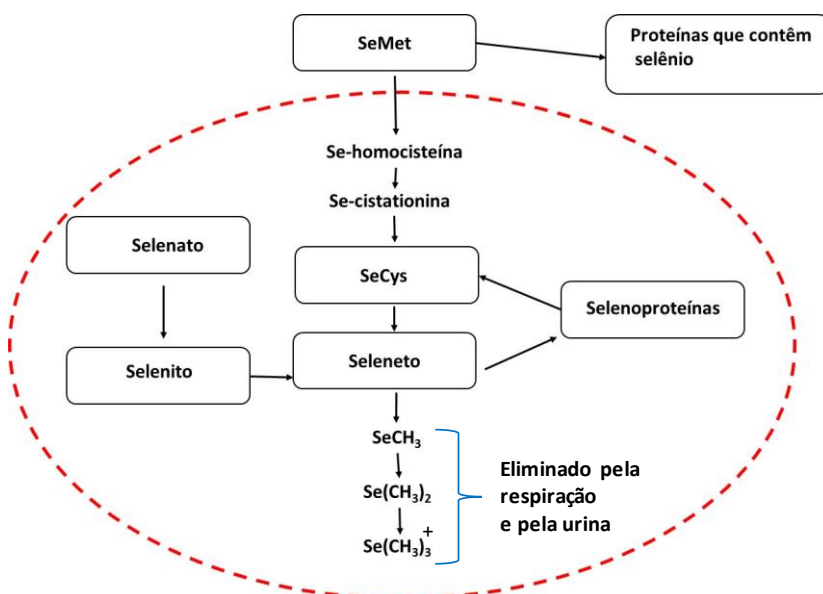


Figura 1: Rota metabólica de selênio em animais superiores. Adaptado de (IGLESIAS, 2010)

Sabe-se que a toxicidade e a biodisponibilidade dos compostos de selênio têm relação com sua forma química e concentração. Segundo Wachowicz e

colaboradores (WACHOWICZ; ŻBIKOWSKA; NOWAK, 2001), no meio ambiente, os íons selenato e selenito são espécies altamente solúveis em água e por isso são tóxicas para sistemas biológicos mesmo em baixas concentrações. Por sua vez, o selênio elementar (Se^0) é uma espécie insolúvel em água e não apresenta toxicidade para os sistemas biológicos. Em contrapartida, os selenetos (Se^{2-}) são espécies altamente tóxicas e reativas, porém são rapidamente oxidadas a Se^0 .

Os níveis de selênio em alimentos e bebidas foram revisados por Rayman e colaboradores em 2008 (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008). Os alimentos contribuem em maior extensão para a ingestão de selênio que o consumo de água. A suplementação de selênio na forma de alimentos funcionais como leite, brócolis, alho, cebola, champignon permite que as espécies de selênio metiladas sejam facilmente metabolizadas pelos mamíferos para as formas com atividades anticarcinogênicas (GAMMELGAARD; JACKSON; GABEL-JENSEN, 2011).

Os legumes e as frutas possuem, na sua maioria, baixos teores de selênio ($<0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). Níveis de selênio na carne e nos frutos do mar são próximos de $0,3\text{-}0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, grãos e cereais contêm geralmente concentrações de selênio menores ($0,01\text{-}0,67 \text{ mg kg}^{-1}$).

Na China, grandes variações no teor de selênio foram encontrados em grãos de milho, arroz, feijão e soja, em áreas com altos níveis de selênio foram encontradas concentrações entre $4\text{-}12 \text{ mg kg}^{-1}$ e para aquelas áreas com baixo nível de selênio foram encontradas concentrações entre $0,005\text{-}0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (WHO, 1996).

Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2002) realizaram um estudo sobre a concentração de selênio em alimentos consumidos no Brasil: farinhas (trigo, arroz, mandioca e milho), carnes (ave, suína, bovina e pescado), frutas, leguminosas, hortaliças, ovos, leite e derivados, etc. Baixos teores de selênio (teores médios: $0,5$ a $13,6 \mu\text{g}/100\text{g}$) foram encontrados no grupo das farinhas, grupo que constitui a principal fonte de alimentos das populações de baixa renda no Brasil. Observaram-se teores mais elevados nos produtos de origem animal, pescados (teores médios: $11,3 - 80,9 \mu\text{g}/100\text{g}$), nas frutas, leguminosas e hortaliças observaram-se baixas concentrações de selênio (teores médios: $0,0$ a $11,9 \mu\text{g}/100\text{g}$), sendo o feijão preto a hortaliça com maiores níveis de selênio (teor médio: $11,9 \mu\text{g}/100\text{g}$).

A castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) é bem conhecida por suas altas concentrações de selênio. Sabe-se que os níveis de selênio nas plantas dependem fortemente do solo onde se encontram, neste caso as concentrações de selênio nas castanhas originárias da parte central do Brasil possuem

concentrações maiores de selênio ($36 \pm 50 \text{ mg kg}^{-1}$) que as da parte ocidental do país ($3,06 \pm 4,01 \text{ mg kg}^{-1}$) (CHANG et al., 1995). As concentrações de selênio na castanha do Pará excedem, em uma única castanha, a quantidade diária de selênio recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

Normalmente a quantidade de selênio disponível em uma dieta diversificada é suficiente para descartar a necessidade de qualquer suplementação alimentar de selênio, porém em certas populações da Europa, Ásia e da África, a ingestão diária atinge valores menores que $50 \mu\text{g dia}^{-1}$ e em partes da China, valores menores que $25 \mu\text{g dia}^{-1}$, fato que pode contribuir para o desenvolvimento da doença de Keshan (ZENG, 2009). Dessa maneira, o uso de suplemento alimentar enriquecido em selênio tem sido uma alternativa viável para complementar a alimentação.

1.2.

Essencialidade do selênio

O selênio, como elemento traço essencial, foi descoberto em 1957 por prevenir necrose do fígado em animais com deficiência de vitamina E, além de ser um elemento essencial na dieta humana e de animais estando envolvido no mecanismo de proteção antioxidante do organismo. Em células e tecidos humanos foram identificados mais de 25 selenoproteínas diferentes contendo selenocisteína, dentre elas, a glutathione peroxidase (GSHPx) é a mais conhecida. Glutathione peroxidase é uma família de enzimas que contêm selenocisteína como centro ativo e desempenham um papel importante na desintoxicação de vários hidroperóxidos, bem como na proteção celular contra o estresse oxidativo (LOPEZ HERAS; PALOMO; MADRID, 2011)

As selenoproteínas são consideradas como enzimas antioxidantes, pois auxiliam na prevenção do dano celular causado pelos radicais livres, além de contribuir para a regulação da glândula tireoide e ter um papel importante no sistema imunológico (DAHLKE et al., 2005; GIERUS, 2007).

Estudos sugerem que o selênio pode reduzir os riscos de diferentes formas de câncer, porém a natureza complexa do selênio em relação à prevenção desta doença mostra que seu entendimento não está totalmente elucidado (LOPEZ HERAS; PALOMO; MADRID, 2011).

O selênio está unido às proteínas ligado covalentemente aos aminoácidos, selenocisteína, entre outros. As selenoproteínas podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com a localização da selenocisteína no polipeptídeo da

selenoproteína. No grupo I, a selenocisteína está localizada na posição N-terminal, as glutathionas peroxidases e a selenoproteína W podem ser classificadas neste grupo. No grupo II, a selenocisteína está presente na sequência do C-terminal como é o caso da família das tireodoxina redutases (LOPEZ HERAS; PALOMO; MADRID, 2011).

Em 1973, o selênio foi identificado como importante componente da glutathiona peroxidase (ROTRUCK et al., 1973) (GPx, uma proteína tetramérica com quatro átomos de selênio por molécula). A GPx participa de importantes rotas metabólicas onde atua como agente antioxidante celular evitando assim, o *stress* oxidativo das células. As principais formas de GPx são: GPx1 ou clássica presente no citosol, GPx2 e GPx3 são antioxidantes encontradas no trato gastrointestinal e no plasma, a GPx4 ou fosfolípídeo hidroperóxido (ABDULAH et al., 2005; SARMENTO, 2006).

A iodotironina deiodinase é uma selenoenzima e está envolvida em importantes processos bioquímicos em diferentes hormônios na glândula tireóide, atua na produção e regulação dos níveis de hormônio tireoidiano ativo-T3, a partir da tiroxina-T4 (biologicamente inativa)(SARMENTO, 2006).

A tiodoxina redutase é uma proteína largamente distribuída no organismo que regula diversos processos redox intracelulares e é uma das proteínas envolvidas nos mecanismos de reparo essenciais para síntese de DNA(ABDULAH et al., 2005).

Dentre as selenoproteínas, a selenoproteína P está majoritariamente presente no plasma sanguíneo e atua como uma proteína transportadora de selênio e como antioxidante sobre os tecidos endoteliais. A selenoproteína W - selenoproteína de baixo peso molecular - contém um resíduo de selenocisteína e existe sobre quatro formas sendo que uma delas possui a glutathiona peroxidase ligada a um resíduo de cisteína, o que indica uma possível ação redox, e é necessária para o perfeito funcionamento muscular. A selenoproteína R contém selenocisteína no C-terminal e não possui função conhecida(ABDULAH et al., 2005). Existem dezenas de famílias de selenoproteínas, porém não estão totalmente caracterizadas(LOPEZ HERAS; PALOMO; MADRID, 2011).

De maneira geral, o selênio funciona como um importante centro redutor, principalmente na neutralização dos radicais livres(SARMENTO, 2006), devido a essa característica, o selênio tem sido empregado como alternativa ao tratamento de doenças como o câncer(ALMONDES et al., 2010) e outras funcionalidades como o aumento do sistema imunológico além de possuir relevância na redução dos efeitos da intoxicação por metais como Cd, Hg, Ag, Pb e Cu pela formação de

complexos inertes com estes elementos(SORMO et al., 2011; YAMASHITA et al., 2011).

Dentro de limites fisiológicos, quantidades traço de selênio são retidas pelo organismo (na forma de selenometionina) enquanto que o selênio excedente pode ser excretado pela urina na forma de trimetil selênio $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$ e pela respiração na forma de dimetil selênio $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ (ABDULAH et al., 2005). A deficiência de selênio diminui a expressão das selenoproteínas, alterando os processos biológicos os quais estão envolvidas, e como consequência surgem enfermidades causadas por essa deficiência.

1.3.

Toxicidade do selênio

O selênio possui caráter dual, porém, sua toxicidade nem sempre é relatada. Conforme descrito por Jennifer e colaboradores em 2010 (MACFARQUHAR et al., 2010), um envenenamento severo ocorreu nos EUA, provocado pela ingestão de suplemento alimentar de selênio mal formulado, comercializado como sendo “adequado para a família inteira, fornecer equilíbrio de nutrientes e manter a energia e a saúde”. Tal suplemento apresentou concentrações 200 vezes aquela informada no rótulo (analisado pelos laboratórios do *food and drug administration* - FDA). As altas concentrações de selênio provocaram surto generalizado em dez estados Norte Americanos, afetando 201 pessoas que apresentaram sintomas como: diarreia (78%), fadiga (75%), perda de cabelo (72%), dor nas articulações (70%), descoloração ou perda de brilho nas unhas (61%) e náuseas (58%). Devido à variedade de sintomas apresentados e aos poucos casos conhecidos por envenenamento de selênio, o diagnóstico médico é dificultado. Em outro caso relacionado com o envenenamento agudo por selênio em humanos, pessoas que ingeriram tabletes vitamínicos contendo altos níveis de selênio (entre 500 a 1000 vezes o informado no rótulo) apresentaram sintomas como náuseas, vômitos, dores abdominais, espasmos musculares, entre outros(CLARK et al., 1996).

Atualmente, a toxicidade do selênio em animais tem sido alvo de inúmeras pesquisas, contudo o entendimento do mecanismo celular ou molecular não está totalmente compreendido. Tingui e colaboradores, (TINGGI, 2003), propuseram que a toxicidade do selênio pode estar relacionada com a interação do selenito com a glutathione para formar trissulfetos de selênio o que leva a formação de superóxidos tóxicos e peróxido de hidrogênio. A toxicidade do selênio não depende somente da forma química e da quantidade do elemento consumido, mas

também de uma variedade de outros fatores que incluem a idade, estado fisiológico, a nutrição e a rota de administração do selênio.

1.4.

Legislação do Ministério da Saúde – (ANVISA)

O selênio pode ser considerado como elemento "nutracêutico" que embora não possua uma definição clara na legislação brasileira, o mesmo pode ser considerado um suplemento dietético, apresentado em matrizes alimentares, tais como comprimidos, cápsulas, pós, etc que é constituído de substância natural bioativa, geralmente presente em alimentos, que pode possuir efeito positivo na saúde (LIRA et al., 2009).

A ANVISA define *Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais como alimentos que servem para complementar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão, a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação. Devem conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva* (ANVISA, 1998).

A ANVISA define Ingestão Diária Recomendada (IDR) como a quantidade de proteína, vitaminas e minerais que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia (ANVISA, 2005).

Os valores de ingestão dietética de referência são estimativas quantitativas da ingestão de nutrientes usados para planejar e avaliar a dieta de indivíduos aparentemente saudáveis; eles incluem (ROCHA et al., 2015):

1. Ingestão diária recomendada (IDR): O nível de ingestão dietética que é suficiente para satisfazer a necessidade de nutrientes de quase todos (97-98%) indivíduos saudáveis em um determinado estágio de vida e grupo de gênero.
2. Ingestão adequada (IA): um valor de ingestão recomendado com base em aproximações ou estimativas observadas ou determinadas experimentalmente de ingestão de nutrientes por um grupo (ou grupos) de pessoas saudáveis que são consideradas adequadas quando uma IDR não pode ser determinada.

3. Nível de ingestão superior tolerável (UL): o nível mais elevado de ingestão de nutrientes que provavelmente não representa risco de efeitos adversos para a saúde de quase todos os indivíduos da população em geral. À medida que a ingestão aumenta acima da UL, o risco de efeitos adversos aumenta.
4. Exigência média estimada (EAR – do inglês *Estimated Average Requirement*): Um valor de ingestão de nutrientes que é estimado para satisfazer a exigência de metade dos indivíduos saudáveis em um estágio de vida e grupo de gênero.

As estimativas da ingestão de nutrientes devem manter um nível definido de nutrição em um indivíduo e pode diferir entre indivíduos de diferentes gêneros, em diferentes fases da vida, ou em locais diferentes (ROCHA et al., 2015).

Os valores recomendados são frequentemente baseados em dados escassos ou extraídos de estudos limitados e definidos de acordo com as regulamentações próprias de cada país. Os valores de ingestão de selênio para adultos são (ROCHA et al., 2015):

1. EUA e Canadá: 55 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para homens e mulheres.
2. Brasil: 34 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para homens e mulheres.
3. Austrália e Nova Zelândia: 70 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para os homens e 60 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para as mulheres.
4. Países nórdicos: 60 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para os homens e 50 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para as mulheres.
5. Organização Mundial da Saúde (OMS) / Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO): 34 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para homens e 26 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para mulheres.

Mais informações são necessárias para definir os valores de ingestão recomendados para pessoas aparentemente saudáveis, bebês, crianças, adolescentes e mulheres grávidas e lactantes. Além disso, é necessário compreender melhor a relação entre os nutrientes e reduzir o risco de doenças crônicas, a fim de determinar os indicadores de adequação, bem como os efeitos adversos do consumo excessivo de nutrientes (ROCHA et al., 2015).

A maioria dos estudos utiliza o *Food Frequency Questionnaire* (FFQ) para estabelecer os valores recomendados para selênio. O FFQ baseia-se nos valores dos rótulos dos alimentos e, conseqüentemente, fornece estimativas imprecisas. Baixos coeficientes de correlação são frequentemente encontrados entre a ingestão de selênio e indicadores de adequação. Além disso, os valores recomendados para consumo ou suplementação de selênio não leva em consideração as suas várias formas químicas (orgânicas e inorgânicas) e os seus diferentes efeitos sobre o organismo (ROCHA et al., 2015).

1.5.

Técnicas analíticas empregadas para a determinação de selênio

O desenvolvimento de métodos analíticos destinados à determinação de selênio em suplementos alimentares bem como em amostras biológicas é de vital importância uma vez que o conhecimento da concentração total de selênio fornece informações sobre o status nutricional.

A análise de selênio total pode ser realizada empregando o espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) mediante o monitoramento dos seus diferentes isótopos. Porém este elemento está sujeito à alta incidência de interferências espectrais originadas por espécies poliatômicas geradas pelo gás de plasma, a exemplo do dímero de argônio ($^{40}\text{Ar}^{2+}$) sobre o isótopo mais abundante do selênio (^{80}Se). Isótopos menos abundantes, ^{77}Se (7,63%), ^{78}Se (23,77%), ^{82}Se (8,73%), são geralmente empregados para realização da análise, embora também estejam sujeitos a interferências.

Os espectrômetros de massas baseados em quadrupolo (ICP-Q-MS) não possuem resolução suficiente para discriminar os isótopos de selênio de suas interferências - possui uma resolução, $M/\delta M$, de $\cong 300$ (que permite resolver aproximadamente 1 unidade de massa). Alternativamente ao ICP-Q-MS, existem espectrômetros de massas com alta resolução (HR-ICP-MS), que estão baseados em um sistema com um analisador de campo magnético e um analisador eletrostático. O sistema HR-ICP-MS pode chegar a resoluções superiores a 7500 (o que permite resolver centésimos de uma unidade de massa).

Embora o emprego do ICP-MS de alta resolução apresente vantagens inquestionáveis em relação à resolução de interferências espectrais, em comparação ao espectrômetro de massa com separador quadrupolar, seu

emprego não tem sido muito difundido, principalmente devido ao alto custo desta técnica.

Assim, ICP-MS com células de reação e/ou colisão são amplamente utilizados para eliminar as interferências espectrais. Nesse caso, é empregado um gás de reação, que reaja de forma seletiva com o interferente, ou um gás de colisão, que elimine as espécies interferentes pela discriminação de energia cinética.

1.5.1. ICP-MS (quadrupolo-Q)

A técnica de ICP-MS tem como principal vantagem a possibilidade de análise multielementar sequencial rápida aliada à alta sensibilidade. Nessa técnica, os íons gerados no plasma, são direcionados para o analisador de massas que possui a finalidade de separá-los em função de sua razão massa-carga. No mercado estão disponíveis diversos modelos de espectrômetros de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) com separadores de massa distintos, porém, o mais difundido é o quadrupolo.

O ambiente onde são formados os íons se encontra à pressão ambiente, e o acoplamento dessa fonte de íons ao espectrômetro de massas que se encontra em uma região de aproximadamente 10^{-6} Torr representou um desafio ao desenvolvimento desta técnica. Dessa forma, desenvolveu-se uma interface para realizar a extração e envio do feixe iônico para o separador de massas. A interface apresenta pressão de aproximadamente 10^{-3} Torr e, dessa forma, possibilitou o acoplamento do plasma ao separador de massas. O feixe iônico entra na interface através do orifício do cone *sampler*, que tem aproximadamente 1 mm de diâmetro, atingindo velocidades supersônicas. Nessa região, grande parte das partículas neutras e carregadas negativamente, e também parte dos íons positivos são eliminados do sistema pelas bombas responsáveis pelo vácuo. Parte do feixe passa para a região de alto vácuo do quadrupolo (10^{-6} Torr) através do orifício de um segundo cone, chamado *skimmer*, onde na sequência, o feixe iônico é atraído e colimado por lentes iônicas e direcionado para o analisador de massas. O princípio de funcionamento do mesmo, baseia-se na aplicação de correntes elétricas em pares diametralmente opostos das guias do quadrupolo. Através da variação rápida desses campos sobre o sistema quadrupolar, os íons sofrem desvios em suas trajetórias, de forma que apenas os elementos que possuem uma razão massa-carga que mantenha sua trajetória mais estável, conseguirão

alcançar o sistema de detecção. Por se tratar de uma técnica analítica baseada na determinação de elementos traço através da medição de suas razões massa-carga, a mesma apresenta a incidência de interferências espectrais, relacionadas à presença de outras espécies, poliatômicas ou não, que possuam uma razão massa-carga a qual o separador de massas não é capaz de distinguir da razão massa-carga do analito a ser analisado

A célula de reação tem sido empregada com sucesso para amenizar interferências espectrais (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002). Ela é composta por de um multipolo (semelhante ao quadrupolo, podendo ter 4, 6 ou 8 guias hiperbólicas dependendo do fabricante) ao qual são aplicadas correntes elétricas e radiofrequência alternadamente. No compartimento onde está localizada a célula, é adicionado um gás de reação/colisão como, por exemplo, H₂, He, NH₃, CH₄ ou O₂ ou misturas deles, que ao colidir com espécies interferentes desencadeiam reações moleculares, eliminando-as. Esta tecnologia pode ser considerada uma alternativa interessante à instrumentação de alta resolução (HR-ICP-MS), pelo uso de reações moleculares com gases puros para eliminação de interferências espectrais.

1.5.2. ICP-MS (*high resolution*-HR)

Os equipamentos de ICP-MS com quadrupolo possuem uma limitação em relação ao poder de resolução de interferências espectrais e uma alternativa aos ICP-MS convencionais são os espectrômetros de massa de alta resolução, por exemplo, o *multicollector*-ICP-MS.

A principal diferença de um ICP-MS de alta resolução para um ICP-MS tipo quadrupolo reside no mecanismo de separação dos íons originados no plasma. Enquanto o ICP-MS convencional possui um quadrupolo como elemento de separação de massas, os equipamentos de alta resolução possuem um setor eletrostático e um setor magnético que, operando em conjunto, permitem uma separação dos analitos de interesse das espécies interferentes com maior resolução.

Os equipamentos de alta resolução podem ser encontrados em diferentes configurações podendo ser classificados em *single* ou *multi collector* ICP-MS sendo a diferença entre essas duas configurações, basicamente, a disposição dos elementos de separação de massas. Nos equipamentos *multi collector*-ICP-MS o separador eletrostático é o primeiro elemento de separação que possui como

objetivo focalizar e direcionar o feixe iônico oriundo do plasma para o separador eletromagnético que consiste de um tubo de voo onde é aplicado um campo magnético perpendicular à direção percorrida pelos íons no interior do tubo de voo. Para um campo magnético particular a curvatura da trajetória de voo de um íon de massa “m” e carga “z” será igual à curvatura do tubo de voo permitindo com que o íon atinja o detector. Dessa maneira, alterando o campo magnético, é possível direcionar diferentes íons em função de suas razões massa-carga ao detector (MONTASER, 1998). A Figura 2 apresenta um esquema de montagem de *multi collector*-ICP-MS.

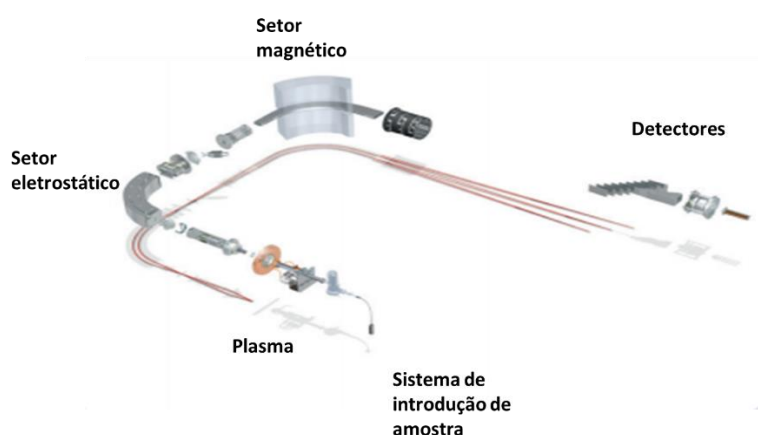


Figura 2: Configuração esquemática do ICP-MS (*multicollector*-MC) (Neptune Plus, Thermo). Adaptado do manual do equipamento (www.thermofisher.com).

A configuração utilizada no MC-ICP-MS possibilita a detecção simultânea de mais de um isótopo e isso deve-se principalmente à resolução especial dos íons pelo setor magnético. Após a separação dos íons de interesse em função de sua razão massa/carga, eles são direcionados ao detector.

A possibilidade de medição simultânea de várias razões massa-carga fornece uma vantagem de eliminar grande parte do ruído oriundo das flutuações do plasma e do sistema de introdução de amostra (ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013), o que conseqüentemente resulta em melhor precisão na medição de razões isotópicas em comparação com ICP-MS do tipo quadrupolo.

1.5.3. Interferências em espectrometria de massas

1.5.3.1. Interferências não espectrais

As interferências não-espectrais são caracterizadas pelas diferenças nas propriedades físico-químicas entre a solução de amostra e as soluções dos padrões analíticos, como a tensão superficial e a viscosidade, que ocasionam alterações nas taxas de transporte e nebulização da solução, além de supressão de ionização, efeito espaço-carga para ICP-MS e conseqüentemente, na resposta do equipamento. Para solucionar este tipo de interferência, normalmente se aplicam técnicas de quantificação específicas ou medidas de contorno, tais como:

- I. Simulação de matriz (Matrix matching): Consiste na preparação de soluções analíticas padrão para a construção da curva analítica com composição similar à amostra;
- II. Padronização Interna: Consiste na adição de um elemento que não esteja presente na amostra (se presente, deve-se conhecer a concentração exata do mesmo), em todas as soluções, brancos, nos padrões da curva analítica e amostras, em quantidades idênticas, de forma a obter-se um sinal normalizado, compensando as variações sofridas pelos analitos nas diferentes soluções;
- III. Adição do Analito: Consiste na realização da curva analítica, através de adições, na amostra, de concentrações crescentes e conhecidas do elemento de interesse, gerando uma elevação significativa no sinal do mesmo;
- IV. Aumento na diluição de amostras que possuam alto teor de sólidos dissolvidos, desde que não resulte em diluição excessiva dos analitos.
- V. Diluição isotópica para ICP-MS

1.5.3.2. Interferências espectrais

Em espectrometria de massa, a interferência espectral ocorre quando a resolução do equipamento não é suficiente para separar espécies com razões massa/carga próximas (BJÖRN et al., 1998). As interferências espectrais são classificadas de acordo com a espécie interferente:

- I. Interferência isobárica direta, caracterizada pela sobreposição total ou parcial das razões massa/carga de um isótopo de outro elemento sobre o analito;
- II. Íons poliatômicos (MX^+), formados pela recombinação de íons gerados no plasma, originados por componentes do solvente, da amostra, ou até por componentes da atmosfera ou do próprio gás que compõe o plasma;
- III. Íons de óxidos refratários (MO^+), que podem ser formados pela decomposição incompleta dos componentes da matriz ou por recombinação de íons no plasma com oxigênio presente no solvente, na atmosfera ou na amostra;
- IV. Íons de dupla carga (M^{+2}), que pode ser do próprio analito, tendo sua razão massa/carga reduzida à metade, fazendo com que ocorra uma diminuição no sinal real do analito, ou pela dupla ionização de outros elementos presentes na solução da amostra, tendo massa correspondente ao dobro da massa do analito.

As principais interferências espectrais são usualmente informadas pelo software do equipamento e podem ser contornadas pela escolha de um isótopo alternativo, por equações de correção ou ainda, por formas alternativas de introdução da amostra (quando estas permitem a separação do analito da matriz, eliminando as espécies interferentes). Por sua vez, as interferências ocasionadas por óxidos e íons de dupla carga são, normalmente, controladas pela otimização das condições operacionais do plasma, como a potência da radiofrequência e a vazão do gás de nebulização.

1.6. Diluição isotópica

A análise por diluição isotópica (IDA, do inglês *isotope dilution analysis*) é um método de quantificação bem estabelecido, baseado na medida da razão dos isótopos na amostra, após alteração intencional de sua composição isotópica pela adição de uma quantidade conhecida de um dos isótopos enriquecido do elemento. A partir da medida da nova relação isotópica da solução resultante (amostra + padrão isotópico), se pode calcular a concentração do elemento de interesse na amostra original.

De acordo com Rodríguez-González et.al (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005) a equação da diluição isotópica pode ser expressada de diferentes maneiras equivalentes e uma delas baseia-se na relação entre a quantidade em mol do isótopo naturalmente abundante na amostra de interesse (N_s) e o isótopo de um padrão enriquecido (N_{sp}).

O desenvolvimento matemático da equação da diluição isotópica parte do balanço de massa entre os isótopos a e b na solução resultante da homogeneização entre amostra e padrão isotópico como segue.

$$N_m^a = N_s^a + N_{sp}^a \quad \text{Eq. 1}$$

$$N_m^b = N_s^b + N_{sp}^b \quad \text{Eq. 2}$$

Onde N_m , N_s e N_{sp} são as quantidades, em mol, na mistura, na amostra e na solução do padrão enriquecido isotopicamente respectivamente, dos isótopos a e b .

Reescrevendo as equações acima como uma divisão entre os isótopos a e b , obtém-se:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_{sp}^a}{N_s^b + N_{sp}^b} \quad \text{Eq.3}$$

Considerando as abundâncias dos isótopos (A) a e b na amostra e no padrão enriquecido isotopicamente, a equação 3 pode ser expressada da seguinte maneira:

$$R_m = \frac{N_s A_s^a + N_{sp} A_{sp}^a}{N_s A_s^b + N_{sp} A_{sp}^b} \quad \text{Eq.4}$$

Que após um rearranjo matemático passa a ser:

$$N_S = N_{Sp} \frac{R_m A_{Sp}^b - A_{Sp}^a}{A_S^a - R_m A_S^b} \quad \text{Eq.5}$$

Como se pode observar a equação 5 relaciona a quantidade, em mol, do padrão enriquecido isotopicamente adicionado à amostra com a quantidade, em mol, do analito originalmente presente na amostra. Entretanto, realizar a medição direta da quantidade matéria, em mol, com confiabilidade metrológica, é uma tarefa árdua uma vez que os padrões certificados normalmente utilizados no processo de medição são certificados em termos de fração mássica. Dessa maneira a equação 5 pode ser reescrita em termos de fração mássica e para isso, Rodríguez-González (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005) definiram que $R_S = (A_S^b)/(A_S^a)$ como a relação isotópica (b/a) na amostra e $R_{Sp} = (A_{Sp}^a)/(A_{Sp}^b)$ como a relação isotópica (a/b) na solução do padrão enriquecido isotopicamente, dessa maneira a equação 5 pode ser reescrita como:

$$N_S = N_{Sp} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{Eq.6}$$

Por fim, utilizando a expressão $N = (C \times m/M)$, onde N = quantidade, em mol, C = fração mássica, m = massa de amostra, em g e M = massa molar, em g/mol; obtêm-se a equação final da diluição isotópica (Eq.7).

$$C_S = C_{Sp} \frac{m_{Sp}}{m_S} \frac{M_S}{M_{Sp}} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{Eq.7}$$

Onde C_S e C_{Sp} são as frações mássicas do elemento na amostra e no material enriquecido (*spike*), respectivamente, m_S e m_{Sp} são as massas de amostra e de padrão enriquecido isotopicamente, respectivamente, e M_S e M_{Sp} são as massas molares do elemento na amostra e no padrão enriquecido isotopicamente, A_S^a , A_S^b e A_{Sp}^a , A_{Sp}^b são as abundâncias dos isótopos a e b na amostra e no padrão enriquecido isotopicamente, respectivamente, R_m é a relação isotópica (a/b) na mistura, R_S a relação isotópica (b/a) na amostra e R_{Sp} a relação isotópica (a/b) no material enriquecido.

Como se pode observar na equação 7, o único parâmetro desconhecido é a fração mássica do elemento na amostra e dessa forma, a simples medição da relação isotópica na mistura (R_m) é capaz de fornecer a fração mássica do elemento na amostra original.

A IDA oferece vantagens sobre outras técnicas de calibração (calibração externa, adição de analito), pois compensa possíveis perdas parciais do analito durante a preparação da amostra, desde que tenha sido atingido o equilíbrio isotópico entre o padrão enriquecido isotopicamente e a amostra, além de ser considerada uma forma ideal de padronização interna (o padrão interno para cada elemento é um de seus próprios isótopos). Outro aspecto importante a ser considerado em diluição isotópica é o fato de que a incerteza do resultado final depende quase que exclusivamente da medida das razões isotópicas, excluindo assim, a fonte de incerteza presente nos métodos de quantificação tradicionais, a curva analítica.

A IDA é reconhecida pelo *Comité Consultatif pour la Quantité de Matière* (CCQM) como método primário para a caracterização de um elemento em uma amostra por possuir as maiores qualidades em termos metrológicos, cujo funcionamento é descrito completamente em termos de unidades SI e cujos resultados são aceitos sem referência a padrões analíticos.

Quando aplicada à especiação, existem basicamente duas modalidades de IDA, que podem ser utilizadas de acordo com a necessidade do método analítico a ser desenvolvido. Dependendo de quando e de qual a forma química do isótopo enriquecido adicionado à amostra, a análise por IDA pode ser classificada em: “espécie-específica” e “espécie-não específica” (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005)(GINÉ; PACKER, 2010).

Heumann e colaboradores(HEUMANN; ROTTMANN; VOGL, 1994; ROTTMANN; HEUMANN, 1994), estabeleceram as bases para a realização da análise de especiação com quantificação por diluição isotópica utilizando técnicas de separação cromatográfica acoplada ao ICP-MS. A adição do isótopo enriquecido pode ser feita de duas maneiras: a) adição de isótopo enriquecido pós-coluna (modo espécie não específica) e b) adição de espécies enriquecidas isotopicamente na amostra antes do processo de separação cromatográfica (modo espécie específica).

No modo “espécie-não específica”, a adição do isótopo enriquecido é realizada depois da separação cromatográfica das espécies, apresentando como principal vantagem a capacidade de análise por IDA na ausência de padrões da espécie química a ser determinada, porém, deve haver completa homogeneização

entre o analito oriundo da coluna cromatográfica com a solução do padrão enriquecido isotopicamente antes do processo de ionização no plasma. Nessa abordagem, prováveis perdas de analito anteriores à detecção não são compensadas. Esse modo é preferencialmente usado quando a espécie química não é exatamente conhecida ou quando os compostos não são encontrados comercialmente ou não podem ser sintetizados.

A equação utilizada para a diluição isotópica tradicional (Eq.7) não pode ser utilizada quando pretende-se realizar a abordagem IDA espécie não-específica pelo simples fato de que nessa abordagem a solução do padrão enriquecido isotopicamente é adicionada em linha logo após a separação cromatográfica. Dessa maneira, a Eq.7 deve ser modificada de maneira a considerar a vazão (f) e a massa específica (μ) da solução do padrão enriquecido isotopicamente. Assim, o balanço de massa utilizado no desenvolvimento matemático da equação da diluição isotópica tradicional deve considerar essas variáveis. Como segue:

$$N_S^a \mu_S f_S + N_{Sp}^a \mu_{Sp} f_{Sp} = N_m^a \mu_m f_m \quad \text{Eq.8}$$

$$N_S^b \mu_S f_S + N_{Sp}^b \mu_{Sp} f_{Sp} = N_m^b \mu_m f_m \quad \text{Eq.9}$$

Dividindo as equações 8 e 9, obtêm-se a razão isotópica entre os isótopos a e b na mistura (R_m) depois da separação cromatográfica, como segue:

$$R_m = \frac{N_S^a \mu_S f_S + N_{Sp}^a \mu_{Sp} f_{Sp}}{N_S^b \mu_S f_S + N_{Sp}^b \mu_{Sp} f_{Sp}} = \frac{N_S A_S^a \mu_S f_S + N_{Sp} A_{Sp}^a \mu_{Sp} f_{Sp}}{N_S A_S^b \mu_S f_S + N_{Sp} A_{Sp}^b \mu_{Sp} f_{Sp}} \quad \text{Eq.10}$$

Se for realizada na equação 10 uma ponderação das quantidades, em mol, pelas abundâncias dos respectivos isótopos (considerando que $R_S = (A_S^b)/(A_S^a)$ e $R_{Sp} = (A_{Sp}^a)/(A_{Sp}^b)$), e rearranjando a equação de forma a isolar os termos relacionados às quantidades, em mol, do analito presente na amostra, obtêm-se a equação 11.

$$N_S d_S f_S = N_{Sp} d_{Sp} f_{Sp} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{Eq.11}$$

Novamente, a exemplo da equação 7, pode-se transformar a quantidade, em mol, em fração mássica, considerando a massa molar do analito de interesse, dessa forma a equação 11 pode ser expressada como:

$$C_S d_S f_S = MF_S = C_{Sp} d_{Sp} f_{Sp} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{Eq.12}$$

O 1º termo da equação 12 corresponde ao fluxo mássico (MFs) do analito efluente da coluna cromatográfica em unidades de massa em função do tempo, por exemplo $\mu\text{g min}^{-1}$. A equação 12 é aplicada durante toda a corrida cromatográfica (Fig. 3A) obtendo-se assim um cromatograma de fluxo mássico (Fig.3B) como exemplificado na Figura abaixo.

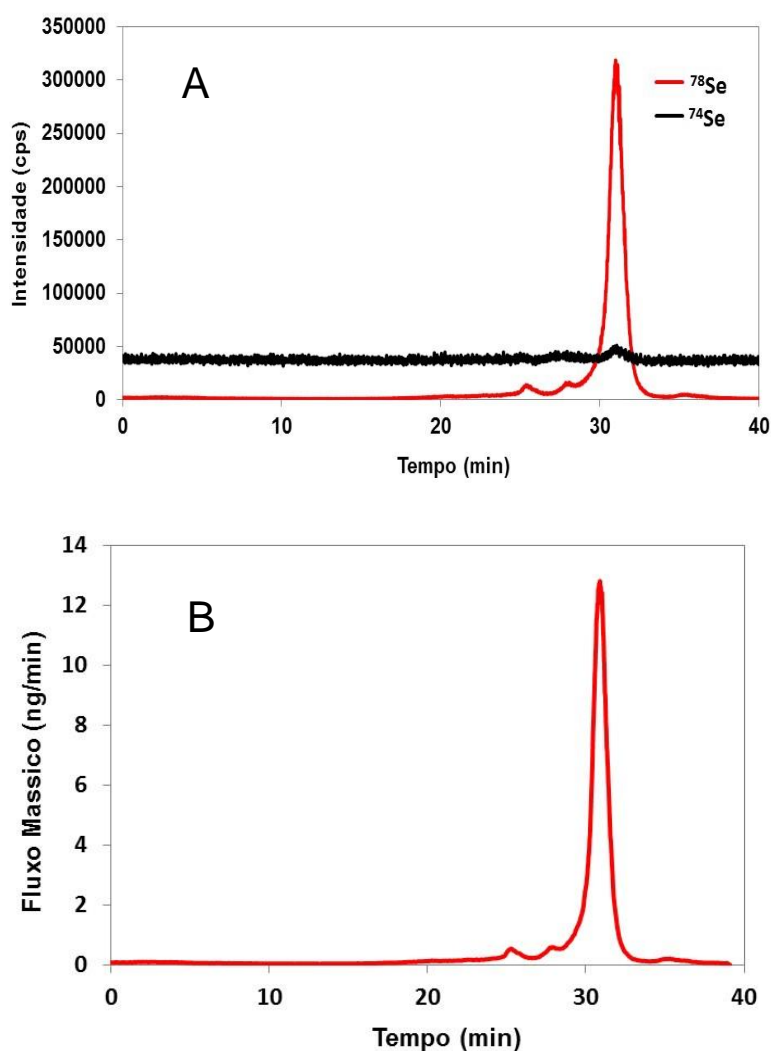


Figura 3: Cromatograma obtido por RP-HPLC-ICP-MS (A) e cromatograma de fluxo mássico (3B)

A integração dos picos cromatográficos (Fig. 3B) obtidos dessa maneira fornece a quantidade em massa do analito presente na amostra analisada e após a divisão dessa massa obtida pelo volume de injeção obtêm-se a concentração do analito de interesse.

Outra abordagem que merece destaque para a IDA tem sido desenvolvida nos últimos anos e baseia-se na medição das abundâncias nas amostras enriquecidas com o padrão isotópico em vez das razões isotópicas. Sua principal vantagem reside no fato que a medida de todos os isótopos do elemento de interesse permite realizar a correção da discriminação de massas e de interferências espectrais internamente, ou seja, sem a necessidade do emprego de padrões externos para estimativa de fatores de correção (P. RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2010).

Desse modo, a composição isotópica da mistura é decomposta matematicamente em seus constituintes pelo emprego da regressão linear múltipla por mínimos quadrados. Esse procedimento matemático é conhecido como deconvolução de perfis isotópicos (do inglês, *isotope pattern deconvolution-IPD*) e possui aplicações em análises de especiação e estudos de metabolismo.

A equação básica do IPD pode ser desenvolvida considerando a combinação de, por exemplo, três perfis isotópicos distintos, sendo:

- 1- Perfil isotópico endógeno - natural,
- 2- Padrão isotópico adicionado na amostra para um propósito específico, como por exemplo, um estudo de metabolismo e,
- 3- Perfil isotópico do padrão utilizado para fins de quantificação.

Dessa maneira, o balanço molar para a mistura dos 3 perfis isotópicos pode ser escrito como:

$$N_m = N_{nat} + N_{p1} + N_{p2} \quad \text{Eq.13}$$

Onde N_m é a quantidade total de matéria, em mol, do elemento de interesse na amostra analisada, N_{nat} , N_{p1} e N_{p2} são as quantidades de mol correspondentes aos três perfis isotópicos presentes na amostra.

Uma das vantagens do emprego da regressão linear múltipla por mínimos quadrados é a possibilidade de utilização de todos os isótopos do elemento de interesse. Dessa maneira, o balanço molar representado pela Eq. 13 pode ser reescrito considerando cada isótopo (i) individualmente.

$$N_m^i = N_{nat}^i + N_{p1}^i + N_{p2}^i \quad \text{Eq.14}$$

A Eq. 14 por sua vez, pode ser modificada pela ponderação das quantidades de matéria, em mol, dos isótopos individuais pelas suas respectivas abundâncias, como segue:

$$N_m \times A_m^i = N_{nat} \times A_{nat}^i + N_{p1} \times A_{p1}^i + N_{p2} \times A_{p2}^i \quad \text{Eq. 15}$$

Onde A_m^i , A_{nat}^i , A_{p1}^i e A_{p2}^i representam as abundâncias dos isótopos nos 3 perfis isotópicos estudados.

As frações molares dos isótopos estudados podem ser obtidas dividindo-se a Eq.15 pela Eq.13, resultando na Eq.16.

$$A_m^i = X_{nat} \times A_{nat}^i + X_{p1} \times A_{p1}^i + X_{p2} \times A_{p2}^i \quad \text{Eq.16}$$

Onde X_{nat} , X_{p1} e X_{p2} representam as frações molares dos diferentes isótopos em estudo na amostra.

Considerando que o analito de interesse possui n isótopos, a equação 16 pode ser representada como uma notação matricial, sendo essa a equação definitiva para a deconvolução de padrões isotópicos, como segue:

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{p1}^1 & A_{p2}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{p1}^2 & A_{p2}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{p1}^3 & A_{p2}^3 \\ A_{nat}^{n-1} & A_{p1}^{n-1} & A_{p2}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{p1}^n & A_{p2}^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{p1} \\ X_{p2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad \text{Eq.17}$$

A utilização da equação 17 pela minimização da soma quadrática dos erros do modelo, possibilita a obtenção das frações molares do elemento de interesse na solução de leitura discriminando a origem desse elemento em termos do perfil isotópico, nesse caso, X_{nat} , X_{p1} e X_{p2} .

Após a determinação das frações molares, é possível a realização da diluição isotópica mediante a obtenção da razão das frações molares. Considerando que x_{p2} é o padrão isotópico utilizado para quantificação temos:

$$\frac{X_{nat}}{X_{p2}} = \frac{N_{nat}}{N_{p2}} ; \frac{X_{p1}}{X_{p2}} = \frac{N_{p1}}{N_{p2}} \quad \text{Eq.18}$$

Essas duas equações (Eq.18) fornecem as quantidades de matéria, em mol, do elemento com abundância natural (nat) e do isótopo adicionado para o estudo de metabolismo (X_{pt}), uma vez que a quantidade, em mol, do padrão isotópico utilizado para quantificação é conhecida.

Uma vantagem na aplicação dessa abordagem matemática para análises por IDA é a possibilidade de correção de erros sistemáticos como a discriminação de massas e interferências espectrais. Essa possibilidade ocorre quando o sistema de equações possui um número maior de isótopos medidos em relação ao número de variáveis independentes.

Fatores a se considerar no desenvolvimento de metodologias destinadas à análise por IDA em suas diferentes abordagens

A determinação exata e precisa da razão isotópica é um pré-requisito fundamental para a execução de análises por diluição isotópica, e, dessa forma, esforços para encontrar os menores erros referentes a esse parâmetro são necessários. De forma geral, durante o processo de aquisição do sinal analítico pelo ICP-MS, alguns efeitos precisam ser considerados e corrigidos, dentre eles, pode-se citar a discriminação de massas, as interferências espectrais e o tempo morto do detector.

A discriminação de massas pode ser definida como a diferença na eficiência de transmissão entre dois íons, um íon mais leve sofrendo desvio em sua trajetória no feixe iônico pela ação de um íon de maior massa. Esse fenômeno pode estar relacionado com a expansão supersônica na interface e com o efeito espaço-carga. Alguns trabalhos na literatura (HEUMANN et al., 1998; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005), reportam que a discriminação de massa pode ser corrigida pela utilização de diferentes modelos matemáticos, dentre eles o modelo exponencial, como apresentado na equação 19:

$$R_{corr} = \frac{R_{exp}}{e^{k \cdot \Delta M}} \quad \text{Eq. 19}$$

Onde, R_{corr} = Razão corrigida, R_{exp} = Razão experimental, k = Fator de discriminação de massas, ΔM = Diferença de massa entre isótopos.

O tempo morto por sua vez, é uma característica do sistema de detecção e representa o tempo requerido pelo detector para processar o sinal de um íon incidente, de tal forma que, imediatamente após a incidência de um íon, o detector não é capaz de processar o sinal de outro íon incidente. A correção matemática da medida da razão isotópica pelo tempo morto pode ser realizada aplicando a equação 20.

$$R_{corr} = \frac{R_0}{(1-R_0\tau)} \quad \text{Eq. 20}$$

A estimativa do tempo morto pode ser obtida como descrito por Rodríguez-González e colaboradores (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005). Nessa abordagem, soluções com diferentes concentrações do analito de interesse são analisadas e após a realização do experimento, é construído um gráfico da razão das intensidades obtidas para dois isótopos em função do tempo morto, sendo o tempo morto a ser empregado na determinação da razão isotópica encontrado na intersecção entre as curvas obtidas para as diferentes concentrações (ver Figura hipotética 4).

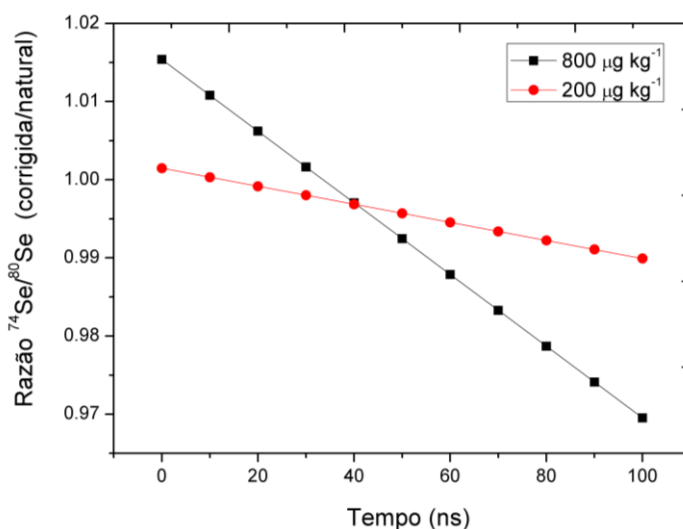


Figura 4: Estimativa do tempo morto do detector (hipotético)

Outro aspecto a ser considerado no desenvolvimento de métodos destinados à análise por diluição isotópica é a incidência de interferências espectrais sobre o elemento de interesse. Essas interferências podem ser corrigidas empregando a célula de reação dinâmica, como mencionado anteriormente, ou, quando aplicável, pelo emprego de equações de correção.

Para contornar esse problema, a célula de reação dinâmica ou colisão pode ser utilizada empregando diferentes gases de reação e/ou colisão, contudo outras interferências podem estar presentes e necessitam ser corrigidas para obtenção de resultados exatos e precisos.

Na célula de reação dinâmica pode ocorrer a formação de espécies $^{76}\text{Se}^1\text{H}$ e $^{77}\text{Se}^1\text{H}$, que são interferentes espectrais sobre os isótopos ^{77}Se e ^{78}Se , respectivamente. Entretanto, a correção dessas espécies interferentes normalmente pode ser realizada mediante aplicação de equações matemáticas, devido à sua baixa magnitude.

Em casos específicos a célula de reação dinâmica não elimina completamente as interferências espectrais, a exemplo o dímero de argônio ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ sobre $^{80}\text{Se}^+$), o que pode resultar em um pequeno erro sistemático na determinação das relações isotópicas que devem ser consideradas para não comprometer a qualidade da análise por IDA. Uma alternativa interessante para realizar a medição das relações isotópicas e que possui o potencial para correção das possíveis interferências espectrais remanescentes da célula de reação dinâmica, é o emprego da regressão linear por mínimos quadrados, considerando as intensidades obtidas para a solução do padrão enriquecido isotopicamente como variável preditora (eixo x) e a intensidade obtida para amostra como variável dependente (eixo y). O coeficiente angular obtido dessa maneira é a relação isotópica e a incerteza dessa relação é dada pelo erro do coeficiente angular.

Outro parâmetro importante no desenvolvimento de métodos destinados à aplicação da diluição isotópica como técnica de quantificação é o planejamento da quantidade de padrão isotópico a ser adicionado à amostra que resulte na menor incerteza da medição da razão isotópica na mistura. Considerando que outras fontes de erro são negligenciáveis, o erro relativo da concentração da amostra (Eq.7) pode ser obtido pela equação 21.

$$f_m = \left[\frac{R_m \times (1 - R_{sp} \times R_s)}{(R_m - R_{sp}) \times (1 - R_m \times R_s)} \right] \quad \text{Eq. 21}$$

A equação 21, conhecida como fator de magnificação de erro (f_m), relaciona a incerteza da concentração da amostra com a incerteza de medição da razão isotópica na mistura. Esse fator de magnificação de erro depende basicamente de R_m , R_s e R_{sp} . Como as razões isotópicas R_s e R_{sp} são fixas o único parâmetro que é passível de otimização buscando uma menor incerteza de C_s é a razão isotópica da mistura, R_m . Para tanto, é necessário um conhecimento prévio do elemento de

interesse na amostra para planejar a quantidade, em mol, de padrão isotópico a ser adicionado à amostra (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005). A Figura 5 apresenta o fator de propagação de erro em função razão isotópica na mistura.

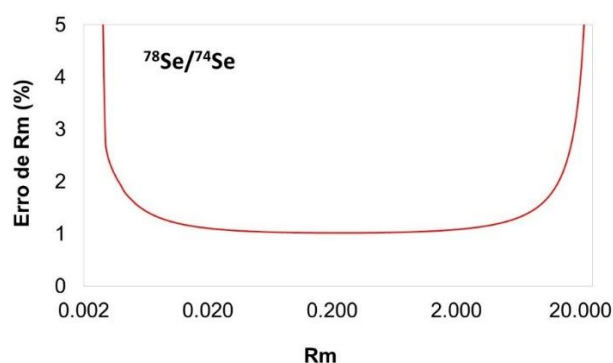


Figura 5: Curva de propagação de erro para otimização/planejamento da diluição isotópica

A aplicação da equação de propagação de erros permite determinar a faixa de valores de razões isotópicas onde o erro é mínimo, sendo essa zona de baixa incerteza compreendida entre aproximadamente $0,02 < R < 2$ para a utilização de um padrão isotópico enriquecido em ^{74}Se frente ao isótopo ^{78}Se de um padrão de selênio de abundância natural. O valor de R_m onde o fator de propagação de erro encontra seu valor mínimo pode ser obtido mediante a equação 22 (ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013).

$$R_m = \sqrt{\frac{R_{sp}}{R_s}} \quad \text{Eq. 22}$$

1.7. Cromatografia líquida de alta eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”) é uma poderosa técnica de separação que comumente é empregada em estudos de especiação mediante o acoplamento desta técnica com ICP-MS.

Um sistema cromatográfico (Figura 6) é composto basicamente por reservatório de fase móvel, bombas cromatográficas, válvula de injeção, coluna e detector.

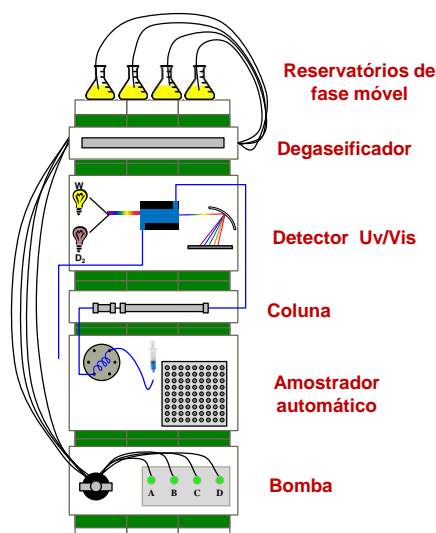


Figura 6: Esquema gráfico de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

Neste sistema a bomba cromatográfica possui a função de garantir uma vazão constante da fase móvel até o detector passando pela coluna analítica. Na coluna cromatográfica ocorrem mecanismos dinâmicos de interação entre as moléculas presentes na amostra e as fases estacionária e móvel.

A coluna cromatográfica é o principal componente do sistema cromatográfico pelo fato de ser o responsável pela separação das espécies de interesse. A coluna cromatográfica pode ser classificada de acordo com a composição da fase estacionária que a compõe tais como coluna de fase reversa, coluna de troca aniônica, coluna por exclusão de tamanho, etc.

Na cromatografia de fase reversa a fase estacionária da coluna possui caráter apolar com a presença de grupos C_4 , C_8 , C_{18} (mais amplamente utilizados) e uma fase móvel polar. Nesta modalidade cromatográfica a separação das espécies é promovida mediante a interação dos analitos de interesse com as fases estacionária e móvel de tal maneira que a ordem de eluição das moléculas de interesse será função direta da afinidade (governada pela polaridade) destas com a fase móvel.

Para a realização de uma separação cromatográfica eficiente algumas modificações no método analítico pode ser utilizada como o emprego de reagentes de par iônico que possui a finalidade de aumentar a interação das moléculas com a fase estacionária, o emprego de gradientes de fase móvel que possui por objetivo alterar de maneira planejada a composição da fase móvel (força de eluição) durante a separação cromatográfica, aumentando por exemplo de maneira gradual a polaridade da fase móvel durante a corrida cromatográfica.

Na cromatografia de troca aniônica a fase estacionária é composta por um polímero modificado com grupos funcionais que são os principais responsáveis pelo mecanismo de separação como por exemplo o tri-metil-amônio. Esses grupos funcionais estão envolvidos no equilíbrio químico entre o contra íon e o analito de interesse, sendo a separação das espécies promovida por esses equilíbrios termodinâmicos. A otimização da separação das moléculas de interesse nesta modalidade cromatográfica pode ser realizada pela escolha da composição da fase móvel, pela otimização do modelo de eluição (isocrático ou gradiente) ou alterando o pH da fase móvel bem como sua força iônica.

A cromatografia de exclusão por tamanhos (SEC do inglês *size exclusion cromathography*) por sua vez, possui um mecanismo de separação baseado na diferença de tamanho das moléculas de interesse, dessa forma, essa modalidade de separação cromatográfica é aplicada para macromoléculas como por exemplo proteínas.

Após a separação das espécies de interesse na coluna cromatográfica, os analitos são direcionados ao detector onde posteriormente um software converte a resposta instrumental obtida para cada molécula detectada em um sinal analítico.

1.8. Especiação de selênio

Outrora, a determinação da concentração total de um dado elemento em uma amostra parecia ser suficiente para as considerações de ordem clínica ou ambiental. Embora essa informação ainda seja de extrema relevância, tal conhecimento não traz consigo informações sobre o impacto ambiental, biodisponibilidade, metabolismo, toxicidade, persistência, entre outras, uma vez que os efeitos desses elementos, tóxicos ou essenciais, no meio ambiente e nos organismos vivos dependem, não somente de sua concentração, mas também das formas químicas em que o elemento está presente. Surgiu então a necessidade de estudos de especiação, isto é, o estudo das diferentes espécies químicas individuais em uma amostra.

A compreensão do termo especiação começa pelo entendimento cuidadoso do significado da palavra “espécie” em seu contexto químico. Assim, de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)(TEMPLETON et al., 2000) os compostos químicos que diferem em sua composição isotópica, conformação, estados de oxidação ou eletrônico, ou na natureza de seus

complexos ou substituintes unidos covalentemente podem ser considerados como espécies químicas distintas. Estas distinções resultam nas seguintes definições: Análise de especiação: Atividade analítica de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas individuais de um elemento em uma amostra; Especiação de um elemento: Distribuição de um elemento entre suas diferentes espécies químicas em uma amostra.

A especiação elementar geralmente requer o acoplamento de duas técnicas analíticas: uma técnica com grande poder de separação das diferentes formas químicas dos elementos de interesse e uma técnica de detecção do elemento, sensível e seletiva. Dessa forma, o acoplamento entre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE) ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem sido usado com excelente desempenho analítico para especiação de selênio.

Além das técnicas de especiação, outras técnicas analíticas também têm sido empregadas com sucesso para análise de selênio. Entre elas a espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS)(DÍAZ HUERTA et al., 2003a; MCSHEEHY et al., 2001), a espectrometria de massas com analisador de tempo de voo (TOF-MS) e ionização/dessorção a laser assistida pela matriz (MALDI TOF-MS)(REYES et al., 2006a; ROMAN et al., 2011), e mais recentemente a Mobilidade Iônica Acoplada à Espectrometria de Massa (TWIMS-MS)(SOUZA PESSÔA et al., 2011). A espectrometria de absorção atômica com chama usando célula de quartzo (QC-FAAS) (LAFUENTE et al., 1998), a espectrometria de absorção molecular (UV-Vis)(MÉNDEZ; GONZÁLEZ; SANZ-MEDEL, 2000), as técnicas eletroquímicas(DENG et al., 2009; YILMAZ; SOMER, 2009) e absorção de raios-X de estrutura fina (XAFS)(LUO et al., 2011) também foram usadas na determinação de selênio.

1.8.1.

Métodos de preparo e preservação das amostras contendo selênio

O processo de preparo das amostras para determinação de selênio está associado ao risco de contaminação ou perda do analito por volatilização, além da possível ineficiência no processo de extração. Dessa forma, o preparo das amostras representa um grande desafio e é uma etapa crucial no desenvolvimento de metodologias que visam à determinação total ou das diferentes espécies químicas presente em uma amostra(MESKO et al., 2011).

Os procedimentos de preparo de amostras para a determinação total de selênio, que empregam HNO_3 e H_2O_2 como mistura oxidante para a decomposição da amostra, têm apresentado bom desempenho analítico (CUBADDA et al., 2010; DERNOVICS; FAR; LOBINSKI, 2009; DIAZ HUERTA; FERNANDEZ SANCHEZ; SANZ-MEDEL, 2006; HART et al., 2011), uma vez que são simples e aparentemente não apresentam problemas relacionados à perda de espécies voláteis de selênio. Em contrapartida, diferentes métodos de extração têm sido empregados, entre eles a extração enzimática (BIERLA et al., 2008; SILVA et al., 2013; VACCHINA et al., 2010), a extração alcalina (KITAGUCHI et al., 2008; WRÓBEL et al., 2004) e ácida (WROBEL; KANNAMKUMARATH; CARUSO, 2003), a extração com água (FANG et al., 2010; FAR; PREUD'HOMME; LOBINSKI, 2010; MCSHEEHY et al., 2001) e com soluções tampão (MONTES-BAYON et al., 2006; ROMAN et al., 2011). O ácido metanossulfônico, também foi empregado por alguns laboratórios participantes de duas intercomparações, uma delas promovida pelo *Comité Consultatif pour la Quantité Matière – CCQM* (GOENAGA-INFANTE et al., 2008) e a outra pelo instituto de metrologia do Canadá, *National Research Council of Canada – NRCC* (MESTER et al., 2006).

Os procedimentos de preparo e armazenagem das amostras devem preservar as espécies originais no momento da armazenagem (proteção contra a luz, controle de temperatura, etc) e no momento da extração. De fato, a oxidação da selenometionina a óxido de selenometionina (LARSEN et al., 2003).

Procedimentos como moagem, trituração, liofilização, peneiramento podem ser aplicados previamente à extração de amostras sólidas e técnicas de extração sólido-líquido, líquido-líquido, extração assistida por microondas e metodologias enzimáticas podem ser usadas de acordo com o tipo de matriz e espécie de selênio presente na amostra.

Extração ácida sequencial foi empregada por Chassaing e colaboradores, para separar as frações solúveis e insolúveis de selênio em amostra de levedura enriquecida com selênio (CHASSAING et al., 2002). Procedimentos de extração utilizando HCl (DÍAZ HUERTA; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ; SANZ-MEDEL, 2004; YANG et al., 2004), hidróxido de tetrametilamônio (YANG et al., 2004), dodecil sulfato de sódio-SDS (DÍAZ HUERTA; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ; SANZ-MEDEL, 2004), água quente (70°C) (CASIOT et al., 1999; MANUEL MARCHANTE-GAYÓN et al., 2000) e ácido metanosulfônico (WROBEL; KANNAMKUMARATH; CARUSO, 2003; YANG et al., 2004) têm sido empregados em análises de especiação de selênio.

Wrobel e colaboradores, (WROBEL; KANNAMKUMARATH; CARUSO, 2003) e mais tarde Yang e colaboradores (YANG et al., 2004) usaram ácido metanossulfônico 4 mol L⁻¹ em refluxo com altas eficiências de extração de selenoaminoácidos em amostras de levedura e castanha do Pará, sendo que 65 e 75 % do selênio encontrado estavam na forma de selenometioninas, nas amostras de leveduras e castanha do Pará respectivamente.

A hidrólise enzimática aparece na literatura para a análise de especiação de selênio, com condições controladas de temperatura e pH. Tratamentos múltiplos ou combinados são frequentemente utilizados para aumentar a eficiência de extração. Tratamentos combinados unidos às técnicas tradicionais incluindo a digestão enzimática com banho ultrassônico ou sonda ultrassônica também têm sido usados (BERMEJO et al., 2004; CAPELO et al., 2004; LAFUENTE et al., 1999; REYES et al., 2004).

Mesko e colaboradores (MESKO et al., 2011) descreveram em um trabalho de revisão procedimentos de preparo de amostras para análises bioinorgânicas em matrizes de tecidos animais e de plantas, fluidos biológicos e amostras afins objetivando análise de compostos contendo metais usando ICP-MS. Procedimentos de extração, solubilização, derivatização, pré-concentração, *cleanup* bem como procedimentos de digestão de amostras para determinação total de metais foram discutidos.

1.8.2. Técnicas analíticas empregadas na análise de especiação de selênio

Além das limitações instrumentais relacionadas à detecção de espécies presentes em baixas concentrações na amostra, é importante garantir que os procedimentos de preparo não alterem as características das espécies químicas. Dessa forma, procedimentos de extração e separação compõem o principal desafio em análise de especiação. Concomitantemente, a metodologia analítica empregada deve possibilitar a separação adequada das espécies presentes, em uma matriz, geralmente complexa, bem como possuir sensibilidade suficiente para a quantificação, haja vista que a concentração das espécies individuais será sempre menor que a concentração total do elemento de interesse. Assim, parece claro que os requisitos analíticos básicos em qualquer análise de especiação (seletividade e sensibilidade) podem ser alcançados mediante o emprego das técnicas hifenadas, isto é, técnicas baseadas no acoplamento de uma poderosa

técnica de separação (HPLC, GC, CE) com um detector específico para metal/metaloide (técnicas espectrométricas: chamas, plasmas e fornos).

O sucesso da hifenação reside na interface entre as duas técnicas, que deve atender algumas características tais como: preservar a integridade das espécies, transportar o analito da técnica de separação para a técnica de detecção com o máximo de eficiência possível, evitar grandes volumes mortos entre outros.

As principais técnicas de separação empregadas em estudos de especiação de selênio são a HPLC, GC e CE. A escolha da técnica de separação para análises de especiação é determinada pelas propriedades físico-químicas do analito (volatilidade, carga, polaridade, etc.), enquanto que a técnica de detecção é selecionada principalmente pelos níveis de concentração do analito na amostra. A cromatografia gasosa deve ser o método escolhido para a análise de espécies voláteis ou facilmente convertidas a espécies voláteis por métodos de derivatização. As espécies não voláteis ou não derivatizáveis a espécies voláteis devem ser separadas por cromatografia líquida de fase reversa, de troca-iônica, exclusão por tamanho, etc.

Em termos de detectores, as técnicas espectrométricas baseadas em plasma têm preferência sobre a espectrometria de absorção atômica, porque são muito mais sensíveis. Os plasmas mais energéticos como o plasma indutivamente acoplado (ICP) com espectrometria de massas é preferentemente utilizado quando a técnica de separação utilizada é HPLC.

Técnicas de separação

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido uma técnica de separação amplamente utilizada para estudos de especiação de selênio. A separação de metabólitos de selênio em microalgas (*Chlorella sorokiniana*) e em meio de cultura (enriquecido com Na_2SeO_4) foi realizada mediante HPLC-ICP-MS usando colunas C18 e colunas quirais (GÓMEZ-JACINTO et al., 2012).

Devido ao grande número de compostos não voláteis de selênio, a HPLC é uma técnica largamente utilizada devido a suas vantagens incluindo análise sem necessidade de derivatização do analito e não apresentar riscos de decomposição térmica, os quais podem ocorrer com GC. O acoplamento HPLC-ICP-MS é bastante simples e tem apresentado bons limites de detecção para selênio (B'HYMER; CARUSO, 2000).

Os modos de separação mais empregados em análise de selênio utilizando HPLC incluem a troca iônica (IE), fase reversa (RP), par iônico (IP), exclusão por tamanho (SEC), e outras.

Na cromatografia em fase reversa a fase estacionária é apolar e é obtida pela funcionalização dos grupos silanois com hidrocarbonetos hidrofóbicos de 2,4,8 ou 18 átomos de carbono (CARUSO; MONTES-BAYON, 2003). Para separações de compostos de selênio mediante HPLC em fase reversa comumente se adiciona na fase móvel acetonitrila ou metanol, um agente quelante (cisteína ou mercaptoetanol) ou um reagente capaz de formar par iônico (alquil-sulfonatos, sais de tetra-alkil-amônio, ácidos carboxílicos perfluorinados) e, em alguns casos, uma solução tampão (B'HYMER; CARUSO, 2006). Os parâmetros instrumentais que afetam a separação dos compostos mediante HPLC são: a natureza, a concentração e o pH da fase móvel bem como o tipo e a quantidade de modificador orgânico da fase móvel.

Para análise dos selenoaminoácidos, fases estacionárias de cadeia longa são preferencialmente usadas em relação às fases estacionárias de cadeias curtas, mais adequadas para separação de selenoproteínas. O ácido trifluoracético em baixas concentrações (~0,1%) tem demonstrado melhora na resolução dos picos cromatográficos (B'HYMER; CARUSO, 2000; BIRD et al., 1997) e o ácido heptafluorbutanóico (HFBA) foi usado para separação, com boa resolução, de 20 compostos orgânicos de selênio empregando HPLC em fase reversa (KOTREBAI et al., 2000).

A cromatografia de troca iônica (IE, do inglês *ionic exchange*) também tem sido utilizada para separação de espécies de selênio com bom desempenho analítico. O mecanismo primário de retenção é a atração eletrostática dos íons em solução aos íons de carga oposta da fase estacionária.

Na coluna cromatográfica de troca aniônica os analitos de interesse se distribuem entre a fase móvel e a fase estacionária sendo essa distribuição governada pela constante de equilíbrio termodinâmico. A IE pode ser de troca catiônica ou aniônica e ambas têm sido usadas para especiação de selênio, sendo as variáveis que afetam o processo de separação dos analitos, o pH, a temperatura e a força iônica da fase móvel, etc.

A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) também pode ser empregada no acoplamento com ICP-MS (ROMAN et al., 2011). O princípio de separação de exclusão por tamanho baseia-se em um processo puramente mecânico, a fase estacionária possui composição inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes. Ao contrário de outras formas de HPLC, na SEC

as moléculas da amostra são separadas por tamanho, as menores são capazes de penetrar facilmente nos poros da fase estacionária, equilibrando-se com a fase móvel intrasticial e intersticial enquanto as maiores são excluídas dos poros, passando entre os grânulos e acompanhando a fase móvel intersticial. As moléculas com tamanho efetivo intermediário migram com velocidades variáveis entre esses dois extremos (SUTTON; SUTTON; CARUSO, 1997). Essa técnica cromatográfica engloba a cromatografia por permeação em gel que usa fase móvel orgânica e a cromatografia de filtração em gel que emprega fase móvel aquosa. A SEC geralmente não possui capacidade de resolução para a separação das várias espécies de selênio em matrizes complexas uma vez que permite somente a separação das espécies em diferentes “grupos” de massas moleculares e não especificamente de uma determinada espécie. Essa técnica tem sido empregada com sucesso como uma metodologia de cromatografia preparativa para o uso com outras formas de HPLC (DÍAZ HUERTA et al., 2003a; MCSHEEHY et al., 2001).

Apesar dos excelentes resultados analíticos obtidos com acoplamentos com técnicas espectrométricas, estes detectores destroem qualquer informação molecular sobre a natureza das espécies separadas. Dessa forma, para identificar essas espécies “desconhecidas” faz-se necessário o emprego de técnicas moleculares complementares não destrutivas (MALDI-TOF, ESI-MS, ESI-Q-TOF ou RMN) capazes de fornecer informações acerca de suas composições químicas e estrutura molecular (SANZ-MEDEL, 2005).

A espectrometria de massas é talvez a técnica de maior aplicabilidade no sentido de fornecer informações sobre a composição elementar das amostras, estruturas de moléculas orgânicas e biológicas, composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, razões isotópicas nas amostras, entre outras.

Em uma das modalidades dessa técnica (destinada à análise de compostos moleculares), a molécula é convertida em íons na fase gasosa mediante a ação, por exemplo, de um bombardeamento com um feixe de elétrons (HOFFMANN; CHARETTE; STROOBANT, 1996). O relaxamento dos íons moleculares excitados formados no processo de ionização ocorre mediante a fragmentação desse íon molecular em íons de massas menores. Os íons positivos gerados são direcionados para o separador de massas orgânicas onde são separados em função de suas razões massa-carga (MCLAFFERTY; TURECEK, 1993).

Entre as diferentes fontes de ionização em espectrometria de massas molecular a ESI (do inglês *Electrospray Ionization*) é uma das mais utilizadas para análises de biomoléculas. Um *electrospray* é produzido aplicando um forte campo

elétrico, a pressão atmosférica, sobre a amostra que flui pelo capilar da fonte ESI numa vazão de aproximadamente $1 - 10 \mu\text{L min}^{-1}$). O campo elétrico é obtido pela aplicação de uma diferença de potencial (3-6 kV) entre o capilar e um eletrodo. Esse campo induz um acúmulo de carga na superfície líquida localizada na extremidade do capilar no qual irá produzir gotículas altamente carregadas (HOFFMANN; CHARETTE; STROOBANT, 1996).

Os processos subsequentes à formação dessas gotículas altamente carregadas envolvem principalmente a evaporação do solvente até o ponto em que a repulsão das forças coulombicas se aproximam da energia de coesão causando assim a explosão das gotículas formadas na fonte ESI. A partir desse fenômeno físico, ocorre uma cascata de rupturas resultando em gotículas cada vez menores até que o campo elétrico na superfície atinja um valor suficiente para promover a liberação dos íons (HOFFMANN; CHARETTE; STROOBANT, 1996).

Técnicas de detecção

As técnicas espectrométricas de modo geral, podem ser empregadas como detectores específicos hifenados a técnicas cromatográficas para especiação de selênio. Dentre essas técnicas, a espectrometria de absorção atômica (AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) têm sido usadas.

Gonzalez e colaboradores (LAFUENTE et al., 1998) e Fangshi Li e colaboradores (LI; GOESSLER; IRGOLIC, 1999), empregaram a AAS no modo chama como detector hifenado ao HPLC para separação de distintas espécies de selênio, porém a AAS no modo chama apresentou baixa sensibilidade para esses compostos, comprometendo os resultados obtidos. Gettar e colaboradores testaram sete combinações de interfaces, utilizando três nebulizadores e três câmaras de nebulização, para o acoplamento entre HPLC e ICP OES. Os nebulizadores concêntricos associados à câmara ciclônica obtiveram melhor sensibilidade e maior relação sinal/ruído (GETTAR et al., 2005).

A análise de especiação de selênio pode ser realizada empregando o ICP-MS como detector específico para o selênio mediante o monitoramento dos diferentes isótopos [^{74}Se (0,89%), ^{76}Se (9,37%), ^{77}Se (7,63%), ^{78}Se (23,77%), ^{80}Se (49,61%) e o ^{82}Se (8,73%)].

Grande parte das interferências presentes no ICP-MS quando acoplado ao HPLC são oriundas das fases móveis utilizadas (FERRARELLO et al., 2002). Para

contornar os problemas relacionados a essas interferências, as células colisão e de reação dinâmica têm sido largamente empregadas por vários pesquisadores em diversas matrizes, desde matrizes simples como água (TSOI; LEUNG, 2011) até mais complexas, como cogumelos(DÍAZ HUERTA; FERNANDEZ SANCHEZ; SANZ-MEDEL, 2006; HUERTA; SÁNCHEZ; SANZ-MEDEL, 2005), plantas(MONTES-BAYON et al., 2006), alfafa(GERGELY et al., 2006), farinha de trigo, levedura e suplemento alimentar (DÍAZ HUERTA et al., 2003b; REYES et al., 2004, 2006b), músculo de bacalhau (DÍAZ HUERTA; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ; SANZ-MEDEL, 2004), soro sanguíneo(HINOJOSA REYES et al., 2003), urina (DÍAZ HUERTA et al., 2003a) entre outras.

Algumas estratégias têm sido usadas para contornar os problemas de interferências isobáricas quando os ICP-Q-MS são usados para a determinação de selênio. Ferrarello e colaboradores (FERRARELLO et al., 2002) determinaram selênio em metalotioneínas escolhendo o isótopo ^{82}Se ; Díaz Huerta e colaboradores(DÍAZ HUERTA et al., 2003a) e Rodriguez-Cea e colaboradores(RODRIGUEZ-CEA et al., 2006), utilizaram equipamentos de ICP-MS tipo quadrupolo convencional com bom desempenho analítico para análise de especiação de selênio em mexilhões, urina, peixe respectivamente.

Cabe ressaltar que, quando o ICP-MS é utilizado como detector para HPLC, a vazão do eluente da coluna cromatográfica é compatível com as vazões geralmente utilizadas em ICP-MS, o que representa uma grande vantagem. Porém, quando fases móveis com altas concentrações de solvente orgânico são usadas, pode ocorrer formação de depósitos de carbono nos cones devido à pirólise incompleta da matéria orgânica oriunda da fase móvel, comprometendo a transferência dos analitos para o analisador de massas ou até mesmo a obstrução total dos cones, inviabilizando a hifenação entre as técnicas.

A adição de oxigênio ao gás nebulizador é uma forma eficiente de minimizar esse problema, pois promove sua reação com o solvente orgânico, produzindo CO_2 (CARUSO; MONTES-BAYON, 2003). Normalmente, os nebulizadores utilizados em ICP-MS requerem o emprego de câmaras de nebulização para seleção da névoa com gotículas e que possuam diâmetros médios adequados para os processos subsequentes no plasma. Quando se trabalha com solventes orgânicos, essas câmaras de nebulização podem ser refrigeradas com o intuito de minimizar o aporte de solvente ao plasma. Quando empregada em conjunto com a adição de oxigênio, os problemas relacionados à formação de depósitos de carbono nas partes físicas do equipamento são amenizados ou até mesmo

eliminados, além de aumentar a estabilidade do plasma(CARUSO; MONTES-BAYON, 2003).

1.8.3.

Qualidade dos resultados em análises de especiação

A qualidade dos resultados em análise de especiação química é de grande relevância, visto que as técnicas híbridas e as metodologias empregadas ainda estão na fronteira da ciência analítica. Os procedimentos desenvolvidos para análise de especiação envolvem etapas de extração do analito da matriz, digestão da amostra, algumas vezes incluem derivatização do analito, desenvolvimento de interfaces para acoplamentos com técnicas cromatográficas, entre outros(JÓKAI; FODOR, 2009). Tais procedimentos devem permitir a detecção do analito de interesse sem alteração de sua estrutura química e sem perda da resolução cromatográfica. Dessa forma, o conhecimento do processo de medição como um todo, incluindo suas fontes de incertezas propicia maior controle sobre as principais fontes de erro analítico garantindo assim a confiabilidade metrológica dos resultados obtidos.

Ellison e Hardcastle investigaram as principais fontes de erro em química analítica, resultados provenientes de nove ensaios de proficiência em amostras predominantemente de alimentos e ambientais. Dentre os principais erros relatados pelos 111 participantes encontram-se o preparo de amostra, principalmente devido à extração, erros humanos e calibração, entre outros. A maioria dos erros provenientes da calibração foi devido a erros em cálculos e erros de diluição e não pela falta de materiais de qualidade ou materiais de calibração. relatórios finais dos participantes indicaram que 44% das causas de erro poderiam ser atribuídas ao operador(ELLISON; HARDCASTLE, 2012).

Ainda referente ao controle de qualidade em laboratórios, Olivares e colaboradores(OLIVARES; LOPES, 2012) identificaram em recente trabalho, as maiores dificuldades encontradas pelos laboratórios para a implantação da norma ISO IEC 17025 “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração”, entre elas a incerteza de medição.

A incerteza de medição, segundo a ISO IEC 17025 (ISO, 2005), é um parâmetro associado ao resultado de medição e caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando (item 5.4.6 ISO IEC 17025). Esse parâmetro é importante para garantia da confiabilidade dos resultados analíticos e permite avaliar as variáveis de maior influência sobre o

resultado e consequentemente possibilita maior controle sobre o procedimento analítico.

O Guia de Expressão para Incerteza de Medição (ISO-GUM)(ISO:GUM, 2008), seu Suplemento 1(JCGM, 2008) que descreve o Método Monte Carlo, e o Eurachem (EURACHEM, 2000) são os principais documentos orientativos que podem ser usados para determinar os valores de incerteza.

O ISO-GUM fornece orientações gerais para avaliar e expressar a incerteza de medição em vez de instruções detalhadas para uma determinada área. O procedimento geral usado na combinação de incertezas individuais baseia-se no modelo quantitativo do procedimento experimental que define o mensurando, avalia as incertezas padrão associadas aos parâmetros individuais de entrada e as combina através da lei de propagação de incertezas.

Por outro lado, o Eurachem fornece uma orientação detalhada para a avaliação e expressão da incerteza em análises químicas quantitativas, baseado na abordagem obtida pelo ISO-GUM.

Existe ainda outra abordagem para o cálculo da incerteza de medição que foi proposta por Kragten(KRAGTEN, 1994). Essa abordagem simplifica a aplicação das derivadas parciais aplicando um método numérico que faz uso de planilha eletrônica para fornecer a incerteza padrão combinada a partir das incertezas padrão de entrada e de um modelo conhecido de medição.

As abordagens propostas pelos documentos orientativos ISO-GUM e Eurachem para o cálculo de incerteza, possuem certas limitações como a linearização do modelo, suposição da normalidade do mensurando e cálculo do grau de liberdade efetivo. Dessa forma, o Suplemento 1 do ISO-GUM (Simulação de Monte Carlo) propõe uma alternativa para o cálculo da incerteza de medição que minimiza estas limitações. Esta simulação envolve amostragem aleatória de uma distribuição probabilística sendo a incerteza de medição realizada em duas etapas: a primeira delas é o estabelecimento do modelo de medição e a segunda consiste na avaliação do modelo. As principais diferenças entre o método clássico (ISO-GUM) e a Simulação de Monte Carlo estão no tipo de informação das grandezas de entrada e na forma em que essa informação é processada para se obter a incerteza de medição.

No intuito de organizar e criar uma sistemática para a estimativa da incerteza de medição pode-se dividir o processo em etapas que consistem em: 1) especificar o mensurando; 2) identificar as fontes de incerteza; 3) quantificar os componentes de incerteza; 4) calcular a incerteza combinada; 5) determinar os

graus de liberdade efetivos e, finalmente, a 6) obter da incerteza expandida considerando o nível de confiança desejado.

1.9.

Preparo de amostra de levedura enriquecida isotopicamente

O processo de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser utilizado para a realização da biossíntese de compostos orgânicos, adicionando ao meio de cultura o elemento de interesse, por exemplo, selênio em sua forma inorgânica. A levedura enriquecida em selênio orgânico é comumente empregada na formulação de diferentes suplementos, sendo uma das principais fontes de selênio para fins de suplementação alimentar.

O meio de cultura empregado para o processo de biossíntese de selênio empregando *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente é constituído por uma fonte de carbono, aminoácidos e outros nutrientes necessários ao metabolismo da levedura.

O processo de crescimento de leveduras apresenta 3 etapas distintas, a saber: fase de latência ou fase *lag*, fase de crescimento exponencial ou fase *log*, fase estacionária e fase de decaimento ou morte.

A **fase de latência ou fase *lag*** representa a etapa de adaptação das células de levedura ao meio de cultivo sendo essa etapa, influenciada por diversos fatores como o tipo de microorganismo, características do meio de cultivo, pH, presença de substâncias inibidoras, etc. A **fase de crescimento exponencial ou fase *log*** por sua vez, é caracterizada pelo pronunciado crescimento das células de levedura. Nessa etapa ocorre um alto consumo por parte das células de levedura, dos nutrientes do meio cultivo principalmente pela alta atividade metabólica das células nessa etapa. Após a etapa de crescimento exponencial inicia-se a **fase estacionária** onde a relação entre células vivas e mortas se mantém constante seguindo-se a **fase de decaimento ou morte** onde como o próprio nome diz, é uma etapa onde a morte das células se torna predominante.

A composição do meio de cultura é uma das principais variáveis que influenciam o processo de produção de biomassa de levedura. Hijinosa e colaboradores (HINOJOSA REYES et al., 2004) realizaram a biossíntese de selênio orgânico para a produção de uma levedura enriquecida isotopicamente em selênio, utilizando um meio de cultura sintético comercialmente disponível (SCD) com 4% de glucose como fonte de carbono e selenito de sódio enriquecido em ^{77}Se . As condições experimentais para tal procedimento foram otimizadas,

sendo a temperatura empregada 28 °C, a agitação de 230 rpm e o pH de 5,8 durante 36 h.

Em outro trabalho destinado à especiação de selênio em levedura, Larsen e colaboradores (LARSEN et al., 2003) realizaram a biossíntese de espécies de selênio utilizando um padrão isotópico de selênio (^{77}Se). Para tanto, os autores trataram 580 mg do padrão isotópico com ácido nítrico, para a formação do dióxido de selênio, com posterior solubilização em hidróxido de sódio para enfim obter 1270 mg de selenito de sódio. O meio de cultura foi produzido com quantidades definidas de carbono e de nitrogênio, bem como os micronutrientes necessários para o processo de cultivo, de acordo com a Farmacopéia.

2 Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver métodos para determinação de selênio e de suas espécies em amostras de suplemento alimentar e em amostras de levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida isotopicamente em ^{78}Se .

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1 Determinar o selênio total por calibração externa em amostras de suplemento alimentar.
- 2.2.2 Determinar o selênio total e suas espécies em amostras de suplemento alimentar por diluição isotópica.
- 2.2.3 Produzir e caracterização de levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida isotopicamente em ^{78}Se .
- 2.2.4 Identificar de proteínas em *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida isotopicamente em ^{78}Se por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

3

3.1. Materiais, equipamentos e métodos

3.1. Reagentes e Soluções

Para decomposição das amostras, peróxido de hidrogênio foi usado em conjunto com HNO_3 (ambos da Merck, Darmstadt, Alemanha) purificado por um sistema de destilação *sub-boiling* usando recipiente de quartzo (Duo-PUR, Milestone, USA). Água deionizada (tipo I) com resistividade de 18 M Ω cm foi obtido de um Sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Argônio (99,9996%) foi usado como gás de plasma, metano (99,995%), amônia (99,999%), oxigênio (99,995%), hidrogênio (> 99,99%) foram empregados como gases de reação e hélio (99,9995%) como gás de colisão. Todos os gases foram fornecidos pela White Martins Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

O material de referência certificado de solução padrão de selênio (SRM NIST 3149 – *National Institute of Standards and Technology, USA*) foi usado para construção da curva analítica e o material de referência certificado CRM Selm-1 (*Selenium Enriched Yeast, National Research Council Canada, Canadá*) foi utilizado para fins de validação de metodologia.

Solução padrão de selênio enriquecido isotopicamente (^{74}Se) (*Cambridge isotope laboratories*) foi utilizado para fins de quantificação. A fração mássica de selênio nessa solução padrão foi determinada por diluição isotópica reversa utilizando um padrão de Se de abundância natural ($\sim 1000 \text{ mg kg}^{-1}$) da Merck (*Darmstadt, Alemanha*). Para o enriquecimento isotópico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado um padrão de ^{78}Se (>99%) também da *Cambridge isotope laboratories*.

Para as separações cromatográficas foram utilizados diferentes reagentes para elaboração das fases móveis incluindo solventes orgânicos, pares iônicos e tampões como: Metanol (Merck), di-hidrogeno-fosfato de amônio (Merck), citrato de amônio (Sigma Aldrich), acetato de amônio (Merck), acetato de tetrabutil amônio - TBA (Sigma Aldrich), ácido hepta fluorbutanóico - HFBA (Sigma Aldrich).

Neste trabalho foram utilizadas amostras de suplemento alimentar adquiridas no mercado local e amostra de levedura contendo aproximadamente 2000 mg kg⁻¹ gentilmente fornecida pela empresa Biorigin, São Paulo - Brazil.

As amostras de levedura foram submetidas ao processo de extração enzimática utilizando diferentes enzimas proteolíticas como Protease XIV (Sigma Aldrich) para a determinação de selenometionina e tripsina (Sigma Aldrich) para determinação de proteínas mediante extração triptica. O procedimento de digestão enzimática empregando tripsina, requer o emprego de outros reagentes como ditioneitol – DTT (Sigma Aldrich) e ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich).

Uma solução tampão de tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris-HCl (Sigma Aldrich) foi utilizado em diferentes etapas do procedimento analítico para ajuste de pH.

Tampão salino (PBS) foi utilizado para extração de proteínas das amostras de levedura. Essa solução tampão foi composta por: KCl (0,2 g/L), NaCl (8 g/L), KH₂PO₄ (0,2 g/L), Na₂HPO₄ (1,15 g/L), pH=7,5.

Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), Di-hidrogênio fosfato de potássio (KH₂PO₄) e sulfato de magnésio hepta hidratado (MgSO₄.7H₂O), todos da Sigma Aldrich, foram utilizados para o preparo do meio de cultivo utilizado para o desenvolvimento das células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Iodeto de propídeo foi utilizado para a realização da determinação de viabilidade celular.

3.2. Equipamentos

O sistema de digestão de amostra de alta pressão - *High Pressure Asher* (HPA-S), da Anton Paar (Graz, Áustria), foi usado para decomposição das amostras e uma balança analítica com resolução de 0,01 mg (model ME 235S), da *Sartorius* (Göttingen, Alemanha), foi usada para preparo das amostras e das soluções dos padrões analíticos.

As medições de selênio total e/ou especiação foram realizadas em dois espectrômetros de massas com plasma indutivamente acoplado, dotado de célula de reação dinâmica (quadrupolo-DRC II e quadrupolo-Nexlon 300X; ambos da Perkin Elmer - Sciex, Norwalk, Estados Unidos), um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (quadrupolo-CC-7700x; Agilent), um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado simultâneo

(*Multicollector-MC*; Neptune, Thermo), e um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Ultima 2; Horiba-Jobin Yvon,).

O sistema de introdução de amostras foi composto por nebulizador concêntrico e câmaras de nebulização ciclônica (exceto para o ICP-MS agilent 7700x onde foi utilizada uma câmara ciclônica de duplo passo).

Para a identificação de proteínas foi utilizado um espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray – ESI-Q-TOF-MS (Impact II, Bruker).

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido com detecção PDA (modelo LC-10AD, Shimadzu). Colunas cromatográficas de diferentes mecanismos de separação foram utilizadas para a especiação de selênio bem como a separação de proteínas de selênio, entre elas: Fase reversa - C18 Luna; Phenomenex, 150mm x 2mm x 3µm, Troca aniônica forte - PRPX-100, Hamilton, 250 mm x 4.1 mm x 10µm e Exclusão por tamanho - Superdex 200 10/300 GL e Superdex Peptide HR 10/30.

Homogeneizador *speed mill plus* (Analytik jena) foi utilizado para extração mecânica de proteínas das amostras de levedura.

3.3. Métodos

3.3.1. Selênio total

3.3.1.1. Preparo das amostras para determinação de selênio total

Para fins de correção dos resultados analíticos, o teor de umidade das amostras, levedura e CRM Selm-1, foi determinado por secagem em estufa a 105°C seguido de pesagem até peso constante.

Após determinação da umidade, 0,25 g das amostras (levedura e suplemento alimentar) foram pesados em balança analítica com resolução de 0,01 mg, seguindo o processo de digestão no HPA-S (do inglês *High Pressure Asher System*). Esse equipamento opera em atmosfera de nitrogênio garantindo melhor controle de todo o processo de digestão. A decomposição das amostras foi realizada de acordo com o programa mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Programa de decomposição do HPA-S

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Permanência (min)
1	70	0	0
2	120	20	0
3	240	0	60

Após a decomposição das amostras, os frascos foram resfriados até temperatura ambiente (21 ± 2) °C seguindo-se adição de água tipo I até a massa de 15 g.

3.3.1.2.

Condições operacionais do ICP-MS e do ICP OES

Para a determinação de selênio total nas amostras de suplemento alimentar foram utilizados os ICP-MS (DRC II e Nexlon) empregando as condições experimentais apresentadas na Tabela 2.

A otimização diária das condições do plasma para equipamentos, foi realizada com o uso de uma solução multielementar contendo $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Mg, In, U, Ce e Ba, com a finalidade de garantir a sensibilidade instrumental (intensidade máxima para Mg: 6000 cps, In: 30000 cps e U: 20000 cps) e manter a formação de óxidos (CeO^+) e íons dupla carga (Ba^{2+}) inferiores a 3%.

Adicionalmente, para corrigir possíveis flutuações instrumentais e efeitos relacionados a interferências não espectrais, foi empregado um padrão interno introduzido em linha através de uma peça “T”.

Tabela 2: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP-MS (DRC II e Nexlon)

Parâmetro	DRC II	Nexlon
Potência da rádio		1350
frequência (W)		
Gás do plasma (L min^{-1})		15
Ar auxiliar (L min^{-1})		1,1
Ar nebulizador (L min^{-1})	0,92-0,96	1,0-1,04
Cones		Pt
Modo de varredura		Altura de pico
Varreduras por leitura		5
Leituras por replicatas		1
Replicas		7

Dwell time (ms)		50
Operação do detector		Dual
CH ₄ (mL min ⁻¹)	-	0,9
Rpq	-	0,45
Rpa	-	0
NH ₃ (mL min ⁻¹)	1	-
Rpq	0,45	-
Rpa	0	-
O ₂ (mL min ⁻¹)	-	1,6
Rpq	-	0,65
Rpa	-	0

As condições experimentais para a determinação de Se total em suplemento alimentar por ICP OES encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP OES

Parâmetro	Valor
Potência da rádio frequência (W)	1300
Gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Ar auxiliar (L min ⁻¹)	1
Ar nebulizador (L min ⁻¹)	1
Modo de aquisição	Altura de pico
Pontos para integração	5
Tempo de integração (s)	1
Replicatas	7
Linha espectral (λ) nm / Se(I)	196,026

A determinação de selênio total na amostra de levedura enriquecida isotopicamente em ⁷⁸Se foi realizada num espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (tipo quadrupolo), Agilent modelo 7700x (*Agilent technologies, Tokyo, Japan*) dotado de célula de colisão para correção de interferências espectrais (Tabela 4) e num ICP-MS simultâneo (Tabela5), (*"Multicollector"*; MC-ICP-MS; Neptune, Thermo).

Para a otimização diária das condições do plasma (ICP-MS, modelo Agilent 7700x), foi usada uma solução multielementar contendo $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Li, Y, Tl e Ce, para garantir a sensibilidade instrumental (intensidade máxima para Li: 10000 cps, Y: 20000 cps e Tl: 10000 cps) e manter a incidência de óxidos (CeO^+) e dupla cargas (Ce^{2+}) inferiores a 3%.

Tabela 4: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP-MS (Agilent 7700x)

ICP-MS (Agilent 7700x)	
Rádio Frequência	1500 W
Ar Principal	15 L min^{-1}
Ar Auxiliar	1 L min^{-1}
Ar Nebulizador	$1,13 \text{ L min}^{-1}$
<i>Sampling depth</i>	6 mm
<i>Points per peak</i>	3
<i>Acquisition time por point</i>	4s
Replicatas	5
H_2	4 mL min^{-1}
<i>Cell exit</i>	-19 V
<i>Octapole bias</i>	-13 V
<i>QP bias</i>	-12 V

As condições operacionais do ICP-MS (MC) foram otimizadas de maneira a garantir máxima sensibilidade para uma solução de 1 mg kg^{-1} de Se e encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Condições operacionais utilizadas para análises por ICP-MS (MC)

Parâmetros	Valor							
Potência	1300 W							
Ar Principal	15 L min ⁻¹							
Ar Nebulizador	1 L min ⁻¹							
Ar Auxiliar	0,9 L min ⁻¹							
Resolução	Baixa							
Número de blocos	1							
<i>Extraction</i>	-1998 V							
<i>Source Quad1</i>	-719 V							
<i>Rot-Quad1</i>	0,9 V							
<i>Foc-Quad1</i>	-19,4 V							
<i>Rot-Quad2</i>	-0,1 V							
<i>Source offset</i>	-4,0 V							
Configuração dos copos de Faraday								
L-4	L-3	L-2	L-1	C	H-1	H-2	H-3	H-4
⁷⁴ Se	⁷⁴ Se ¹ H	⁷⁶ Se	⁷⁷ Se	⁷⁸ Se	⁷⁹ Br	⁸⁰ Se	⁸¹ Br	⁸² Se

3.3.2.

Espécies de selênio (selenometionina)

3.3.2.1.

Preparo das amostras para determinação de selenometionina

O preparo das amostras para a determinação de selenometionina foi desenvolvido e validado em trabalho prévio (vide anexos 8.3.2) (SILVA et al., 2013). A digestão enzimática com protease XIV foi o método de escolha para o tratamento das amostras. Para tanto, 0,25 g de levedura foram devidamente pesados em balança analítica e transferidos para tubos de polipropileno seguindo-se a adição de 5 mL de solução extratora contendo 20 mg de protease. A solução resultante foi homogeneizada em vortex por 30 s e incubadas em um agitador orbital por 16h a 37°C e 200 rpm. Após o termino do processo de digestão enzimática, as amostras foram centrifugadas por 40 min a 4000 rpm e os sobrenadantes foram filtrados em filtros de PVDF de 0,45 µm. Os extratos resultantes da extração enzimática foram acondicionados em tubos *ependorf* de 1 mL e para garantir uma atmosfera isenta de oxigênio esses tubos foram levados

a um fluxo de nitrogênio seguindo seu armazenamento a -20°C para os estudos posteriores.

3.3.2.2.

Acoplamento HPLC-ICP-MS

O desenvolvimento da interface entre a técnica de separação (HPLC) e uma técnica de detecção sensível e específica (ICP-MS) é de extrema importância para a obtenção de resultados confiáveis em análises de especiação. Uma interface “ideal” deve garantir o transporte quantitativo das espécies de interesse da técnica de separação à técnica de detecção evitando a degradação/interconversão das espécies. Afortunadamente, o desenvolvimento de uma interface que atenda essas características no acoplamento entre HPLC e ICP-MS é simples tendo em vista que as vazões utilizadas em cromatografia líquida são compatíveis com as vazões de amostra comumente empregadas em ICP-MS. Dessa maneira, o acoplamento entre essas duas técnicas (Figura 7) foi realizado utilizando um tubo *peek* com diâmetro de 0,18 mm que permitiu a introdução do efluente oriundo da coluna cromatográfica no nebulizador do ICP-MS.

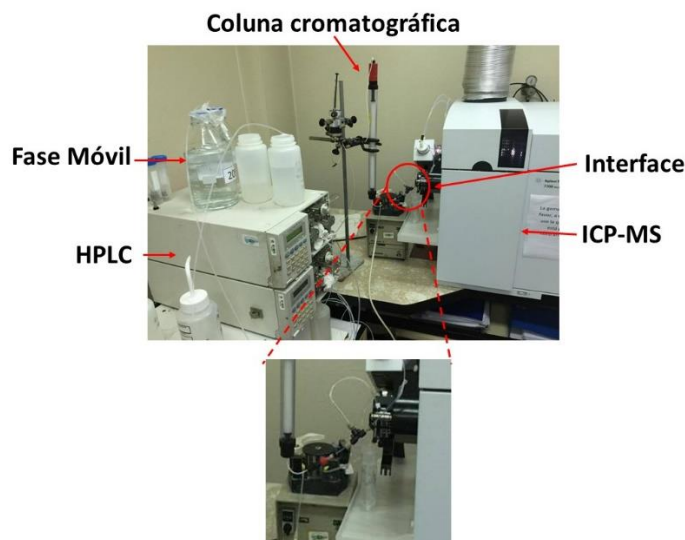


Figura 7: Acoplamento HPLC-ICP-MS

3.3.2.3.

Condições operacionais do HPLC-ICP-MS

Para realizar a análise de especiação mediante acoplamento HPLC-ICP-MS, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10AD. As separações das diferentes espécies de selênio presentes nas amostras de

levedura foram realizadas utilizando diferentes colunas cromatográficas incluindo fase reversa (C18 Luna; Phenomenex, 150mm x 2mm x 3 μ m), troca aniônica forte (PRPX-100, Hamilton, 250 mm x 4.1 mm x 10 μ m) e exclusão por tamanho (Superdex 200 10/300 GL e Superdex Peptide HR 10/30).

A separação cromatográfica das espécies de selênio foi primeiramente realizada em coluna C18 Luna e as condições operacionais do acoplamento encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Condições operacionais do acoplamento HPLC-ICP-MS para especiação de selênio em levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se)

HPLC	
Coluna C18 Luna; Phenomenex	150 mm x 2 mm x 3 μ m
Pré-coluna; Phenomenex	4 mm x 2 mm
Fase móvel	HFBA (0,05 %); MeOH (1%); pH= 2,49
Vazão	0,2 mL min ⁻¹
Volume de injeção	5 μ L
Modo de eluição	Isocrático
ICP-MS (Agilent 7700x)	
Rádio Frequência	1500 W
Ar Principal	15 L min ⁻¹
Ar Auxiliar	1 L min ⁻¹
Ar Nebulizador	1,13 L min ⁻¹
H ₂	4 mL min ⁻¹
<i>Cell exit</i>	-19 V
<i>Octapole bias</i>	-13 V
<i>QP bias</i>	-12 V

3.3.3.

Produção da levedura enriquecida isotopicamente

3.3.3.1.

Microorganismos

Para a produção da levedura enriquecida isotopicamente em ^{78}Se foi utilizada uma cepa liofilizada de *Saccharomyces cerevisiae* certificada da empresa ATCC cadastrada no Registro Geral de Microorganismos sob o número P40002.

Uma avaliação inicial da levedura foi realizada de acordo com o procedimento apresentado na Figura 8 em busca de possível contaminação por outros microorganismos.

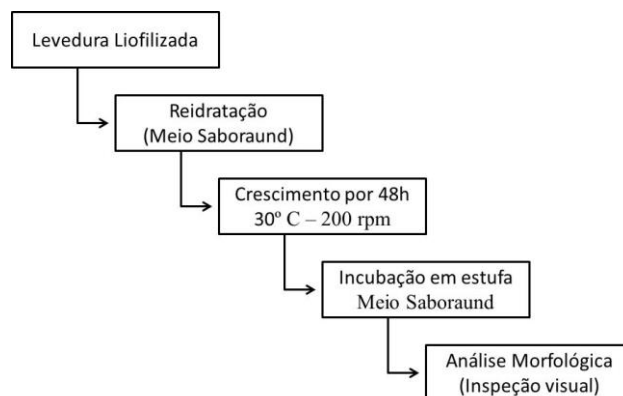


Figura 8: Avaliação inicial de contaminação da cepa de levedura por outros microorganismos

Inicialmente a levedura liofilizada foi reidratada em meio de cultura do tipo *Saboraund* (líquido) e submetida a crescimento sob agitação por 48h a 30°C e 200 rpm. Após esse período o inóculo resultante foi repicado em meio *Saboraund ágar* (sólido) e levado à estufa por 48h.

A avaliação da qualidade e da presença de contaminação na cepa de *saccharomyces cerevisiae* foi realizada mediante inspeção visual da placa de crescimento onde foi possível observar a presença de colônias uniformes e utilizando a câmara de *Newbauer* foi possível atestar a ausência de outros microorganismos. Detalhes mais específicos sobre os meios de cultura utilizados neste trabalho serão apresentados a seguir.

3.3.3.2. Meios de Cultivo

Sabouraud Dextrose Agar

O meio *Sabouraud* foi utilizado para a avaliação inicial da cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Para tanto, 65 g do meio sólido foi solubilizado em 1L de água Tipo II a 50°C em banho termostático. A composição resultante possui os seguintes componentes: Peptona (10 g L⁻¹), dextrose (40 g L⁻¹) e agar (15 g L⁻¹).

Yeast Malt Broth (YM Broth) líquido

O meio YM líquido, utilizado para o preparo do inóculo e para a produção da biomassa nos estudos iniciais, é composto por: extrato de levedura (3 g L^{-1}); extrato de malte (3 g L^{-1}); dextrose (10 g L^{-1}), “*peptic digesto of animal tissue*” (5 g L^{-1}). O preparo do meio de cultura YM Broth foi realizado mediante diluição de 10,5 g do meio comercial para um volume final de 490 mL.

Açúcar Mascavo

De acordo com a literatura (OLIVEIRA, 2006), o açúcar mascavo possui os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento de leveduras. Dessa forma, açúcar mascavo foi utilizado para os estudos iniciais e otimização do processo de produção da levedura enriquecida em selênio isotopicamente enriquecido. Para tanto, foram preparados dois meios de cultura de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7: Composição dos meios de cultura à base de açúcar mascavo

Componentes	Meio de cultura	
	MAS I	MAS II
Açúcar mascavo	40 g L^{-1}	120 g L^{-1}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g L^{-1}	4 g L^{-1}
KH_2PO_4	3 g L^{-1}	3 g L^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 g L^{-1}	4 g L^{-1}

Todos os meios de cultura bem como os materiais utilizados nesse trabalho foram submetidos à esterilização em autoclave à 121°C por 30 minutos.

3.3.3.3. Manutenção das cepas

A cepa de *saccharomyces cerevisiae* liofilizada foi reativada com 50 mL de meio de cultivo *Sabouraud Dextrose* líquido esterilizado em frasco *Erlenmeyer* de 250 mL e incubadas a 30°C , sob agitação (200 rpm) por 48 horas. Após este período a solução de inóculo foi fracionada e conservada em *Sabouraud Dextrose* líquido e glicerol a -20°C . As culturas de trabalho foram mantidas em tubos

contendo meio *Sabouraud Dextrose* Ágar a 4°C e foram repicadas para um novo meio de cultivo quando necessário.

3.3.3.4. Preparo do Inoculo

O preparo do inoculo foi realizado mediante a transferência de uma colônia de células contidas em um tubo inclinado (cultura de trabalho) para 50 mL de meio YM líquido contido em frasco de *erlenmeyer*. O frasco foi incubado sob agitação em incubador do tipo *Shaker* a 30°C e 120 rpm inicialmente por 24 horas. Após o estudo cinético do inoculo, esse tempo de incubação foi diminuído para 20 horas.

Uma vez otimizado e selecionado o meio de cultivo, o inoculo foi preparado como descrito acima, porém utilizando o meio de cultivo otimizado em vez de YM.

3.3.3.5. Viabilidade celular

A medição da viabilidade celular foi realizada utilizando a citometria de fluxo. A viabilidade é um indicativo da atividade celular, expressa em porcentagem de acordo com a seguinte equação:

$$Viabilidade (\%) = \frac{células\ viáveis}{células\ viáveis + células\ não\ viáveis} \times 100$$

Iodeto de propídeo foi utilizado como sonda fluorescente para avaliar a integridade da parede celular das células de levedura, onde apenas as células mortas são reativas ao iodeto de propídeo sendo detectadas pelo citômetro de fluxo.

3.3.3.6. Preparo do padrão isotópico

Para o preparo da solução de selênio isotópico (^{78}Se), 0,4958 g do padrão sólido foram cuidadosamente pesados e levados à digestão com HNO_3 a quente seguindo a adição de água tipo I para um volume final de 40 mL.

Uma alíquota da solução de padrão isotópico foi evaporada em chapa de aquecimento para eliminação do HNO_3 seguindo-se a adição de HCl com posterior aquecimento a 80°C por 40 minutos. Esse procedimento foi necessário para

converter o selênio eventualmente presente na forma de selenato para sua forma reduzida, selenito.

3.4.

Preparo das amostras de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para identificação de proteínas

3.4.1.

Extração das proteínas

Aproximadamente 0,1 g de levedura foram submetidos à extração aquosa de proteínas utilizando 3 procedimentos distintos, a saber:

Procedimento 1: As amostras de levedura foram ressuspensas em 700 μL de tampão salino PBS a 4°C. A seguir a suspensão obtida foi transferida para o frasco de ruptura com 400 μL de micro bolas de vidro. O frasco de ruptura foi levado ao homogeneizador *speed mill plus* utilizando dois ciclos de ruptura de 1 minuto intercalados por pausa de 1 minuto entre os ciclos; a seguir as micro bolas de vidro foram retiradas da amostra previamente à etapa de centrifugação.

Procedimento 2: As amostras de levedura foram ressuspensas em 700 μL de solução de acetato de amônio (NH_4Ac) 0,05 mol L^{-1} . A seguir as amostras foram submetidas à extração assistida por uma sonda de ultrassom, em banho de gelo, intercalando 5 ciclos de sonicação com duração de 30 s. Para avaliar a influência do NH_4Ac sobre a extração de proteínas, uma das amostras de levedura foram submetidas à sonicação logo após a ressuspensão enquanto outra amostra foi deixada por 1 h na solução de NH_4Ac previamente à etapa de extração.

Procedimento 3: Neste procedimento as amostras de levedura foram ressuspensas em 700 μL de água tipo I e levadas a extração em banho ultrassom por 3h.

Após a etapa de extração as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm a 4°C e os extratos obtidos foram armazenados em porções individuais de 200 μL em tubos *eppenderof* e armazenados a -20°C para posterior análise.

3.4.2.

Determinação de proteínas em amostras de levedura

Após a extração aquosa das proteínas presentes nas amostras de levedura, a análise dos extratos aquosos foi realizada mediante HPLC (Agilent modelo

1100) com detecção ultravioleta e o com acoplamento HPLC-ICP-MS. Para tanto, foram utilizadas as condições cromatográficas apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Condições operacionais para obtenção do perfil proteico por SEC-HPLC
HPLC-DAD (Agilent 1100)

Coluna	Superdex 200 10/300 GL
Equação de calibração da coluna	$y = -0,0877x + 6,9236$ $R^2 = 0,9709$
Fase móvel	Acetato de amônio 0,05 mol L ⁻¹
Vazão	0,6 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 µL
Modo de eluição	Isocrático
Comprimento de onda	280 nm e 245 nm

As mesmas condições cromatográficas foram usadas, tanto para a detecção DAD como para a detecção com o ICP-MS, usando o acoplamento HPLC-ICP-MS. As condições operacionais do ICP-MS empregadas para o monitoramento dos isótopos de selênio as descritas na Tabela 4.

3.4.3. Digestão trípica

Os extratos proteicos obtidos pela extração assistida por ultrassom foram analisados por HPLC-ICP-MS empregando uma coluna de exclusão por tamanhos (SEC) e as frações correspondentes às proteínas de 12 kDa foram coletadas e liofilizadas e armazenadas a -20°C.

As frações liofilizadas foram reconstituídas com 100 µL de água tipo I e tiveram seu teor proteico determinado por espectrometria UV-Vis (280 nm) utilizando um padrão de albumina para construção da curva analítica. Essa determinação se fez necessária afim de atender a relação estequiométrica recomendada para a digestão trípica; neste trabalho utilizou-se uma relação proteína:tripsina de 100:1.

Para realização da digestão trípica, 20 µL de solução de ditioneitol (DTT) 0,2 mol L⁻¹ foram adicionados à fração proteica reconstituída, a amostra foi armazenada em ausência de luz por 1,5 h. O DTT é responsável por desnaturar as proteínas presentes na amostra rompendo as ligações S-S e Se-S.

Após esse período 20 μL de solução 0,2 mol L^{-1} de iodoacetamida foram adicionados à amostra e de maneira similar à etapa anterior, as amostras foram levadas ao escuro por 1,5h. A iodoacetamida é a responsável por realizar a alquilação (proteção) dos pontos de ruptura na estrutura proteica produzida pela adição do DTT.

Uma solução de tripsina (20 mg mL^{-1} , pH=8) foi preparada com adição de 1×10^{-4} mol L^{-1} de Ca para evitar a auto hidrólise da tripsina. Por fim, 0,1 mL da solução de tripsina foi adicionado à amostra e esta foi levada para um banho termostatzado a 37°C por 16h. Após esse período, o pH da amostra foi reduzido para 2 pela adição de uma solução de ácido trifluoracético (TFA) com o objetivo de desnaturar a tripsina. A solução resultante da digestão triptica foi deixada em atmosfera de nitrogênio e armazenada a -20°C para posterior análise.

O extrato peptídico, obtido pela digestão triptica da fração proteica, foi analisado mediante o emprego do HPLC com espectrômetro de massas (ESI-Q-TOF-MS) utilizando as condições experimentais apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: Condições operacionais do acoplamento HPLC-ESI-Q-TOF-MS para a análise do extrato peptídico

Parâmetros	Valor
Fase Móvel A	Ácido fórmico 0,1 % em água
Fase Móvel B	Ácido fórmico 0,1 % em Acetonitrila
Gradiente	3 min \longrightarrow 2 % Fase B
	75 min \longrightarrow 40% Fase B
	80 min \longrightarrow 40 % Fase B
	85 min \longrightarrow 80 % Fase B
	90 min \longrightarrow 2 % Fase B
Vazão	150 $\mu\text{L min}^{-1}$

A interpretação dos dados obtidos experimentalmente para o digerido triptico foi realizada utilizando o software *MassMatrix* (XU; FREITAS, 2007, 2008; XU; YANG; FREITAS, 2008; XU; ZHANG; FREITAS, 2008) principalmente devido à complexidade dos dados obtidos pela espectrometria de massas molecular. O software *Massmatrix* utiliza um algoritmo de busca de fragmentos de íons gerados pela espectrometria de massas orgânica e interpreta as possíveis transições encontradas referentes ao íon molecular do analito de interesse, utilizando para isso, banco de dados disponíveis em plataformas como a UNIPROT. Para a interpretação dos dados experimentais obtidos na análise do estrato triptico foi

utilizado o proteoma UP000002311 que corresponde ao levantamento proteômico de uma cepa de *saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508 / S288c (disponível em www.uniprot.org/proteomes).

4

Resultados e Discussão

4.1.

Determinação de selênio total em suplemento alimentar por ICP-MS do tipo quadrupolo com célula de reação dinâmica (DRC II e Nexlon) (por curva analítica)

Diferentes abordagens foram estudadas para suprimir as interferências espectrais sobre os isótopos de selênio empregando a célula de reação dinâmica, de forma a encontrar as melhores condições instrumentais para a determinação de selênio em levedura selenizada. Para tanto, dois equipamentos (DRC II e Nexlon) com diferentes opções de gases de reação e colisão foram utilizados, sendo amônia, metano e oxigênio usados como gás de reação no ICP-MS modelo DRC II e hélio como gás de colisão no ICP-MS modelo Nexlon. A quantificação do selênio nas amostras foi realizada mediante curva de calibração externa utilizando Ga como padrão interno.

4.1.1.

Otimização das condições operacionais da célula de reação dinâmica

Embora estudos univariados para fins de otimização sejam amplamente utilizados, seu emprego inadequado pode resultar em erros na determinação das condições operacionais mais adequadas, principalmente por não considerar possíveis efeitos de interação entre as variáveis que compõem os estudos de otimização.

De forma a verificar se a interação entre a vazão do gás de reação e o parâmetro de rejeição q , R_{pq} , foi estatisticamente significativa um planejamento composto central foi realizado medindo a intensidade de sinal obtida para o branco e para uma solução de amostra contendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de selênio. De acordo com Tanner e colaboradores (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002) o limite de detecção estimado (DRC_{LOD}), obtido pela equação 23 (modificada), pode ser utilizado como critério para otimização da célula de reação dinâmica. É importante mencionar que DRC_{LOD} não expressa o limite de detecção do método, mas

somente uma ferramenta utilizada para fins de validação das condições experimentais da célula de reação dinâmica.

$$DRC_{LOD} = \frac{3 \times \sqrt{I_{Branco}}}{I_{Solução\ amostra} - I_{Branco}} \times C \quad \text{Eq.23}$$

Solução amostra Branco Solução Amostra

Amônia como gás de reação (ICP-MS DRC II)

Previamente a realização de um estudo multivariado das condições operacionais da célula de reação dinâmica foi realizado um estudo univariado da vazão do gás de reação mantendo o parâmetro de rejeição q fixo em 0,4. Nesse estudo foram utilizadas uma solução de branco (HNO_3 2%) e uma solução de levedura selenizada com uma fração mássica final de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, monitorando a razão massa/carga 80.

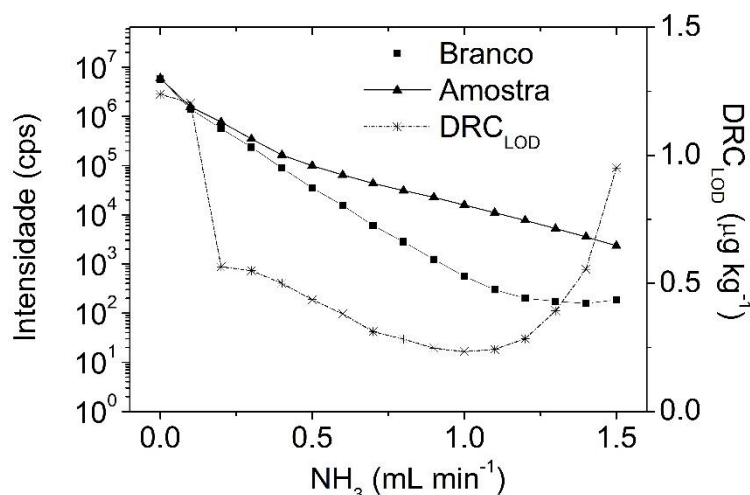


Figura 9: Efeito da vazão de NH_3 sobre o sinal obtido para m/z 80 ($R_{pq} = 0,4$).

Como pode ser observado na Figura 9, o aumento da vazão de NH_3 reduz drasticamente a intensidade obtida para as soluções de branco e amostra. Com o ICP-MS operando em modo padrão, ou seja, sem adição do gás de reação, foram observadas intensidades de aproximadamente 5.000.000 cps para ambas as soluções e 200 cps e 7.600 cps para as soluções de branco e amostra, respectivamente, com uma vazão de NH_3 de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Em vazões maiores do gás de reação a intensidade obtida para amostra continuou decaindo enquanto que a intensidade obtida para o branco se manteve razoavelmente constante. Provavelmente esse comportamento deva-se ao fato da reação entre a amônia e o selênio ser termodinamicamente favorável (BOUCHOUX; RASHAD; HELAL, 2012).

Bouchoux *et al.* (BOUCHOUX; RASHAD; HELAL, 2012) realizaram uma investigação teórica das interferências sobre os isótopos de selênio em ICP-MS e reportaram que a formação de SeNH_3^+ (ou HSeNH_2^+) e NH_4^+ corresponde a um processo exotérmico de -240 e -50 kJ mol^{-1} respectivamente sendo sugerido um mecanismo em duas etapas para esta reação como mostrado nas equações 24 e 25:



Essas reações são termodinamicamente favoráveis de ocorrer dentro da célula de reação dinâmica e estão em concordância com o comportamento experimental reportado por Sucharová (SUCHAROVÁ, 2011). De acordo com esse trabalho, amônia é um bom agente formador de cluster, capaz de gerar espécies de fórmula geral $\text{M}(\text{NH}_3)_n^+$ ou produtos de condensação iônica como $\text{M}(\text{NH})(\text{NH}_3)_n^+$ ou $\text{M}(\text{NH}_2)(\text{NH}_3)_n^+$.

Embora o fato da reação do selênio com amônia ser termodinamicamente favorável, o que é um aspecto indesejável na resolução de interferências espectrais empregando a tecnologia da célula de reação dinâmica, neste caso, a reação da amônia com a espécie interferente ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$) possui uma velocidade de reação maior em relação à sua reação com o analito (^{80}Se), permitindo seu uso para fins analíticos.

A reação entre $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ e NH_3 é proposta por ocorrer por transferência de carga de acordo com a equação abaixo, uma vez que o potencial de ionização do $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ (14,456 eV) é maior que o potencial de ionização do NH_3 (10,16 eV) (BOUCHOUX; RASHAD; HELAL, 2012; D'ILIO *et al.*, 2011).



Após o estudo univariado da vazão de amônia, foi realizado o planejamento experimental (planejamento composto central) tendo como variáveis, além da vazão de amônia, o parâmetro de rejeição $q - \text{Rpq}$. Como resultados da otimização multivariada, obteve-se o gráfico de pareto e a superfície de resposta apresentados na Figura 10

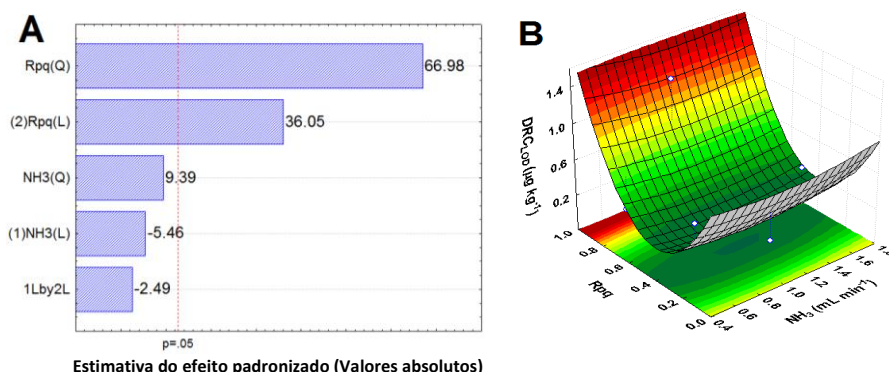


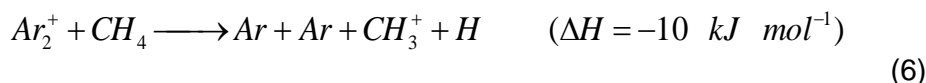
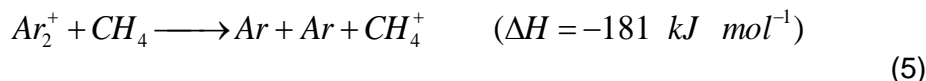
Figura 10: (A) Gráfico de Pareto e (B) superfície de resposta obtida pelo design composto central do Rpq e da vazão de NH₃.

Como pode ser observado na Figura 10A, os termos linear e quadrático do parâmetro de rejeição q, Rpq, apresentaram significância estatística a um nível de confiança de 95% sobre o limite de detecção estimado (DRC_{LOD}) enquanto que a vazão de amônia não influenciou de forma significativa o limite de detecção estimado na faixa estudada.

Este comportamento era esperado uma vez que o limite inferior (0,5 mL min⁻¹) e o limite superior (1,5 mL min⁻¹) para vazão de amônia e Rpq do planejamento composto central foram selecionados levando em consideração os valores obtidos em estudo univariado, no qual a intensidade obtida para m/z 80 na solução do branco permanece constante, garantindo que a incidência da espécie interferente ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ não influenciaria o estudo multivariado. A Figura 10B mostra a superfície de resposta na qual é possível identificar as melhores condições operacionais da célula de reação dinâmica, que apresentaram menores valores de limite de detecção estimado com Rpq de 0,4 e vazão de amônia de 1 mL min⁻¹.

Metano como gás de reação (ICP-MS Nexion)

De acordo com Tanner e Barannov (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002), metano pode ser usado como gás de reação levando a reações com espécies poliatômicas de argônio. D'Ilio *et al.* (D'ILIO *et al.*, 2011) mencionaram que a reação entre CH₄ e ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ ocorre mediante mecanismo de transferência de carga uma vez que o potencial de ionização do CH₄ é 12,6 eV, menor do que o potencial de ionização do ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ (aproximadamente 14,4 eV) e pode ser confirmado por dados termodinâmicos.



Dessa forma, é esperado que esse gás de reação seja adequado para eliminar as espécies interferentes, principalmente o dímero de argônio, sobre os isótopos de selênio.

O mesmo protocolo de otimização usado para o estudo da NH_3 como gás reação foi empregado para avaliar a capacidade do CH_4 em eliminar as interferências espectrais sobre o isótopo ^{80}Se e novamente o fator de interação entre a vazão do gás de reação (CH_4) e o Rpq não apresentou significância estatística (resultados não apresentados aqui).

Na Figura 11 é apresentado o comportamento do metano como gás de reação sobre a m/z 80, usando uma solução branco de HNO_3 2% e uma solução de amostra de levedura ($25 \mu g \text{ kg}^{-1}$ em Se).

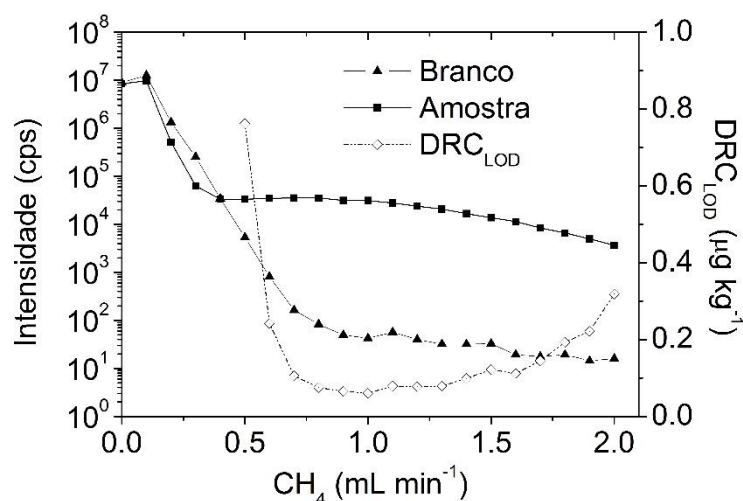


Figura 11 Efeito do CH_4 como gás de reação sobre o sinal obtido para a m/z 80 (Rpq = 0,45)

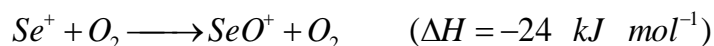
Como esperado, quando o equipamento opera no modo padrão, ou seja, sem adição de qualquer gás de reação, as intensidades obtidas para as soluções de branco e amostra são da mesma ordem de grandeza, aproximadamente 10.000.000 cps, devido a alta incidência de espécies interferentes geradas por reações de recombinação entre íons de argônio e outras espécies presentes na atmosfera do plasma. Como pode ser observado na Figura 11, a intensidade para

ambas soluções foi reduzida até a completa discriminação entre as intensidades obtidas para o branco a amostra em uma vazão de CH₄ de aproximadamente 0,5 mL min⁻¹. Para a solução de amostra, a intensidade obtida manteve-se razoavelmente constante sendo que em vazões de CH₄ superiores a 1 mL min⁻¹ o sinal analítico começou a decair.

Algumas considerações podem ser realizadas baseando-se nos dados experimentais obtidos por esse trabalho. A reação entre metano e o dímero de argônio (⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺) é termodinamicamente favorável, como pode ser evidenciado pela completa distinção entre intensidades obtidas para as soluções estudadas. Porém, uma questão ainda permanece acerca da redução observada para a solução de amostra em vazões de CH₄ superiores a 1,0 mL min⁻¹. Uma provável explicação é que, em altas vazões do gás de reação, processos colisionais dentro da célula de reação dinâmica, são responsáveis pela desfocalização dos íons de selênio do feixe iônico, provavelmente pelo aumento da pressão interna do compartimento onde está localizada a célula resultando assim, num aumento significativo das colisões não efetivas. Dessa forma, a otimização da vazão do gás de reação deve ser encontrar uma condição de compromisso entre a eficiência da reação e a redução do sinal analítico por processos colisionais.

Oxigênio como gás de reação (ICP-MS Nexion)

Uma abordagem interessante que pode ser empregada para resolução de interferências espectrais em ICP-MS dotado de célula de reação dinâmica, é a possibilidade de emprego de um gás de reação que altere a m/z do analito de interesse para outra mediante reação de transferência, permitindo a detecção do elemento de interesse livre de interferências em outra m/z. Comumente, oxigênio é usado para este fim (DA SILVA; ARRUDA, 2013; STÜRUP; BENDAHL; GAMMELGAARD, 2006). A reação entre selênio e oxigênio, gerando a espécie SeO permite a determinação desse elemento monitorando a m/z 96, sem a presença indesejável da espécie interferente ⁴⁰Ar⁴⁰Ar. De fato, selênio reage com oxigênio de acordo com a seguinte equação:



Eq.27

Nas Figuras 12A e 12B são apresentados experimentos univariados realizados para avaliar a aplicabilidade dessa abordagem para determinação de selênio total em amostras de levedura.

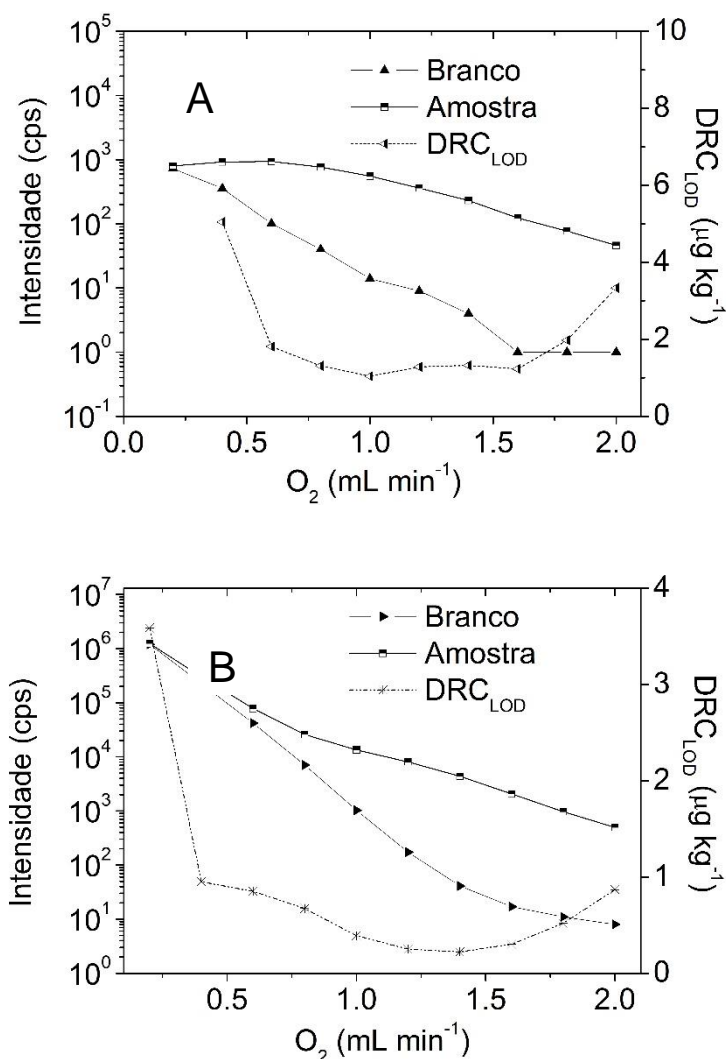


Figura 12: Efeito do O_2 como gás de reação sobre o sinal obtido para (A) m/z 96 (⁸⁰Se¹⁶O) e (B) m/z 80 (⁸⁰Se) (Rpq = 0,65).

Na Figura 12A é apresentado o comportamento obtido quando oxigênio foi usado como gás de reação para converter ⁸⁰Se em ⁸⁰Se¹⁶O, monitorando a m/z 96. Como pode ser observado, vazões maiores de O_2 promovem uma maior conversão do ⁸⁰Se⁺ em ⁹⁶SeO⁺, sendo encontrado um máximo em 0,6 mL min⁻¹ de O_2 seguindo um decréscimo das intensidades obtidas sendo que para a solução do branco a intensidade apresenta redução em toda faixa estudada. A razão sinal/fundo – SBR (do inglês *signal to background ratio*) foi avaliada tendo seu valor máximo localizado numa vazão de O_2 de 1,6 mL min⁻¹ (resultados não apresentados aqui).

A reação entre selênio e oxigênio dentro da célula de reação dinâmica não é completa, sendo somente uma fração do selênio total convertida em SeO⁺. Dessa forma, a eficiência de reação foi estimada em aproximadamente 10%,

medindo as intensidades obtidas para a solução do branco, de acordo com a equação 11. Essa eficiência de reação está em concordância com trabalhos publicados na literatura (STÜRUP; BENDAHL; GAMMELGAARD, 2006).

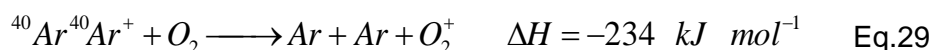
$$\%SeO = \frac{I_{SeO}}{I_{SeO} + I_{Se}} \times 100 \quad \text{Eq.28}$$

Onde:

I_{SeO} = Intensidade líquida na m/z 96

I_{Se} = Intensidade líquida na m/z 80

A Figura 12B mostra o perfil reacional do oxigênio atuando como gás de reação eliminando as interferências poliatômicas sobre o isótopo ^{80}Se , principalmente $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ e o comportamento apresentado foi similar ao obtido com amônia. Günther and Hattendorf (HATTENDORF; GÜNTHER, 2003) mencionaram que O_2 reage com $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ por transferência de carga de acordo com o seguinte mecanismo:



A reação entre O_2 e Se também pode ocorrer porém em menor extensão sendo o ΔH de -24 kJ mol^{-1} (BANDURA et al., 2006; HATTENDORF; GÜNTHER, 2003), Dessa forma, o emprego de oxigênio possibilita a determinação de selênio como $^{80}\text{Se}^+$ ou $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$, sendo o analista responsável pela escolha mais adequada. Assim, a determinação de Se monitorando as m/z 80 e 96 foi realizada nos experimentos posteriores.

Hélio como gás de colisão (ICP-MS Nexion)

De acordo com o fabricante, o ICP-MS modelo Nexlon é capaz de operar nas modalidades de reação e colisão. No modo colisão, um gás (hélio, xenônio ou hidrogênio) é adicionado na célula para eliminar as interferências mediante a

discriminação de energia cinética entre o interferente e o analito de interesse. Nesse trabalho, hélio foi avaliado como gás de colisão monitorando uma solução de HNO_3 2% como branco, uma solução padrão contendo $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ em selênio e amostra de levedura fortificada com $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se. O resultado desse estudo é apresentado na Figura 13.

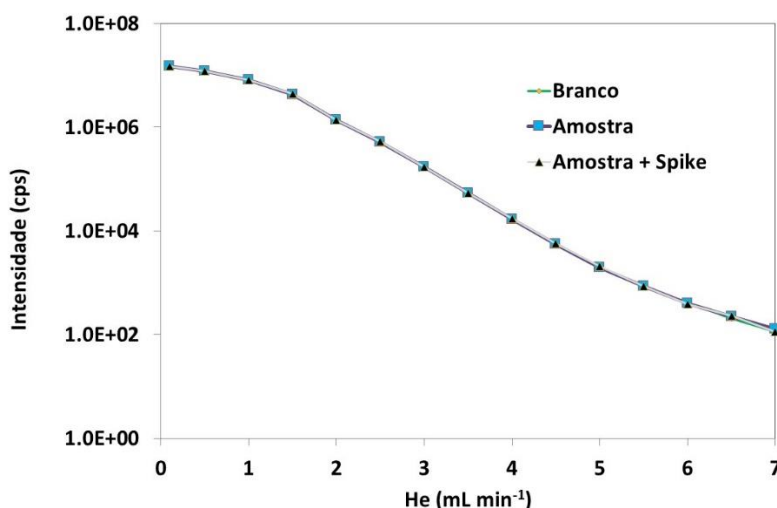


Figura 13: Efeito do hélio como gás de colisão sobre as intensidades obtidas para m/z 80

Como pode ser observado na Figura 13, as intensidades obtidas para as soluções do branco e amostra apresentam uma diminuição drástica de aproximadamente 5 ordens de magnitude quando o gás de colisão tem sua vazão aumentada de 0 mL min^{-1} para 7 mL min^{-1} . Nessa abordagem não foi possível discriminar as intensidades obtidas para nenhuma das soluções analisadas. Provavelmente esse fato é devido à forte desfocalização dos íons de selênio do feixe iônico por colisões com hélio. Dessa forma, o ICP-MS operando no modo colisão não foi capaz de resolver os problemas relacionados com a alta incidência de interferências poliatômicas sobre o isótopo mais abundante de selênio, ^{80}Se .

4.1.2. Validação e aplicação analítica

Os parâmetros de mérito analítico constituem as características intrínsecas ao método desenvolvido, sendo esses parâmetros responsáveis por fornecer ao analista uma ideia real da aplicabilidade do método proposto em relação a faixa linear de trabalho, repetibilidade e reprodutibilidade, limites de detecção e

quantificação, dentre outras características dependentes do tipo de matriz a ser analisada bem como do arranjo instrumental empregado.

A linearidade é comumente avaliada pelo coeficiente de determinação, R^2 , obtido pela regressão empregando o método dos mínimos quadrados ordinários. Esse coeficiente expressa a adequabilidade de um modelo matemático em se ajustar aos dados reais obtidos experimentalmente e quanto mais próximo da unidade ($R^2 = 1$) maior é o índice de esse modelo matemático, geralmente uma equação linear de fórmula geral $f(x) = ax + b$, é adequado para o fim proposto. Para as abordagens estudadas neste trabalho o coeficiente de determinação foi superior a 0,995 sendo dessa forma, a linearidade adequada para fins analíticos.

O limite de detecção foi obtido empregando o critério de 3σ (sendo σ o desvio padrão de 10 leituras independentes do branco) da concentração do branco. A Tabela 10 apresenta os limites de detecção instrumentais obtidos para as diferentes abordagens (diferentes gases de reação) estudadas nesse trabalho.

Tabela 10: Condições operacionais e figuras de mérito analítico do método para determinação de Se em levedura.

Abordagem	Vazão do gás de reação (mL min ⁻¹)	Rpq	Repetibilidade	
			Instrumental (%)	LOD* (µg kg ⁻¹)
Metano (⁸⁰ Se)	0,9	0,45	1,6	0,01
Oxigênio (⁸⁰ Se ¹⁶ O)	1,6	0,65	2,9	0,03
Oxigênio (⁸⁰ Se)	1,6	0,65	3,0	0,06
Amônia (⁸⁰ Se)	1,0	0,45	1,7	0,1
Modo padrão (⁸² Se)	-	-	2,2	0,2

*Limite de detecção instrumental

Como pode ser observado na tabela, o menor limite de detecção foi obtido empregando metano como gás de reação, principalmente devido a reação específica com as espécies interferentes, principalmente ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ que faz com que o sinal do selênio permaneça constante. Esse comportamento não foi observado quando amônia ou oxigênio foram empregados como gás de reação

embora ambos reduzam a incidência de espécies interferentes. Ao se comparar a Figura 9 e a Figura 12 pode ser observado que NH_3 e O_2 também reagem com selênio reduzindo a intensidade do sinal e consequentemente depreciando os limites de detecção.

Embora a abordagem que consiste na reação de transferência do ^{80}Se para $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$ tenha apresentado baixa sensibilidade (aproximadamente 10% de ^{80}Se é transformado em $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$), esta resultou em menor LOD quando comparado com os gases amônia e oxigênio, monitorando o ^{80}Se principalmente devido ao alto SBR obtido.

Um dos aspectos mais importantes no desenvolvimento de métodos analíticos é a garantia de ausência de interferências, não somente espectrais, mas também as não espectrais, que são principalmente, devido a efeitos inerentes ao sistema de introdução de amostras, efeito espaço-carga e flutuações instrumentais. De maneira a verificar e corrigir esses efeitos indesejáveis, diferentes padrões internos foram avaliados, como pode ser visto na Figura 14. Os isótopos escolhidos para este fim foram ^{69}Ga , ^{88}Sr , ^{103}Rh e ^{115}In . A adição do padrão interno foi realizada em linha mediante uma peça em T utilizando amônia como gás de reação.

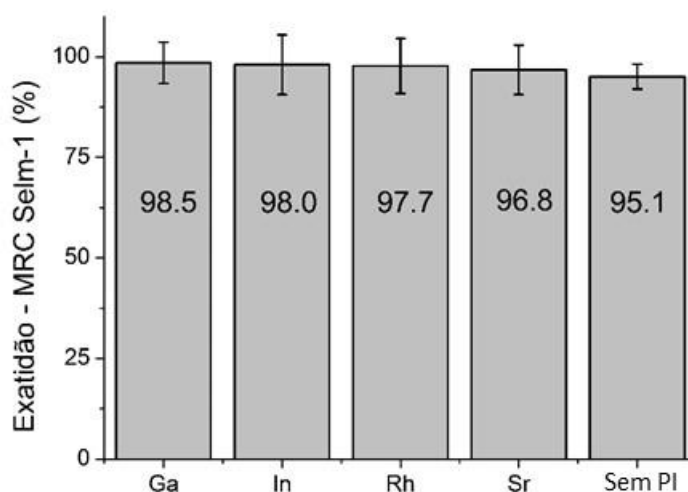


Figura 14: Avaliação de padrão interno para correção de interferência não espectral

Como pode ser observado na Figura 14, o emprego de padrão interno leva a um pequeno aumento na concordância com o valor certificado. Este comportamento já era esperado devido ao alto fator de diluição utilizado enquanto que a ligeira diferença encontrada entre os diferentes padrões internos estudados se deve principalmente às diferentes propriedades químicas como, por exemplo,

o 1º potencial de ionização. Dessa forma, Ga foi escolhido como padrão interno para os estudos subsequentes.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos pela análise da amostra de levedura empregando as diferentes abordagens estudadas neste trabalho e por ICP OES usando um método previamente desenvolvido (condições operacionais apresentadas na Tabela 3).

Tabela 11: Fração mássica de selênio em levedura enriquecida. Resultados expressos como $\bar{x} \pm U$ ($n = 5$; $p = 0.05$)

Métodos	Levedura comercial (mg kg ⁻¹)	MRC Selm-1 (2059±64) mg kg ⁻¹
Metano (⁸⁰ Se)	2136 ± 111	2141 ± 139 (104%)
Amônia (⁸⁰ Se)	2187 ± 209	2048 ± 105 (99%)
Oxigênio (⁸⁰ Se)	2298 ± 176	2137 ± 181 (104%)
Oxigênio (⁸⁰ Se ¹⁶ O)	2286 ± 173	2122 ± 204 (103%)
Modo padrão (⁸² Se)	2171 ± 131	-
ICP OES (196 nm)	2169 ± 107	2048 ± 69 (99%)

Os resultados obtidos para o MRC Selm-1 por ICP-MS empregando diferentes gases de reação apresentaram bom grau de concordância com o valor certificado com exatidão entre 99% e 104%. Comparando os resultados obtidos por ICP OES e as abordagens estudadas em ICP-MS, todos os resultados foram estatisticamente similares considerando a faixa de incerteza.

A incerteza de medição foi obtida empregando o conceito de propagação de erros de acordo com ISO GUM (JCGM, 2008). As fontes de incerteza consideradas nesse trabalho foram: *i*) fração mássica de selênio na solução analítica (u_{co}); *ii*) repetibilidade instrumental (u_{rep}); *iii*) diluição da amostra (u_{df}) e *iv*) tratamento da amostra (u_{st}) sendo as maiores fontes de incerteza a repetibilidade e a incerteza associada à curva analítica. As fontes de incerteza bem como a relação entre elas são apresentadas no diagrama de Ishikawa (Figura 15). Informações mais detalhadas sobre os cálculos de incerteza estão disponíveis no ANEXO desse trabalho.

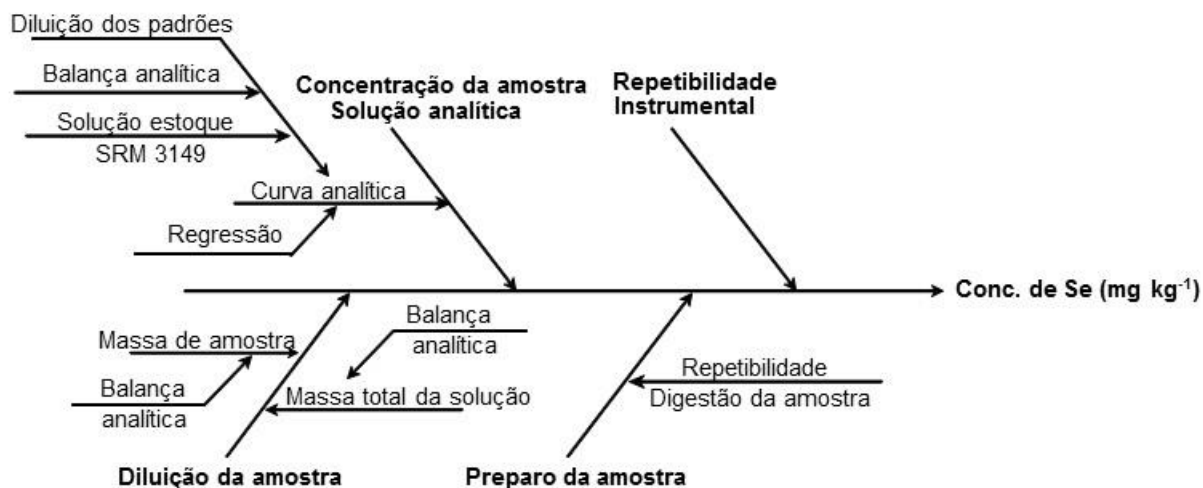


Figura 15: Diagrama de Ishikawa e a relação entre as fontes de incerteza

A influência das fontes individuais sobre a incerteza combinada é mostrada na Fig. 16.

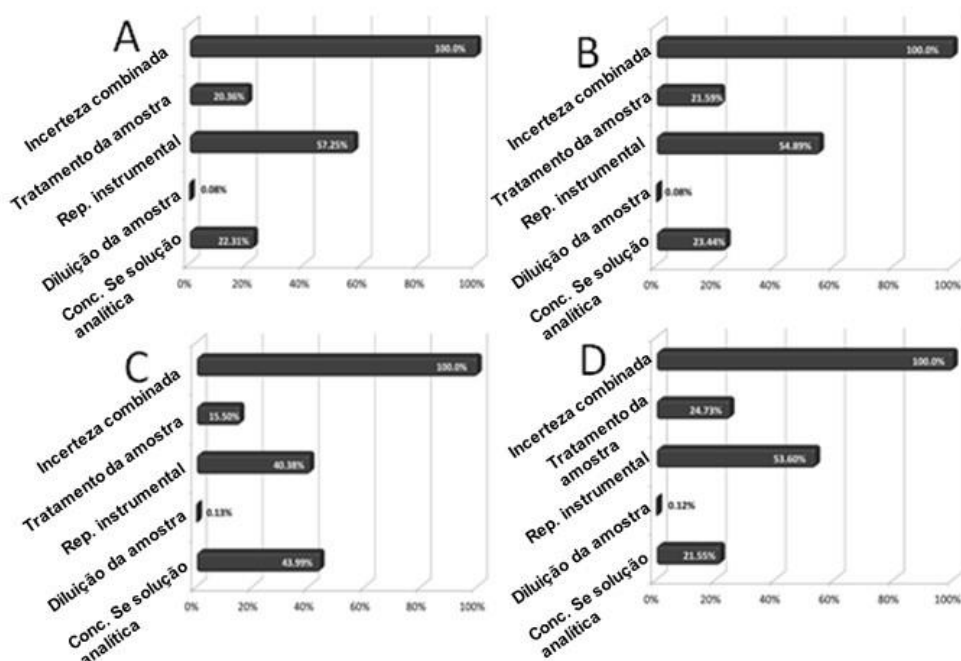


Figura 16 Influência de cada fonte sobre a incerteza global com diferentes gases de reação (A) Oxigênio - ⁸⁰Se, (B) Oxigênio - SeO, (C) Metano e (D) Amônia.

Como esperado as fontes de incerteza que apresentaram maior influência sobre a incerteza padrão combinada foram a repetibilidade instrumental e a fração mássica de selênio na solução analítica, seguidas pela incerteza do tratamento da amostra. O emprego da abordagem gravimétrica para diluição das amostras resultou numa contribuição insignificante dessa fonte para a incerteza combinada.

A influência do gás de reação sobre a incerteza pode ser avaliada pela repetibilidade instrumental como pode ser visto na Fig 14. O gás de reação que mostrou o menor impacto sobre a incerteza padrão combinada foi o metano (Fig 14C).

O maior impacto sobre o valor da incerteza expandida foi encontrado para oxigênio e amônia como gases de reação, que pode ser atribuído ao fato desses gases reagirem com selênio elevando a variabilidade do método analítico.

A metodologia desenvolvida (usando NH_3 como gás de reação) foi aplicada para a avaliação de conformidade de suplementos alimentares adquiridos no comércio local. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Fração mássica de selênio em suplementos alimentares comerciais. Resultados expressos como μg por comprimido; $\bar{x} \pm U$ ($k=2$; $n=5$).

Amostras	Conc. Selênio $\mu\text{g}/\text{compr.}$	Varição dentro do frasco (%)	Menor conc.	Maior conc.	Discrepância do valor informado (%)
Marca A (2.25 μg)*	1.6 ± 0.1	6	1.5	1.7	-29
Marca B (N.I)**	0.25 ± 0.02	8	0.23	0.27	-
Marca C (34 μg)	$42,0 \pm 8,1$	19	34	50	+23
Marca D (34 μg)	$39,2 \pm 6,0$	15	33	45	+15

*Valor rotulado 27 μg por 12 comprimidos ** Não informado

Em 2003, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução (RDC nº 360) estabelecendo os requerimentos técnicos para a rotulagem de alimentos embalados, bem como de suplementos alimentares. Esse documento apresenta aspectos sobre informações nutricionais, permitindo uma tolerância de +20% na discrepância entre o valor real da propriedade nutricional (por exemplo, μg Se por comprimido) e o valor declarado no rótulo (ANVISA, 2003).

De acordo com o critério adotado pela legislação brasileira (ANVISA, 2005), as marcas C e D podem ser consideradas adequadas para o consumo considerando a incerteza de medição. Embora os resultados encontrados para a

marca A correspondam a apenas a 71% do valor informado no rótulo, essa amostra não pode ser considerada inapropriada para o consumo de acordo com a legislação, uma vez que a RDC nº 360 não preconiza discrepâncias negativas em relação ao valor constante no rótulo.

No Brasil, a ingestão diária recomendada de selênio é 34 μg para adultos (ANVISA, 2005) embora esse valor permitido possa ser diferente de acordo com o país ou com a autoridade (BAGHURST, 2005; HØYBRÅTEN, 2012; INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; WHO; FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2004). Então, de acordo com a recomendação da ANVISA, as amostras de suplementos alimentares das marcas analisadas não representam um risco real à saúde dos consumidores.

De maneira a realizar uma avaliação mais criteriosa dos resultados encontrados, um estudo da incerteza de medição foi realizado (Fig.17).

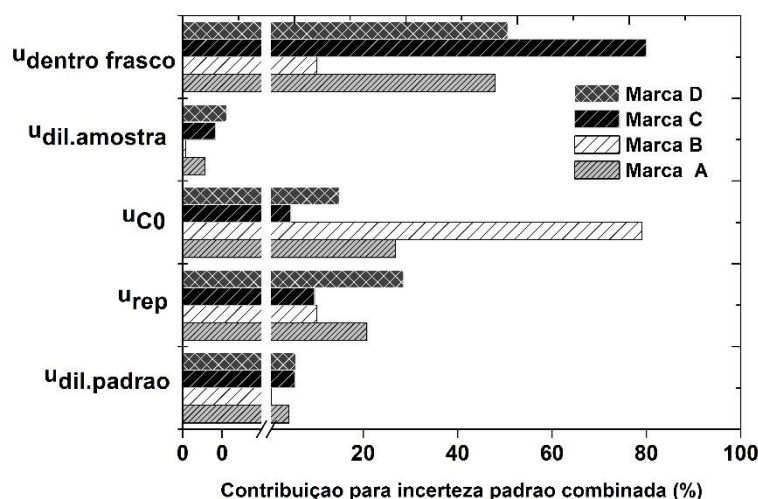


Figura 17: Contribuição das fontes individuais de incerteza.

* $u_{dentro\ frasco}$: representa a variação entre os comprimidos da mesma marca; $u_{dil\ amostra}$: diluição da amostra; u_{C0} : Fração mássica de Se na solução analítica; u_{rep} : Repetibilidade instrumental; $u_{dil\ padrão}$: diluição dos padrões.

Nesse estudo a incerteza combinada é fracionada em suas componentes individuais tornando possível a avaliação da contribuição individual de cada fonte de incerteza para o resultado final. Como podem ser observadas na Figura 17, as marcas C e D apresentaram maior variabilidade entre os comprimidos contribuindo com aproximadamente 50% e 80%, respectivamente, para o valor da incerteza de medição.

Em geral a contribuição das fontes de incerteza referentes ao método analítico não contribuíram de maneira significativa para o resultado final, exceto

para o suplemento alimentar da marca B, no qual a fração mássica de selênio na solução analítica - u_{Co} , contribuiu com aproximadamente 80% do valor da incerteza, principalmente por que nesta amostra, a concentração de Se foi relativamente baixa.

Apesar do fato dos resultados encontrados para as amostras analisadas estarem em conformidade com a legislação, a significativa variação entre os frascos, próximo a 20%, ressalta a necessidade de um controle mais rigoroso no processo de produção dos suplementos alimentares, uma vez que, além da estreita faixa entre a essencialidade e a toxicidade, a regulamentação para os suplementos alimentares é menos rígida que as leis que regulamentam a prescrição de medicamentos.

4.2.

Determinação de selênio total em suplemento alimentar por ICP-MS do tipo quadrupolo com célula de reação dinâmica (DRC II) (por diluição isotópica)

Para determinação da razão isotópica de selênio foi realizada a otimização da célula de reação dinâmica empregando amônia como gás de reação. Essa otimização foi necessária uma vez que as condições operacionais da célula de reação encontradas para determinação de selênio total utilizando amônia como gás de reação não forneceram uma medição confiável da razão isotópica. Atribuímos isso à possível diferença nas reações entre o gás de reação e os diferentes isótopos de selênio gerando um “fracionamento isotópico” instrumental.

Para tal, foi realizado um planejamento composto central tendo como variáveis a vazão do gás de reação e o parâmetro de rejeição q , segundo a matriz de experimento apresentado na Tabela 13. Os experimentos foram realizados de forma aleatória para minimizar possíveis efeitos de tendências nos resultados obtidos. Um parâmetro a ser definido de forma criteriosa na elaboração de planejamentos experimentais é a resposta a ser avaliada, uma vez que ela pode induzir a uma avaliação equivocada baseada nos resultados obtidos. Nesse trabalho, o erro médio (Em) entre os diferentes isótopos de selênio ($^{74}Se/^{80}Se$, $^{76}Se/^{80}Se$, $^{77}Se/^{80}Se$, $^{78}Se/^{80}Se$, $^{82}Se/^{80}Se$) foi escolhido como resposta experimental, erro este, obtido pela comparação entre as razões obtidas pelas abundâncias documentadas pela IUPAC e as obtidas experimentalmente

mediante a razão das intensidades obtidas pelo ICP-MS para os referidos isótopos.

Tabela 13: Matriz de experimentos para planejamento composto central

Experimentos	NH ₃ (mL min ⁻¹)	Rpq	Erro médio(%)
1	0,50	0,35	3,30%
2	0,90	0,35	2,97%
3	0,50	0,55	2,68%
4	0,90	0,55	1,32%
5	0,70	0,31	4,56%
6	0,70	0,59	2,28%
7	0,42	0,45	2,30%
8	0,98	0,45	4,58%
9 (PC)	0,70	0,45	2,02%
10 (PC)	0,70	0,45	2,32%
11 (PC)	0,70	0,45	2,05%
12 (PC)	0,70	0,45	1,57%
13 (PC)	0,70	0,45	2,02%
14 (PC)	0,70	0,45	2,14%

*PC = Ponto central

A partir dos dados apresentados na Tabela 13 foi construída uma superfície de resposta (Figura 18) da qual se pode avaliar o comportamento da resposta experimental (erro médio) em função das variáveis operacionais da célula de reação (vazão de amônia e Rpq).

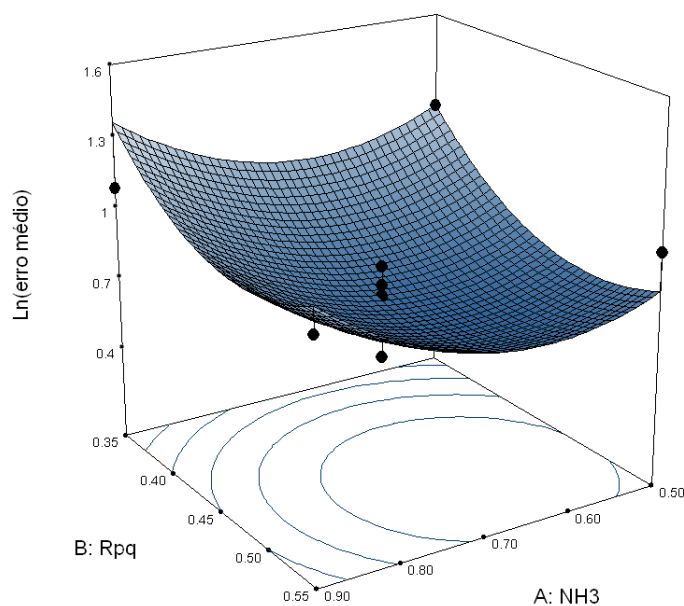


Figura 18. Superfície de resposta do planejamento composto central

Como se pode observar na Figura 18, existe uma região de mínimo para o erro médio situado a uma vazão de amônia entre 0,6 e 0,7 mL min⁻¹ e Rpq entre 0,45 e 0,55.

Para avaliar a robustez e a qualidade estatística do modelo matemático que rege a superfície de resposta, foram realizados alguns testes estatísticos. Primeiramente foram avaliadas diferentes transformações matemáticas (logaritmo natural, Logaritmo decimal e radiciação) da resposta observada (erro médio), uma vez que a utilização dos dados brutos produziu um modelo matemático com ajuste estatístico não adequado. A transformação que apresentou maior robustez estatística foi a logaritmo natural, do qual se obteve o modelo matemático a seguir:

$$\ln Em = 8,315 - 7,503NH_3 - 21,420R_{pq} \times 1,315NH_3R_{pq} \times 5,323NH_3^2 \times 20,986R_{pq}^2$$

A partir do gráfico de probabilidade acumulada dos resíduos, apresentado na Figura 19, pode-se avaliar a normalidade dos resíduos deixados pelo modelo matemático obtido pelo método da superfície de resposta. A interpretação desse gráfico baseia-se na avaliação do comportamento dos resíduos frente a uma linha ajustada por uma distribuição normal. Como pode ser observado na Figura 19 os resíduos apresentaram bom ajuste com a “linha normal” sendo um indício da normalidade dos dados.

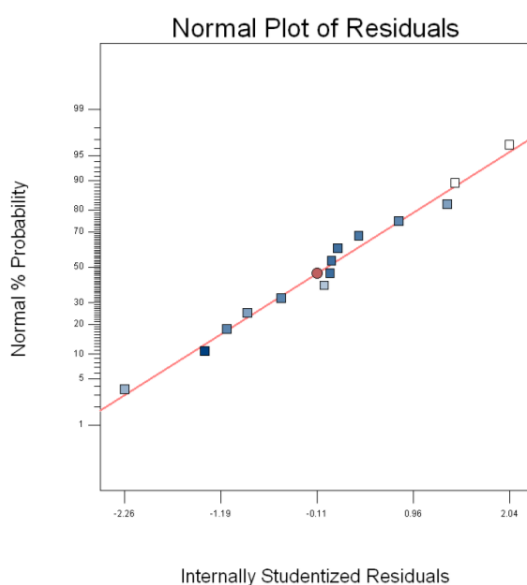


Figura 19. Gráfico de probabilidade acumulada dos resíduos da superfície de resposta

Com a normalidade dos dados demonstrada pelo gráfico de probabilidade acumulada, realizou-se o teste de ANOVA (Tabela 14) para avaliar a adequabilidade estatística do modelo matemático em termos da falta de ajuste do modelo.

Tabela 14: Teste de ANOVA do modelo matemático da superfície de resposta

ANOVA					
Fonte	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	Valor p
Modelo	0.917	5	0.183	4.729	0.026
NH ₃	0.094	1	0.094	2.418	0.156
Rpq	0.208	1	0.208	5.357	0.049
NH ₃ x Rpq	0.003	1	0.003	0.071	0.796
NH ₃ ²	0.335	1	0.335	8.631	0.018
Rpq ²	0.325	1	0.325	8.384	0.020
<i>Residual</i>	0.310	8	0.039		
<i>Falta de Ajuste</i>	0.225	3	0.075	4.363	0.07
<i>Erro Puro</i>	0.086	5	0.017		

Como pode ser observado na Tabela 14 o modelo matemático apresentou significância estatística apresentando um valor de p de 0,026, portanto $p < 0,05$, dessa forma, a contribuição da média quadrática dos resíduos não apresentou significância estatística diante da média quadrática do modelo ($MQ_{\text{modelo}}=0,183$).

Ainda de acordo com o teste de ANOVA, as variáveis que apresentaram significância estatística segundo o critério de avaliação valor $p < 0,05$ foram os termos quadráticos da vazão do gás de reação (NH₃²; MQ=0,335) e do parâmetro de rejeição q (Rpq²; MQ=0,335), além do termo linear do parâmetro de rejeição (Rpq; MQ=0,208).

Os resíduos deixados por um modelo matemático são compostos por um componente aleatório (erro puro) e um componente sistemático (falta de ajuste). Um modelo ideal é por definição, aquele que não possui o componente sistemático sendo os resíduos deixados por este, expressão da variação puramente aleatória que é característico do processo de medição.

Dessa forma, a avaliação criteriosa deste componente, a falta de ajuste, é essencial para obtenção de um modelo idealmente ajustado aos dados reais. Essa avaliação pode ser realizada mediante o teste de ANOVA no qual a significância estatística da “Falta de Ajuste” deve ser realizada pelo critério valor $p > 0,05$. Como pode ser observado na Tabela 14 a falta de ajuste do modelo apresentou um valor

de $p = 0,07$, tornando a equação obtida pela regressão linear dos dados brutos obtidos pelo planejamento composto central um modelo ajustado e adequado para a estimativa dos parâmetros operacionais da célula de reação dinâmica.

Considerando os testes estatísticos realizados para avaliar os dados obtidos pelo planejamento composto central, o modelo matemático obtido pela superfície de resposta foi considerado estatisticamente significativo e adequado para predição das condições operacionais da célula de reação dinâmica para minimizar o erro médio na determinação da razão isotópica por ICP-MS.

A determinante de Hessian (H) foi estimada de acordo com a equação matricial 31 para determinar os pontos críticos da superfície de resposta, que representam os valores otimizados para vazão de amônia (gás de reação) e Rpq:

$$H = \begin{vmatrix} \frac{\partial \ln Em}{\partial Rpq} & \frac{\partial \ln Em}{\partial NH_3 Rpq} \\ \frac{\partial \ln Em}{\partial Rpq NH_3} & \frac{\partial \ln Em}{\partial NH_3} \end{vmatrix} \quad \text{Eq.31}$$

Resolvendo esta equação obtêm-se:

$$H = \frac{\partial \ln Em}{\partial Rpq} \times \frac{\partial \ln Em}{\partial NH_3} - \frac{\partial \ln Em}{\partial NH_3 Rpq} \times \frac{\partial \ln Em}{\partial Rpq NH_3} \quad \text{Eq.32}$$

Se o valor encontrado para a determinante de Hessian for maior do que zero ($H > 0$), a superfície de resposta possui um ponto crítico que representa um valor mínimo e se $H < 0$ a superfície de resposta apresenta um ponto crítico que representa um valor máximo.

Aplicando a determinante de Hessian no modelo matemático da superfície de resposta obtida pelo planejamento composto central encontrou-se um $H > 0$, ou seja, a superfície de resposta apresenta um valor crítico de mínimo. A primeira derivada da equação da superfície de resposta foi igualada a zero para encontrar o ponto crítico, como segue:

$$\frac{\partial \ln Em}{\partial Rpq} = 0 \rightarrow 0,48 \quad \text{Eq.33}$$

$$\frac{\partial \ln Em}{\partial NH_3} = 0 \rightarrow 0,58 \text{ mL min}^{-1} \quad \text{Eq. 34}$$

Os pontos críticos que representam as condições operacionais da célula de reação otimizada foram encontrados resolvendo as primeiras derivadas, sendo a vazão de amônia e R_{pq} , 0,58 mL min⁻¹ e 0,48, respectivamente.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados para razão isotópica empregando as condições otimizadas da célula de reação dinâmica.

Tabela 15: Razão isotópica de selênio obtida por DRC-ICP-MS

Isótopos	Abundância natural (IUPAC)	Razão teórica		Razão experimental	Erro (%)
74	0,89	74/80	0,0179	0,0149	16,53
76	9,37	76/80	0,1888	0,1675	11,30
77	7,63	77/80	0,1538	0,1395	9,30
78	23,77	78/80	0,4791	0,4476	6,56
82	8,73	82/80	0,1759	0,1891	7,47

Como se pode observar, o erro percentual (em módulo) obtidos pela relação entre as razões teóricas (obtidas empregando dados de abundância isotópicas disponibilizadas pela IUPAC) e as razões obtidas experimentalmente foram na faixa de 6,56% a 16,53%.

Os dados apresentados na Tabela 15 foram corrigidos para possíveis interferências espectrais, a saber, a formação de hidretos de selênio, e para o tempo morto do detector, porém a influência da discriminação de massas não foi contemplada. Dessa forma, para avaliar sua influência, foi realizada a correção dos sinais analíticos considerando o efeito da discriminação de massas empregando o modelo exponencial (equação 19). O resultado pode ser observado na Figura 20 sendo o coeficiente angular uma estimativa desse efeito.

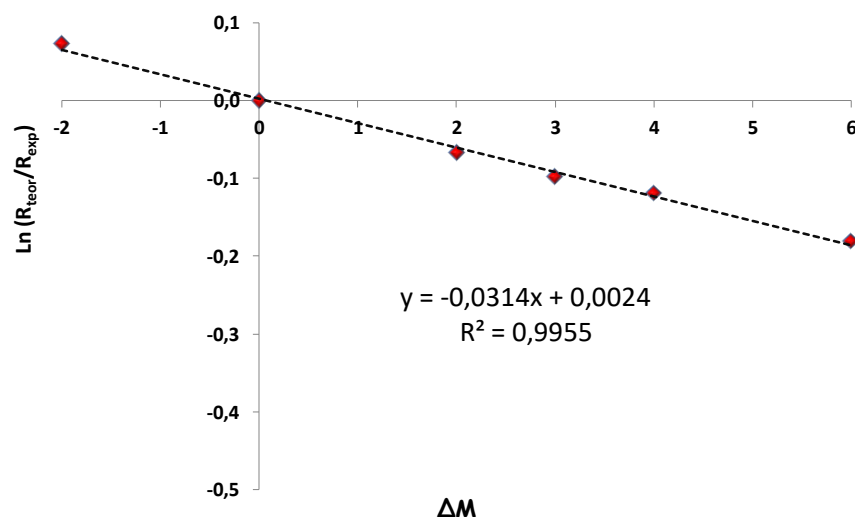


Figura 20. Estimativa do efeito da discriminação de massas por DRC-ICP-MS

O fator de discriminação de massas (coeficiente angular do modelo logarítmico) foi utilizado para obtenção das razões isotópicas corrigidas de acordo com a equação 19 e os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Razão isotópica de selênio por DRC-ICP-MS considerando o efeito da discriminação de massas

Isótopos	Abundância Natural	Razão teórica	Razão Corrigida	Erro (%)
74	0,89	74/80 0,0179	0,0184	2,85%
76	9,37	76/80 0,1888	0,1916	1,45%
77	7,63	77/80 0,1538	0,1540	0,14%
78	23,77	78/80 0,4791	0,4777	-0,30%
82	8,73	82/80 0,1759	0,1779	1,12%

Como pode ser observado na Tabela 16, o erro percentual da medida da razão isotópica apresentou uma redução expressiva em relação ao experimento que não considerou a discriminação de massas como fonte de erro analítico. Os valores obtidos no experimento sem a correção da discriminação de massas apresentaram um erro médio de aproximadamente 10% enquanto que com a correção esse valor foi reduzido para aproximadamente 1% evidenciando assim a importância de se considerar a discriminação de massas como uma importante fonte de erro durante a determinação de razões isotópicas em ICP-MS.

Adicionalmente aos estudos de medição da razão isotópica empregando as correções mencionadas anteriormente, foi realizado um experimento com

objetivo de avaliar o comportamento do erro médio das razões isotópicas em função da fração mássica de selênio na solução analítica (Figura 21).

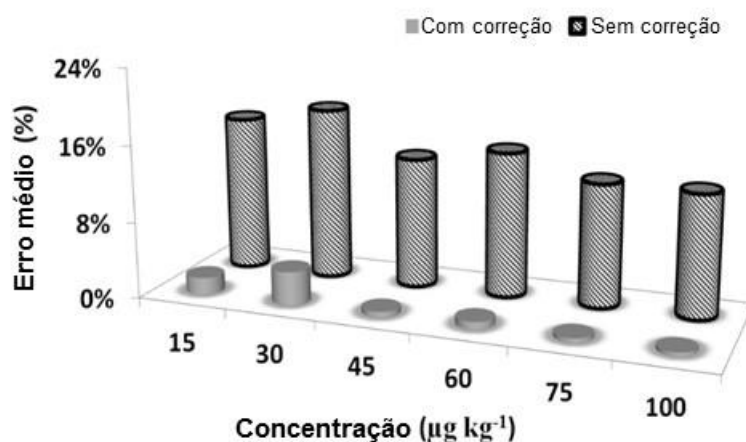


Figura 21. Influência da concentração da solução analítica sobre o erro médio na determinação da razão isotópica

Como se pode observar na Figura 21 o erro médio relacionado à medida da razão isotópica apresentou uma redução de aproximadamente 78% ao se aumentar a concentração da solução analítica de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ para $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, evidenciando assim, que para obtenção de erros analíticos menores, concentrações próximas a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ são preferíveis considerando a incerteza do processo de medição.

4.2.1. Validação e aplicação analítica

O método otimizado foi utilizado para análise de selênio em amostras de suplemento alimentar por diluição isotópica e o material de referência certificado SELM-1 foi usado para avaliar a exatidão do método desenvolvido.

A adição da solução de padrão às amostras para análise por diluição isotópica foi realizada de maneira a se obter o menor erro possível considerando o fator de propagação de erro apresentado na Figura 22. Aplicando a equação 21 foi possível estimar a razão isotópica na mistura para obter o erro mínimo sendo essa razão, R_m , igual a 0,3.

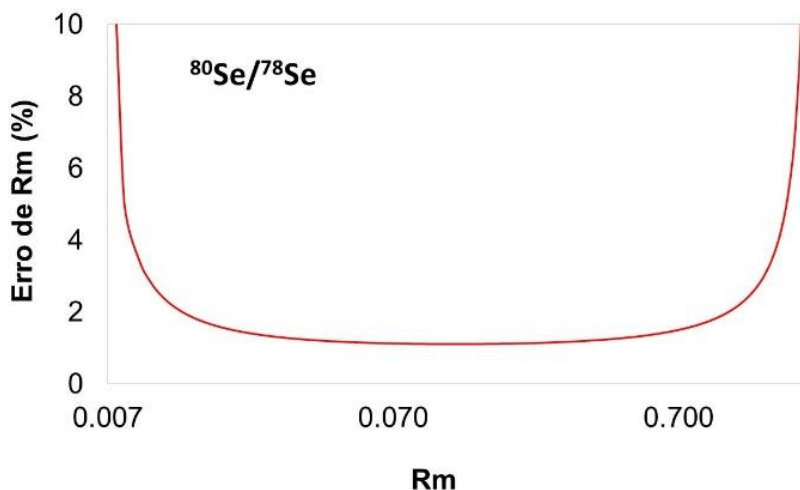


Figura 22: Fator de propagação de erro empregando um padrão de selênio isotópico enriquecido em ^{78}Se .

A incerteza de medição foi obtida empregando a lei de propagação de erros e para isso, as derivadas parciais da equação da diluição isotópica foram obtidas pelo software R.

$$C_x = C_s \left(\frac{W_s}{W_x} \right) \frac{M_{nat}}{M_{ref}} \left(\frac{R_{exp} f A_s - B_s}{B_x - R_{exp} f A_x} \right) \quad Eq. 7$$

A expressão geral para obtenção da incerteza combinada é:

$$u_{Cx} = \sqrt{\left(\frac{\partial C_x}{\partial C_s} \right)^2 u_{Cs}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_s} \right)^2 u_{Ws}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_x} \right)^2 u_{Wx}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial M_{nat}} \right)^2 u_{Mnat}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial M_{ref}} \right)^2 u_{Mref}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial R_{exp}} \right)^2 u_{Rexp}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial f} \right)^2 u_f^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_s} \right)^2 u_{As}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial B_s} \right)^2 u_{Bs}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial B_x} \right)^2 u_{Bx}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right)^2 u_{Ax}^2} \quad Eq35$$

A incerteza expandida foi obtida pela multiplicação da incerteza combinada (u_{cx}) pelo fator de abrangência, $k=2$ para um nível de confiança de 95%. Na Tabela 17 é apresentado os resultados obtidos para análise de do MRC Selm-1.

Tabela 17: Exatidão e incerteza relativa do método para a determinação de Se total por diluição isotópica usando ICP-MS do tipo quadrupolo com DRC II

Valor obtido (mg kg ⁻¹)	Valor certificado MRC Selm-1 (mg kg ⁻¹)	Exatidão (%)	$ x_{ref} - x_{meas} $	$k \sqrt{u_{ref}^2 + u_{meas}^2}$
2040 ± 18	2059 ± 64	99%	19	64

Como pode ser observado na Tabela 17, o método proposto apresentou uma boa concordância estatística com o valor certificado com uma exatidão de 99% e uma incerteza relativa de aproximadamente 0,9%.

A equação 36 (LINSINGER, 2010) foi usada para avaliar a semelhança estatística entre o valor obtido para o MRC (2040 ± 18 mg kg⁻¹) e o valor certificado (2059 ± 64 mg kg⁻¹).

$$|x_{ref} - x_{meas}| \leq k \sqrt{u_{ref}^2 + u_{meas}^2} \quad Eq. 36$$

Onde:

x_{ref} = Valor de referência (CRM Selm-1)

x_{meas} = Valor encontrado nesse trabalho

k = Fator de abrangência (CRM Selm-1)

u_{ref} = Incerteza padrão combinada do CRM

u_{meas} = incerteza padrão combinada do método

Como pode ser visto na Tabela 17 o critério de aceitação foi atendido sendo o resultado obtido considerado concordante com o valor certificado.

O emprego da lei de propagação de erros para estimativa da incerteza de medição permitiu a estratificação das fontes individuais de incerteza facilitando a interpretação e identificação dos parâmetros mais impactantes sobre o resultado final.

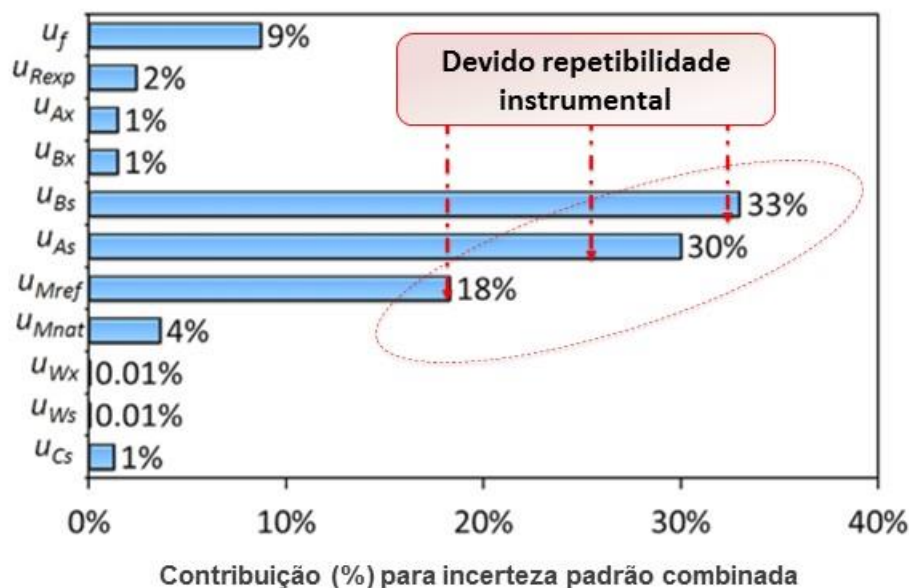


Figura 23: Contribuição relativa das fontes individuais de incerteza sobre a incerteza padrão combinada

Como pode ser observado na Figura 23, as fontes de incerteza que mais contribuíram para o valor da incerteza global foram as incertezas das abundâncias de ^{78}Se (A_s), ^{80}Se (B_s) e a massa atômica do padrão enriquecido isotopicamente (M_{ref}) que representaram 81% da incerteza combinada. Esse fato pode ser atribuído a repetibilidade instrumental uma vez que esses parâmetros foram determinados experimentalmente.

O método desenvolvido foi usado para determinação de selênio total em suplemento alimentar de seis marcas comerciais distintas obtidas no comércio local e os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Fração mássica de selênio em suplemento alimentar. Resultados expressos como média \pm incerteza expandida ($k=2$; $p=0,05$)

Amostra	Fração mássica de	
	selênio (μg)	Discrepância em
Valor informado no rótulo entre parênteses	Incerteza relativa entre parênteses	relação ao rótulo (%)
Marca E (20 μg)	33 ± 5 (15%)	+ 65%
Marca F (34 μg)	25 ± 1 (4%)	- 26%
Marca G (20 μg)	54 ± 2 (4%)	+ 170%
Marca H (100 μg)	157 ± 59 (38%)	+ 57%
Marca I (34 μg)	44 ± 5 (11%)	+ 29%
Marca J (34 μg)	32 ± 1 (3%)	- 6%

Os resultados encontrados nas amostras de suplementos alimentares apresentaram uma grande discrepância em comparação ao valor informado no rótulo. De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2003), a discrepância máxima permitida não pode exceder a 20% e observando esse limite crítico apenas uma amostra (Marca J) atendeu a esse critério apresentando uma discrepância de -6% em relação ao valor informado no rótulo.

Embora as amostras analisadas neste trabalho apresentem uma fração mássica de selênio maior do que o informado no rótulo, elas não representam um potencial risco para o consumidor, uma vez que o teor de selênio nessas amostras foram inferiores ao limite máximo de tolerância de 400 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (REID et al., 2004). Deve-se considerar o número de comprimidos ingeridos ao dia, para não ultrapassar a tolerância, quando os sintomas relacionados à toxicidade de selênio começam a aparecer.

Esses resultados reforçam a importância de um controle de qualidade rigoroso no processo de produção desses suplementos alimentares.

Infelizmente outros casos de suplementos alimentares com problemas de formulação são reportados na literatura. MacFarquhar e colaboradores (MACFARQUHAR et al., 2010) reportaram uma intoxicação aguda de 201 pessoas pela ingestão de um suplemento alimentar que possuía a real concentração de selênio superior a 200 vezes a informada no rótulo, de acordo com os laboratórios da FDA. As pessoas expostas a essa intoxicação apresentaram uma série de sintomas entre eles diarreia, fadiga, perda de cabelo, dor nas juntas, descoloração ou perda de brilho nas unhas, náusea entre outros.

Em 2002, Valiente e colaboradores (VALIENTE et al., 2002) publicaram um estudo comparativo com 15 amostras de suplementos alimentares, e, nesse trabalho, foi encontrada uma discrepância em relação ao valor informado no rótulo entre -50% e +224%.

4.3.

Especiação de selênio em suplemento alimentar por HPLC-ICP-MS

Sabe-se que a obtenção de informações referentes à concentração total de selênio em amostras de suplemento alimentar é de extrema importância, uma vez que através dela pode-se avaliar a ingestão da quantidade total desse elemento essencial e consequentemente verificar se as necessidades nutricionais

são cumpridas. Entretanto, informações sobre a espécie química presente nessas amostras também é relevante tendo em vista que diferentes espécies químicas apresentam diferentes biodisponibilidades para o organismo, além de permitir avaliar a adequação do suplemento ao que é informado no rótulo e avaliar a presença de substâncias não declaradas.

Para tanto, o HPLC foi acoplado ao ICP-MS modelo NeXion 300X para realizar a análise de especiação de selênio nas amostras de suplemento alimentar, utilizando as condições experimentais apresentadas na Tabela 2 com metano como gás de reação. A separação das espécies de selênio foi realizada utilizando a coluna de troca aniônica forte PRP-X100 e citrato de amônio 1×10^{-2} mol/L (pH=5) como fase móvel, de acordo com procedimento desenvolvido por (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2012).

Aproximadamente 0,1 g das amostras de suplemento alimentar (E, G, H, amostras ricas em selenito e selenato de sódio) foram ressuspendidas em 2 mL de água tipo I e submetidas à extração em banho ultrassom por 3 horas. As amostras F, I e J (amostras a base de levedura) foram submetidas à extração proteolítica utilizando a enzima protease XIV, conforme metodologia descrita no item 4.2.1.

Na Figura 24 pode ser visto a separação dos padrões de selênio utilizados nesse trabalho, a saber, selenito de sódio, selenato de sódio e selenometionina.

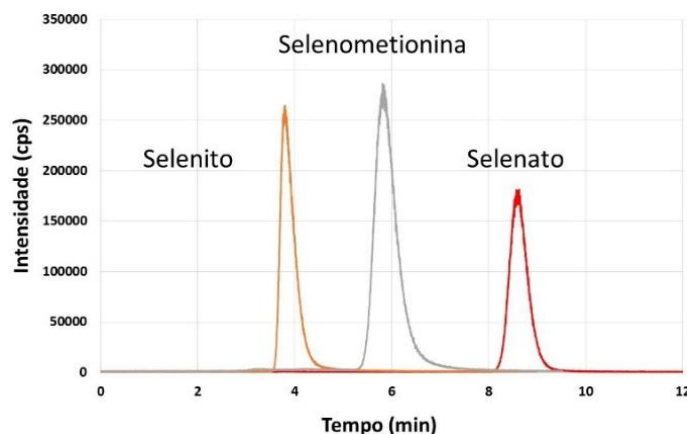


Figura 24: Separação cromatográfica dos padrões: selenito de sódio, selenato de sódio e selenometionina

As amostras de suplemento alimentar foram submetidas à análise de especiação e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 25.

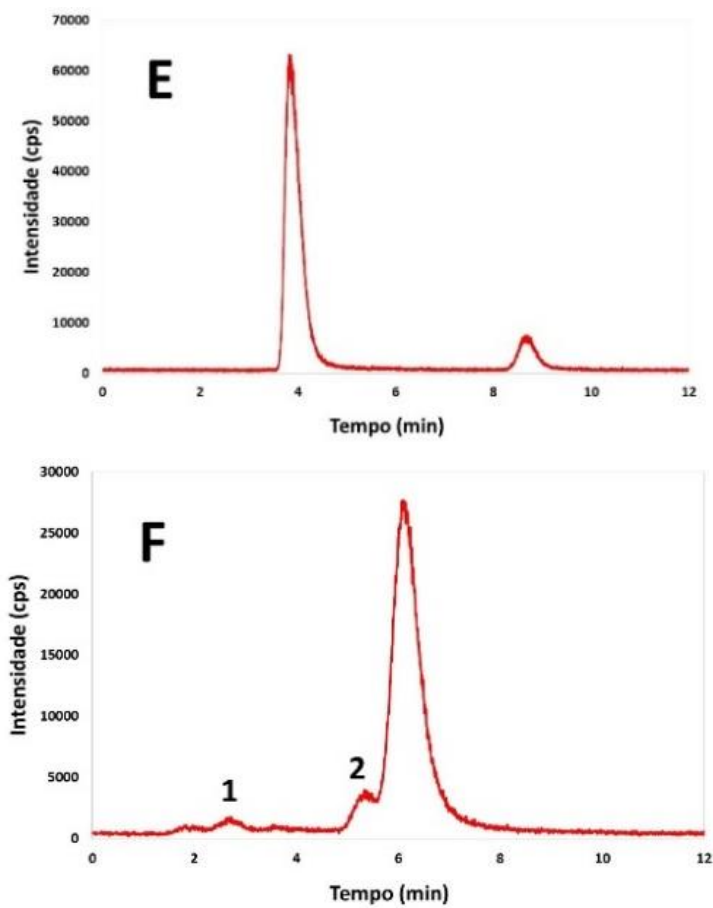


Figura 25: Especificação das amostras de suplemento alimentar (continua)

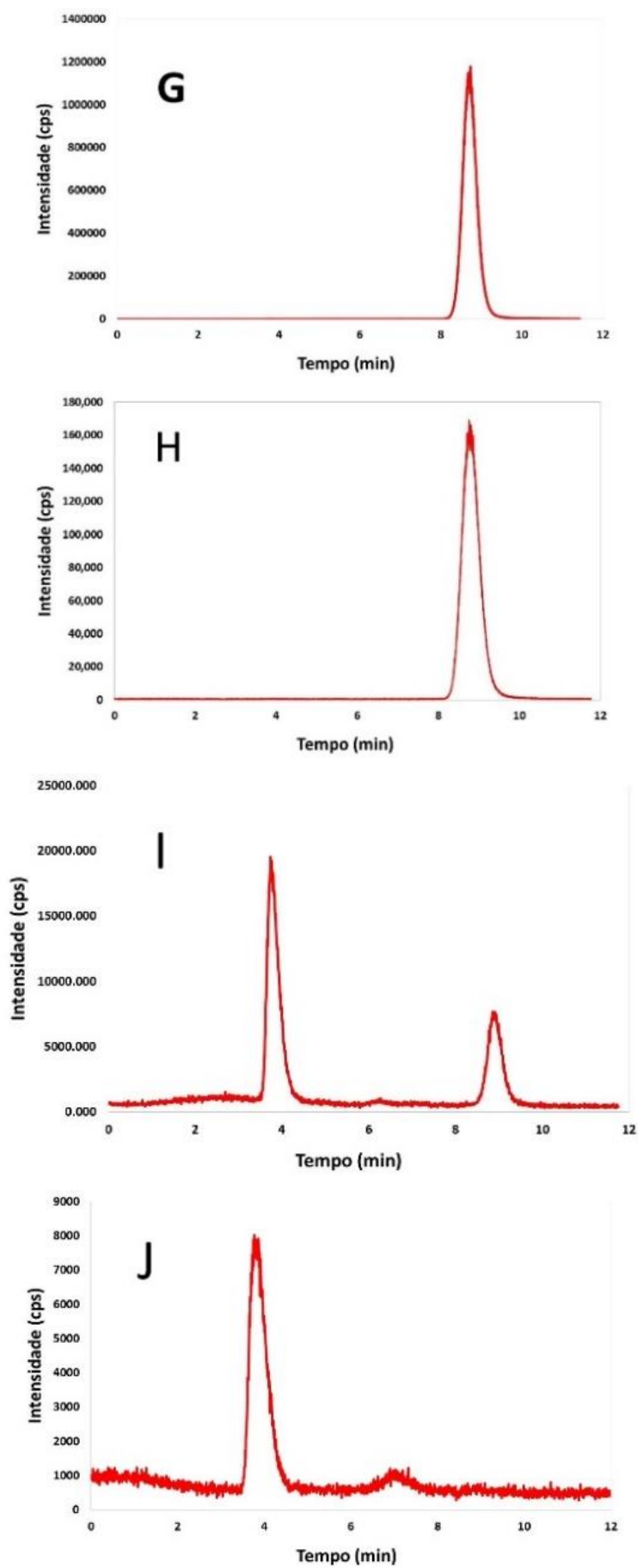


Figura 25: Especificação das amostras de suplemento alimentar

Os perfis cromatográficos das amostras comerciais, obtidos pelos dois procedimentos de extração (água tipo I e protease XIV), apresentaram diferentes de espécies de selênio. Comparando com os tempos de retenção dos padrões pode-se atestar a presença de selenito (amostras E, I e J), selenato (amostras E, G, H e I) e selenometionina (F).

Na Tabela 19 é apresentada uma comparação entre as espécies encontradas mediante análise de especiação e as espécies informadas no rótulo.

Tabela 19: Informações sobre as espécies de selênio informadas no rótulo dos suplementos alimentares

Amostra	Espécie/informação no rótulo	Espécie encontradas
Marca E	Selênio de sódio anidro	Selenito + selenato
Marca F	Selênio	Selenometionina
Marca G	Selenato de sódio	Selenato
Marca H	Selenato de sódio	Selenato
Marca I	Complexo selenoaminoácido	Selenito + Selenato
Marca J	Selênio	Selenito

Como pode ser observado na Tabela 19, algumas marcas não apresentam a informação exata em relação a espécie de selênio com a qual o suplemento alimentar foi produzido.

O rótulo da marca E não utiliza a nomenclatura oficial para informação da espécie presente utilizando o termo “selênio de sódio anidro” que, por análise de especiação apresentou como espécie majoritária o selenito ($t_R=4$ min) e uma espécie minoritária eluindo no tempo de retenção do selenato de sódio ($t_R\sim 8,5$ min). A presença de selenato nessa amostra pode ser devido à contaminação ou impureza no composto de selênio utilizado para produção do suplemento alimentar bem como ser resultado da interconversão do selenito a selenato, mediante oxidação no processo de extração da amostra.

A marca F trata-se de um suplemento alimento à base de levedura, que normalmente é utilizada como fonte de selênio em sua forma orgânica, selenometionina. O rótulo dessa amostra informa a presença de selênio sem informar a espécie presente, porém, mediante a análise do digerido proteolítico (protease XIV) por HPLC-ICP-MS foi possível identificar a selenometionina como espécie majoritária. Essa amostra apresentou um pequeno pico cromatográfico correspondente ao tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos (pico 1)

que pode corresponder ao óxido de selenometionina ou a selenometil-selenometionina, de acordo com (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2012; SILVA et al., 2013), e uma espécie desconhecida (pico 2) que eluiu próximo ao tempo de retenção da selenometionina (pico 3).

O perfil cromatográfico obtido para as marcas G e H confirmam a informação apresentada no rótulo, sendo o selenato a única espécie observada.

O fabricante da marca I informa no rótulo de seu suplemento que o selênio está na forma de “complexo selenoaminoácido”. Em um estudo recente sobre determinação de selênio em suplemento alimentar (KUBACHKA et al., 2017) menciona que essa nomenclatura é utilizada para espécies específicas que são consideradas como marcas registradas de propriedade do fabricante. Vale ressaltar que não há informação adicional sobre a espécie química presente nessa amostra. Entretanto, mediante análise cromatográfica não foi encontrada a selenometionina ($t_R \sim 6\text{min}$), o que a princípio era esperado por se tratar de um “complexo de aminoácido”, porém foram encontradas as espécies selenito (majoritária; $t_R \sim 4\text{ min}$) e selenato (minoritária; $t_R \sim 8,5\text{ min}$).

As informações presentes no rótulo da amostra J também não permitiram o prévio conhecimento da espécie de selênio com a qual o suplemento foi formulado, sendo a espécie selenito a forma química encontrada. Essa amostra se trata de um suplemento alimentar à base de levedura, onde se esperaria a selenometionina como espécie majoritária, porém apenas um pico muito pequeno pode ser observado, próximo ao tempo de retenção da selenometionina.

Apesar dos estudos realizados nesse trabalho representarem apenas uma pequena amostra de suplementos alimentares a base de selênio encontrados no comércio local, os resultados encontrados reforçam a necessidade de um controle de qualidade voltado tanto para os aspectos inerentes à legislação vigente (ANVISA), quanto a necessidade de estudos de especiação para comprovar a presença de contaminantes e/ou presença de espécies não declaradas no rótulo.

4.4. Produção e caracterização de levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se)

4.4.1. Produção da levedura

A cepa da *saccharomyces cerevisiae* foi inoculada nos meios de cultivo YMB, MAS I e MAS II com o intuito de se conhecer o perfil de crescimento e a influência destes meios sobre a viabilidade celular da levedura. Os resultados são apresentados na Figura 26 e na Tabela 20.

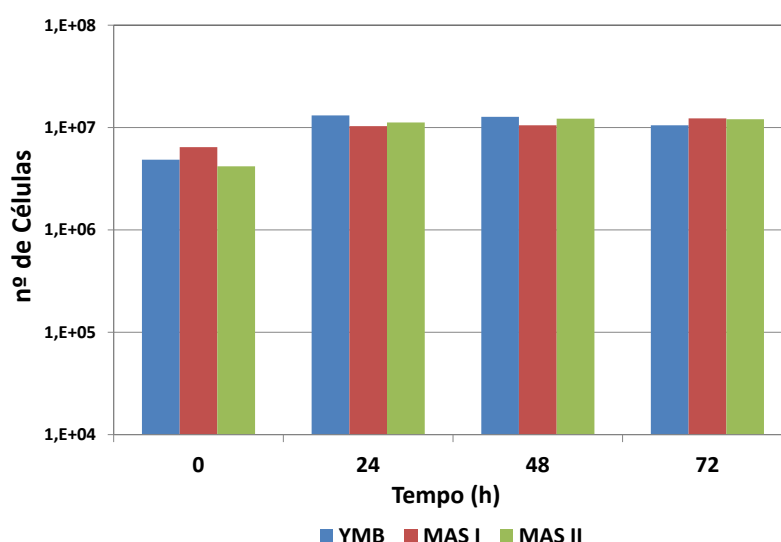


Figura 26: Avaliação do crescimento da levedura nos diferentes meios de cultivo

Tabela 20: Resultado do estudo de viabilidade celular da levedura em diferentes meios de cultivo.

Tempo (h)	YMB	MAS I	MAS II
0	97,5 %	98,5 %	99,0%
24	99,9 %	48,2 %	47,9 %
48	99,7 %	35,6 %	23,5 %
72	99,8 %	41,2 %	22,5 %

Como era de se esperar, nas primeiras horas de cultivo, as células de levedura apresentaram a maior taxa de crescimento atingindo seu máximo em 24h para os meios de cultivo estudados. Entretanto, quando se avalia a viabilidade celular (Tabela 20) pode-se observar que os meios de cultivo MAS I e MAS II foram prejudiciais para as células atingindo uma viabilidade celular de

aproximadamente 50% num período de 24h de cultivo chegando a aproximadamente 41% e 23% para os meios MAS I e MAS II, respectivamente após 72h de estudo.

Por apresentar bom desempenho em termos de crescimento celular e manutenção da viabilidade celular o meio de cultivo comercial YMB foi utilizado nos estudos subsequentes.

Existem na literatura informações sobre o processo de produção de levedura enriquecida em selênio e, de acordo com esses trabalhos a adição de selênio inorgânico (geralmente selenito de sódio) ao meio de cultivo deve ser realizado na etapa de crescimento exponencial (LEÓN et al., 2002). Assim, foi realizado um estudo do crescimento das células de levedura no meio de cultivo YMB para obter informação sobre o perfil cinético do crescimento celular, este, apresentado na Figura 27.

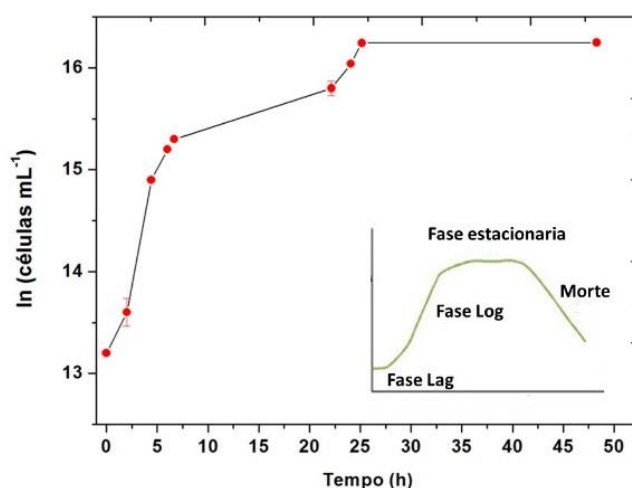


Figura 27: Estudo cinético do crescimento da levedura

Teoricamente a curva característica de crescimento de uma levedura apresenta quatro fases distintas, a saber, fase lag (adaptação), fase log (crescimento exponencial), fase estacionária e decaimento, como exemplificado no destaque da Figura 27.

Entretanto, o perfil cinético de crescimento da levedura não apresentou a fase lag iniciando diretamente na fase de crescimento exponencial. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que foi realizada uma inoculação prévia das células de levedura em tubo de polipropileno utilizando o mesmo meio de cultivo do estudo cinético. Essa etapa foi necessária para obter a contagem de células ($\sim 10^6$ células/mL) para o volume de meio de cultivo utilizado no estudo

cinético. Dessa maneira, a fase lag (adaptação) do crescimento das células de levedura ocorreu na etapa prévia ao estudo cinético.

Como mencionado anteriormente a adição de selênio ao meio de cultivo deve ser realizada na fase de crescimento exponencial utilizando selenito de sódio como fonte de selênio e, dessa forma, foi realizada uma etapa de pré-redução do padrão isotópico de selênio (^{78}Se) utilizando HCl à 80°C por 1h. Essa etapa foi necessária principalmente devido ao processo de solubilização do padrão isotópico (^{78}Se), que foi realizado mediante decomposição por HNO_3 , um ácido potencialmente oxidante.

A eficiência da pré-redução foi verificada por análise cromatográfica (HPLC-ICP-MS). A linha azul no cromatograma (Figura 28) representa a solução padrão de selenito de sódio e a linha preta representa a solução do padrão isotópico de selênio (^{78}Se), o qual passou pela etapa de pre-redução. De forma esperada, observou-se como única espécie do cromatograma, o selenito de sódio (t_R 25min).

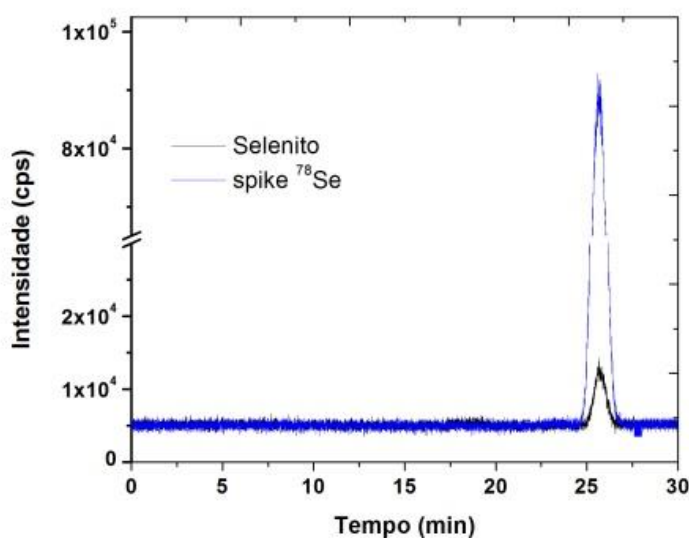


Figura 28: Perfil cromatográfico do padrão de selênio enriquecido

O procedimento para o enriquecimento da levedura com o padrão de selênio isotópico (^{78}Se) foi realizado como mostrado na Figura 29.

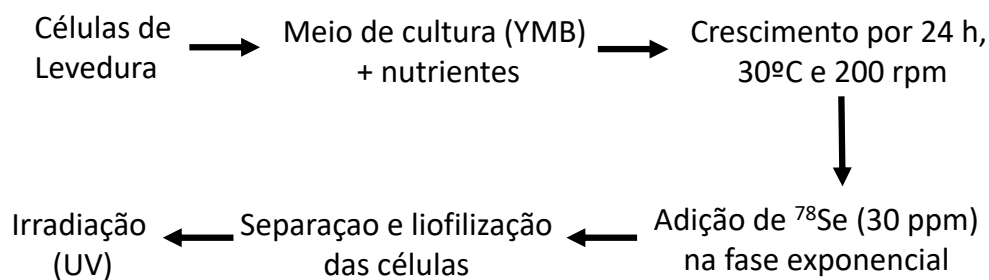


Figura 29: Procedimento para enriquecimento da levedura em ^{78}Se

Para a realização do enriquecimento isotópico uma colônia de células de levedura foi cultivada em 20 mL do meio de cultura YMB em tubo de polipropileno por 24h com o objetivo de se obter o número de células necessárias para o procedimento de enriquecimento com selênio. Após esse período, o conteúdo do tubo de polipropileno foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* de 2L contendo 1 L do meio de cultivo YMB.

Após as 24 h, foi adicionado padrão de selênio isotópico (^{78}Se) em quantidade suficiente para obtenção de uma concentração de 30 mg L^{-1} na solução final. O mesmo procedimento foi realizado em outro frasco, porém sem a adição do padrão isotópico sendo considerado o branco do processo.

Para avaliar se a adição do padrão isotópico ao meio de cultivo apresentou um impacto negativo sobre a viabilidade celular, foi realizada a medição desse parâmetro por citometria de fluxo sendo os valores encontrados 0,5% e 0,6% para os meios de cultivo sem adição de ^{78}Se e com adição de ^{78}Se , respectivamente, concluindo-se que a adição do padrão de selênio não influenciou no número de células vivas.

Após o período de 24h, as células de levedura foram separadas por filtração, lavadas três vezes com água Tipo I (aproximadamente 4°C) para eliminar o meio de cultivo e o selênio inorgânico possivelmente presente nas células. A seguir as células foram liofilizadas e deixadas sob radiação UV (280 nm) por 24 h para inativar sua atividade metabólica.

Uma avaliação prévia da incorporação de selênio pela levedura, foi realizada uma extração enzimática com protease (procedimento 4.2.1) utilizando HPLC-ICP-MS como pode ser observado na Figura 30.

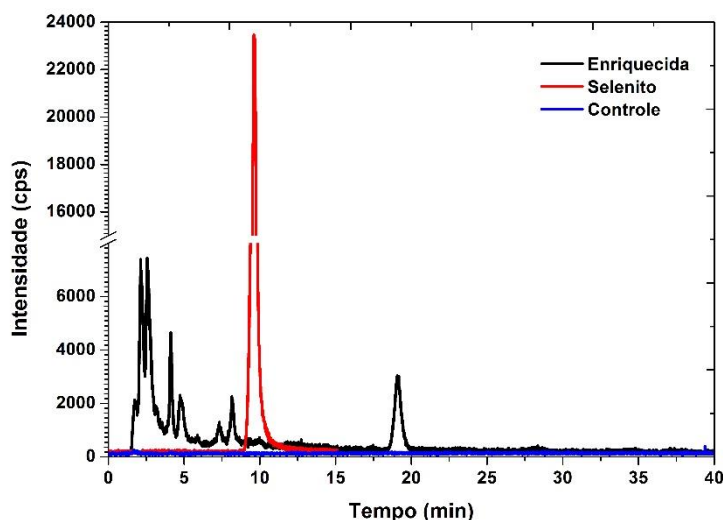


Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra de levedura após processo de enriquecimento. Coluna Luna C18; Fase Móvel: TBAAC 0,5 mM + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5 mM + 1% ACN

Na figura 30 é apresentado o cromatograma obtido para a levedura enriquecida em selênio (^{78}Se) e para a levedura sem adição de selênio (controle). Como pode ser observado a levedura foi capaz de converter o selênio inorgânico adicionado ao meio de cultivo na forma de selenito em diferentes espécies orgânicas de selênio.

4.4.2.

Caracterização da levedura enriquecida isotopicamente

4.4.2.1.

Determinação da distribuição isotópica e da concentração de Se total

ICP-MS (Quadrupolo Agilent 7700x)

A levedura enriquecida em selênio (^{78}Se) foi caracterizada em termos de distribuição isotópica, concentração de selênio total e selenometionina. Para tanto, foram utilizadas as condições operacionais apresentadas na Tabela 4.

A amostra de levedura enriquecida isotopicamente foi digerida com HNO_3 e H_2O_2 e diluída para uma concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. As intensidades obtidas foram corrigidas considerando as interferências espectrais da formação de SeH , efeito da discriminação de massas e tempo morto do detector. Essas intensidades foram convertidas em abundâncias de acordo com a equação 37:

$$A(\%) = \frac{R_i}{\sum R_i} \times 100 \quad \text{Eq.37}$$

Onde R_i representa as razões isotópicas ($^{74}\text{Se}/^{78}\text{Se}$; $^{76}\text{Se}/^{78}\text{Se}$; $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$; $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ e $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$).

Na Tabela 21 são apresentados os resultados obtidos para caracterização isotópica da levedura enriquecida.

Tabela 21: Composição isotópica da levedura enriquecida em ^{78}Se

Composição isotópica	
Isótopos	Abundância (%)
^{74}Se	$0,0020 \pm 0,0010$
^{76}Se	$0,0010 \pm 0,0008$
^{77}Se	$0,1698 \pm 0,0050$
^{78}Se	$99,4923 \pm 0,0197$
^{80}Se	$0,3303 \pm 0,0167$
^{82}Se	$0,0070 \pm 0,0032$
Massa Atômica	$78,005 \pm 0,017 \text{ g mol}^{-1}$

Após a caracterização isotópica da levedura enriquecida em termos de abundância isotópica, foi realizada a quantificação de selênio total por diluição isotópica utilizando um padrão isotópico de ^{74}Se .

A adição da solução de padrão às amostras para análise por diluição isotópica novamente foi otimizada observando o fator de propagação de erro apresentado na Figura 31. Para a análise por diluição isotópica da amostra de levedura enriquecida isotopicamente em ^{78}Se , optou-se por utilizar uma razão isotópica na mistura de 1.

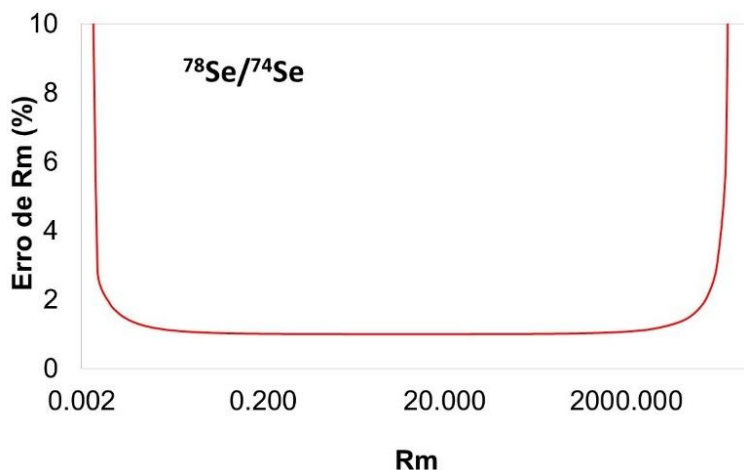


Figura 31: Fator de propagação de erro empregando um padrão de selênio isotópico enriquecido em ^{74}Se frente à amostra enriquecida isotopicamente em ^{78}Se

Como uma alternativa à determinação das razões isotópicas comumente empregadas em análise por diluição isotópica, a qual se baseia na aspiração da amostra de maneira contínua, buscou-se neste trabalho, um procedimento distinto com o objetivo de obter uma melhor estimativa da razão isotópica na solução *blend*. Esse procedimento consiste na aspiração das soluções analíticas de maneira alternada seguindo a ordem branco/amostra/branco. A representação gráfica dessa simulação é apresentada na Figura 32.

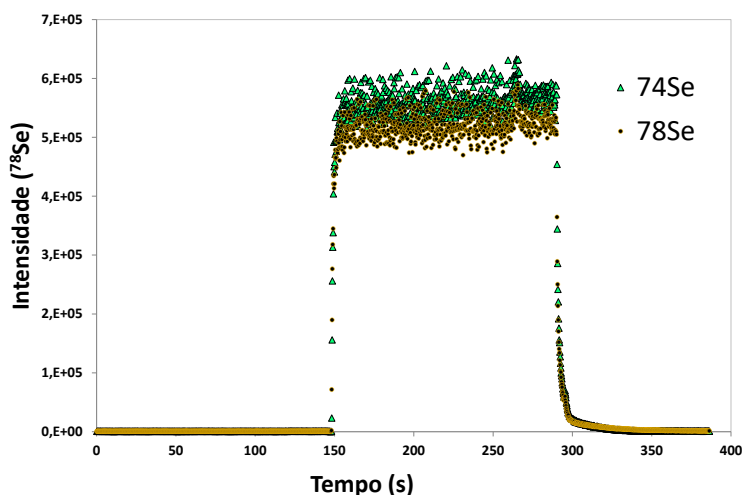


Figura 32: Simulação de sinal transiente para determinação da razão isotópica

De posse das intensidades apresentadas na Figura 32 realizou-se uma regressão linear entre a variável independente - intensidade do isótopo ^{78}Se (isótopo endógeno) e a variável preditora - intensidade do isótopo ^{74}Se (padrão isotópico de quantificação) através da qual foram obtidos os coeficientes de

regressão, sendo o coeficiente angular a razão isotópica na amostra, como pode ser observado na Figura 33.

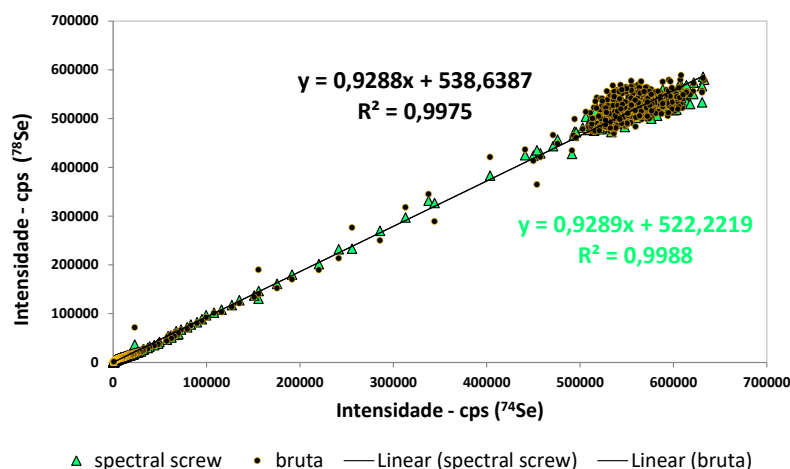


Figura 33: Regressão linear para determinação da razão isotópica por ICP-Q-MS

Uma das principais vantagens na determinação da razão isotópica empregando a regressão linear reside no fato de que os valores de incerteza obtidos por essa metodologia serem potencialmente inferiores ao método tradicional de medição da razão isotópica pois o erro do coeficiente angular da regressão linear é dependente do desvio padrão residual e este por sua vez é menor quanto maior for o número de pontos da regressão. Outro aspecto interessante nessa abordagem é a possibilidade de correção das interferências espectrais presentes no branco da amostra e de espécies de recombinação no plasma, a exemplo do dímero de argônio, uma vez que a presença dessas interferências não influencia o coeficiente angular da regressão.

O processo de aquisição de sinal pelo detector do ICP-MS quando se realiza experimentos em regime de sinal transiente, apresenta um efeito indesejado de dispersão dos dados reais obtidos em relação à linha de ajuste linear, como pode ser observado na Figura 33 (pontos negros). Esse fenômeno é denominado “*spectral skew*” que se caracteriza pela aquisição dos dados para dois ou mais isótopos medidos em tempos distintos, uma vez que o detector do ICP-MS não opera de maneira simultânea e sim sequencial rápida.

A correção desse efeito pode ser realizada por interpolação, normalizando os dados adquiridos no tempo T2 por um dado adquirido num tempo T1. Como resultado dessa interpolação obtém-se um melhor ajuste dos dados reais adquiridos pelo detector à linha de ajuste da regressão linear como pode ser observado na Figura 33 (triângulos verdes). Na tabela 22 são apresentados os

dados de regressão para a determinação da razão isotópica para a amostra de levedura utilizada para análise por diluição isotópica.

Tabela 22: Efeito da correção do *spectral skew* sobre a medida da razão isotópica

Parâmetros de regressão	Sem correção	Com correção
Coeficiente Angular	0,92883	0,92891
Erro	0,00107	0,00073
Erro (%)	0,12	0,08
Coeficiente linear	538,64	522,22
Erro	362,22	245,34
F	748632	1632063
S _{res}	2,93 x 10 ¹¹	1,34 x 10 ¹¹

O emprego da correção matemática do *spectral skew* não alterou significativamente a relação isotópica (coeficiente angular), porém resultou em redução do erro de medição desse parâmetro em aproximadamente 34%. Na Tabela 23 são apresentados os resultados da quantificação de selênio nas amostras de levedura.

Tabela 23: Fração mássica de selênio total por ICP-Q-MS (Agilent 7700). Resultados em mg kg⁻¹.

Replicas	ICP-Q-MS (Agilent 7700)
I	610
II	633
III	646
Média ±desvio padrão	630 ± 18
RSD	3%

ICP-MS (High resolution)

Outra abordagem que pode ser utilizada para quantificação de selênio por diluição isotópica é o emprego de regressão linear múltipla que permite realizar a correção interna de interferências espectrais como por exemplo ⁷⁹Br¹H sobre ⁸⁰Se, ⁸¹Br¹H sobre ⁸²Se, as interferências dos isótopos de argônio, a formação de SeH bem como a correção interna da discriminação de massas. A correção interna das

interferências espectrais bem como dos efeitos indesejados da discriminação de massas é realizada pela minimização do vetor erro da equação utilizada para a realização da regressão múltipla por mínimos quadrados (Eq. 38).

Além dessas possibilidades, essa abordagem possibilita realizar a discriminação entre os diferentes perfis isotópicos possivelmente presentes na amostra, a saber, selênio endógeno (abundância natural), selênio utilizado para a produção da levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se) e selênio utilizado como padrão isotópico para quantificação (^{74}Se).

Essas possibilidades tornam o emprego da equação matricial para quantificação por diluição isotópica uma alternativa atraente do ponto de vista analítico uma vez que as correções são realizadas na própria amostra sem a necessidade de um padrão externo.

A matriz utilizada neste trabalho é apresentada na equação 38. Essa equação matricial relaciona as abundâncias obtidas experimentalmente com as frações molares das espécies em estudo, nesse caso o traçador isotópico (^{74}Se), o selênio presente na amostra de levedura (^{78}Se) e as espécies interferentes Ar e Br.

$$\begin{bmatrix} {}^{74}\text{Ab} \\ {}^{75}\text{Ab} \\ {}^{76}\text{Ab} \\ {}^{77}\text{Ab} \\ {}^{78}\text{Ab} \\ {}^{79}\text{Ab} \\ {}^{80}\text{Ab} \\ {}^{81}\text{Ab} \\ {}^{82}\text{Ab} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} {}^{74}\text{Br} & {}^{74}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{75}\text{Br} & {}^{75}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{76}\text{Br} & {}^{76}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{77}\text{Br} & {}^{77}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{78}\text{Br} & {}^{78}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{79}\text{Br} & {}^{79}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{80}\text{Br} & {}^{80}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{81}\text{Br} & {}^{81}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \\ {}^{82}\text{Br} & {}^{82}\text{Ar} & {}^{74}\text{Se} & {}^{78}\text{Se} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_{\text{Se}}^{74} \\ X_{\text{Se}}^{78} \\ X_{\text{Ar}} \\ X_{\text{Br}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{74} \\ e^{75} \\ e^{76} \\ e^{77} \\ e^{78} \\ e^{79} \\ e^{80} \\ e^{81} \\ e^{82} \end{bmatrix} \quad \text{Eq.38}$$

Para utilizar a regressão linear múltipla para diluição isotópica faz-se necessária a conversão das razões isotópicas obtidas experimentalmente em abundâncias utilizando a seguinte relação: $A = R_i / \sum R_i$; onde A = abundância e R_i = razões isotópicas obtidas experimentalmente ($^{74}\text{Se}/^{74}\text{Se}$, $^{76}\text{Se}/^{74}\text{Se}$, $^{77}\text{Se}/^{74}\text{Se}$, $^{78}\text{Se}/^{74}\text{Se}$, $^{80}\text{Se}/^{74}\text{Se}$ e $^{82}\text{Se}/^{74}\text{Se}$).

As razões isotópicas foram obtidas utilizando o mesmo procedimento empregado para o ICP-Q-MS (Figura 34A) obtendo ajustes de regressão como o mostrado na Figura 34.

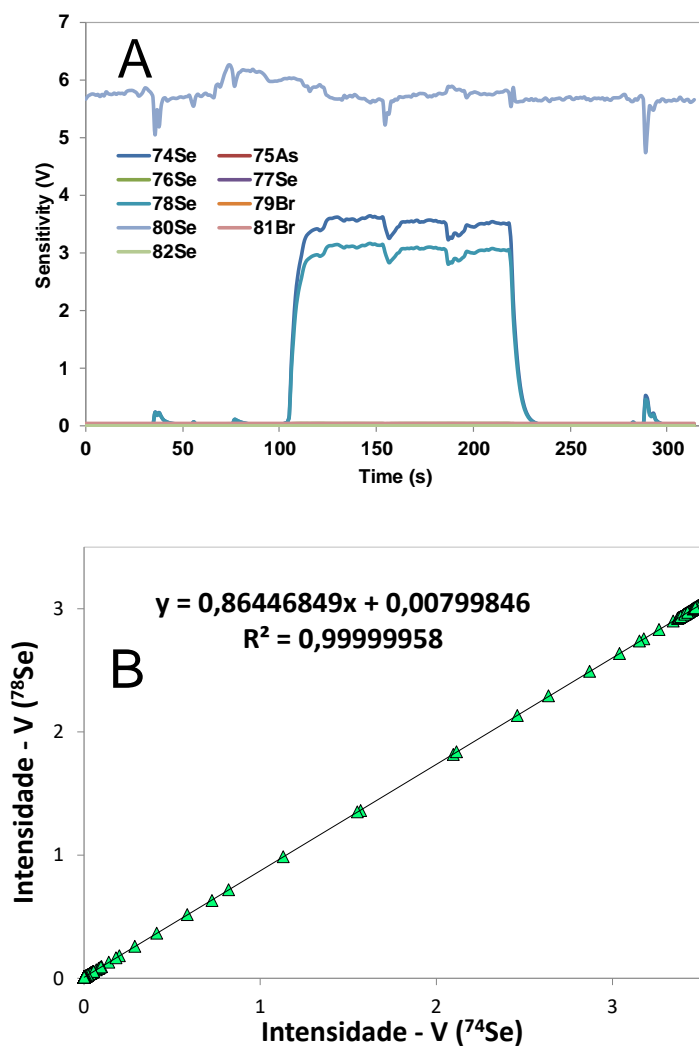


Figura 34: Regressão linear para determinação da razão isotópica por MC-ICP-MS

Como se pode observar na Figura 34 B o ajuste linear foi superior ao obtido pelo ICP-Q-MS resultando em incerteza de medição da razão isotópica de 0,004% (erro relativo do coeficiente angular). Esse melhor ajuste dos dados experimentais à linha de regressão deve-se principalmente ao fato de que o detector do MC-ICP-MS opera de maneira simultânea e além disso, não apresenta o efeito indesejável do *spectral skew* (aquisição dos dados para dois ou mais isótopos medidos em tempos distintos).

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos para a fração mássica de selênio total nas amostras de levedura enriquecida isotopicamente em ^{78}Se .

Tabela 24: Fração mássica de selênio total por ICP-Q-MS e MC-ICP-MS. Resultados expressados como média \pm U em mg kg⁻¹; $k=2$.

Amostra	MC-ICP-MS	ICP-Q-MS
I	669	610
II	645	633
III	620	646
Média \pm desvio padrão	645 \pm 24	630 \pm 18
RSD	4%	3%

Os resultados encontrados para a fração mássica de selênio total nas amostras de levedura enriquecida isotopicamente em ⁷⁸Se foram considerados estatisticamente semelhantes considerando a incerteza de medição dos resultados.

4.4.3.

Quantificação de selenometionina em levedura enriquecida isotopicamente (⁷⁸Se) por IDA espécie-específica e espécie-não específica usando HPLC-ICP-MS

Para determinação de selenometionina em amostras de levedura, geralmente tem-se utilizado a digestão enzimática mediante ação de uma enzima proteolítica como por exemplo a protease XIV. Essa enzima atua de maneira não específica rompendo as ligações peptídicas dos aminoácidos que compõe a estrutura proteica liberando, dessa maneira, a selenometionina.

Neste trabalho foi utilizado o procedimento de extração enzimática (item 4.2.1) para o tratamento de amostra para quantificação de selenometionina na amostra de levedura enriquecida. Para a extração enzimática foi pesada 0,25g de amostra de levedura seguindo-se a adição de 5 mL de solução extratora contendo 40 mg de protease. A solução resultante foi levada para um agitador orbital a 37°C por 16h e 200 rpm. Após a digestão enzimática a amostra foi centrifugada, filtrada e armazenada a -20°C para posterior análise.

A análise do extrato enzimático foi realizada utilizando o acoplamento HPLC-ICP-MS utilizando quatro estratégias de separação com emprego da diluição isotópica como método de quantificação, a saber:

1. *Cromatografia de fase reversa com quantificação por IDA espécie-não específica (Acetato de tetra-butil amônio como reagente de par iônico).*

2. *Cromatografia de troca aniônica forte com quantificação por IDA espécie-não específica.*
3. *Cromatografia de fase reversa com quantificação por IDA espécie-não específica (HFBA como reagente de par iônico).*
4. *Cromatografia bidimensional (2D) - fase reversa x troca aniônica forte com quantificação por IDA espécie-específica.*

4.4.3.1.

Cromatografia de fase reversa com quantificação por IDA espécie-não específica (Acetato de tetrabutyl amônio como reagente de par iônico)

As condições instrumentais bem como a composição da fase móvel utilizada no acoplamento HPLC-ICP-MS para a separação e quantificação de selenometionina na amostra de levedura enriquecida isotopicamente são apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25: Condições instrumentais para a determinação de selenometionina em levedura enriquecida isotopicamente (^{78}Se) por HPLC-ICP-MS

HPLC	
Coluna C18 Luna; Phenomenex	150 mm x 2 mm x 3 μ m
Pré-coluna; Phenomenex	4 mm x 2 mm
Fase móvel	Acetato de tetrabutyl amônio (0,05 mmol L ⁻¹); NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,5mmol L ⁻¹); ACN (1%)
Vazão	0,2 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L
Modo de eluição	Isocrático
ICP-MS (Agilent 7700x)	
Potência da rádio frequência	1500 W
Ar Principal	15 L min ⁻¹
Ar Auxiliar	1 L min ⁻¹
Ar Nebulizador	1,13 L min ⁻¹
H ₂	4 mL min ⁻¹
Cell exit	-19 V
Octapole bias	-13 V
QP bias	-12 V

O resultado da injeção do produto da extração enzimática do material de referência certificado SELM-1 é apresentado na Figura 35.

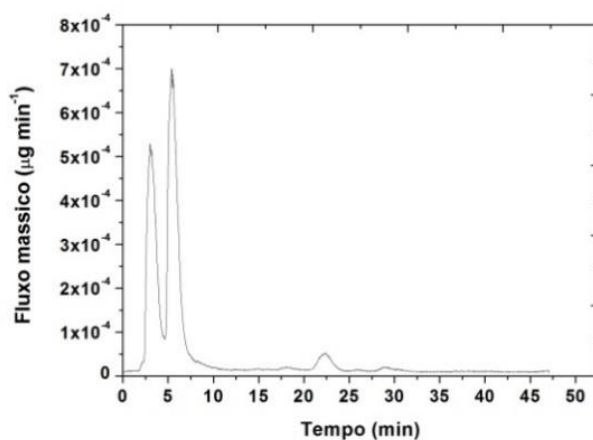


Figura 35: Perfil cromatográfico para extração enzimática do CRM SELM-1

Como pode ser observado na Figura 35 a extração enzimática do material de referência certificado resultou na presença de 2 picos cromatográficos majoritários sendo que 1 deles pode ser atribuído a selenometionina (~5min). A exatidão do procedimento de extração avaliada pelo valor obtido pela análise do material de referência certificado SELM-1 foi de aproximadamente 49%. A baixa exatidão encontrada pode ser atribuída a interconversão da selenometionina em sua forma oxidada, e, para contornar o problema, mercaptoetanol foi adicionado ao extrato enzimático a uma concentração final de 0,004% (v/v). A adição de mercaptoetanol evitou a oxidação da selenometionina, como pode ser visto na Figura 36, resultando numa exatidão de 98% em relação ao valor certificado.

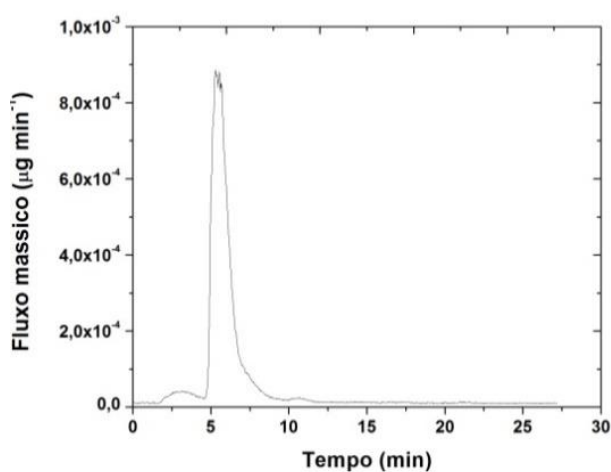


Figura 36: Perfil cromatográfico para extração enzimática do CRM SELM-1 após adição de mercaptoetanol

O procedimento de extração enzimática, após avaliação da exatidão pelo emprego do material de referência certificado SELM-1, foi aplicado à amostra de levedura enriquecida em ^{78}Se . O cromatograma resultante é apresentado na Figura 37.

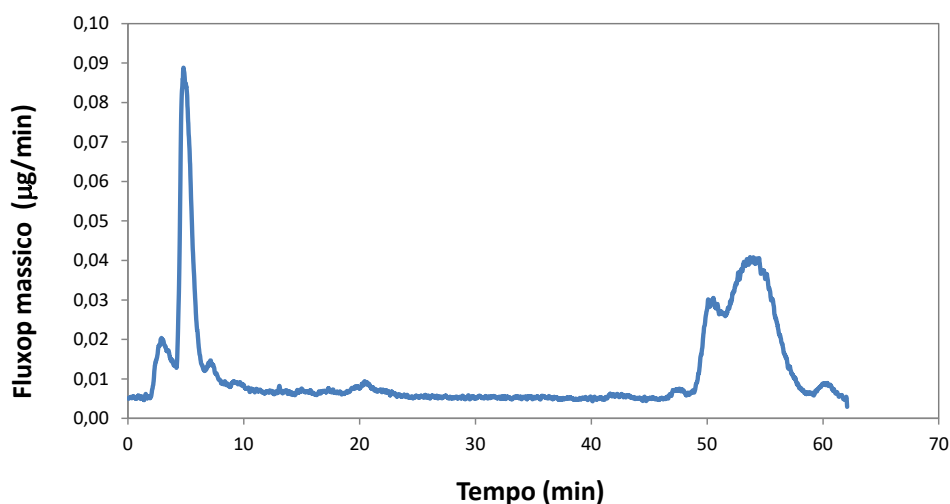


Figura 37: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida

A análise cromatográfica do extrato enzimático da levedura isotopicamente enriquecida apresentou uma série de espécies de selênio, das quais não foi possível realizar a identificação devido à baixa resolução cromatográfica e a ausência de padrões disponíveis com exceção da selenometionina que apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 5 min. Aplicando a diluição isotópica espécie- não específica encontrou-se uma fração mássica de selenometionina de aproximadamente 297 mg kg^{-1} . Esse resultado provavelmente possui um erro sistemático devido à coeluição de outras espécies de selênio, que pode ser atribuída a baixa resolução cromatográfica encontrada com as condições experimentais utilizadas para este estudo.

Com a finalidade de melhorar a resolução cromatográfica entre as espécies coeluídas, optou-se por aumentar a concentração do reagente de par iônico (TBAAc) de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ para $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para promover maior interação da selenometionina com a fase estacionária. O resultado desta modificação por ser observado na Figura 38.

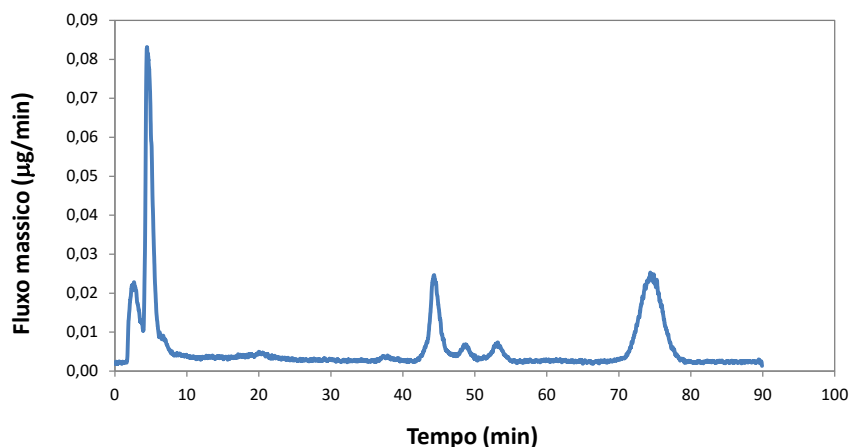


Figura 38: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida com 0,1 mM de TBAAc

O aumento da concentração do reagente de par iônico não produziu o resultado esperado, ou seja, aumento do tempo de retenção da selenometionina, e tão pouco aumento da resolução entre as espécies que coeluem próximo ao tempo de retenção de 5 minutos. Entretanto uma mudança no perfil cromatográfico das espécies que eluíram no final do cromatograma foi observada, as quais apresentaram melhor resolução cromatográfica com o aumento da concentração do reagente de par iônico.

4.4.3.2.

Cromatografia de troca aniônica forte com quantificação por IDA espécie-não específica

Com o objetivo de melhorar a separação das espécies de selênio presente na amostra de levedura enriquecida isotopicamente, foi testada uma coluna cromatográfica de troca aniônica forte utilizando as condições cromatográficas apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26: Condições instrumentais para a determinação de selenometionina em levedura enriquecida isotopicamente (⁷⁸Se) por SAX-HPLC-ICP-MS

HPLC	
Coluna PRPX-100; Hamilton	250 mm x 4,6 mm x 5µm
Fase móvel	Fase A: NH ₄ H ₂ PO ₄ (10 mmol L ⁻¹); MeOH (2%); pH= 7,0
	Fase B: NH ₄ H ₂ PO ₄ (100 mmol L ⁻¹); MeOH (2%); pH= 7,0
Vazão	0,9 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 µL
Modo de eluição	0 – 3 min = 100% A
	3 – 12 min = 100% B
	12 – 15 min = 100% B
	15 – 20 min = 100% A

As condições experimentais do ICP-MS foram as mesmas utilizadas no experimento anterior (Tabela 4). O perfil cromatográfico resultante da separação cromatográfica com a coluna de troca aniônica PRP-X100 pode ser observado na Figura 39.

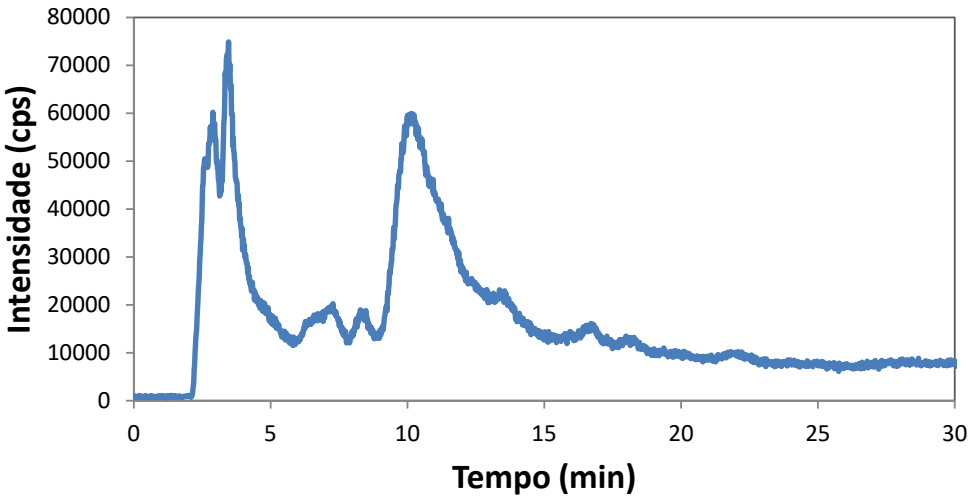


Figura 39: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida – Troca aniônica

A alteração do mecanismo de separação (fase reversa para troca aniônica) não resultou em melhora da resolução cromatográfica do extrato enzimático.

A selenometionina eluiu em aproximadamente 10 minutos apresentando um perfil assimétrico, provavelmente devido a presença de outras espécies que coeluíram com o analito de interesse.

Com a finalidade de aumentar a resolução cromatográfica, nova fase móvel foi testada usando as mesmas condições instrumentais anteriores (ver Tabela 27). A fase móvel foi constituída de citrato de amônio dibásico em substituição ao dihidrogeno fosfato de amônio.

Tabela 27: Condições instrumentais para separação cromatográfica utilizando acetato de amônio.

HPLC	
Coluna PRPX-100; Hamilton	250 mm x 4,6 mm x 5 μ m
Fase móvel	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₇ (5 mmol L ⁻¹); MeOH (2%); pH= 5,05
Vazão	0,9 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 μ L
Modo de eluição	Isocrático

Na Figura 40 é apresentada a separação cromatográfica utilizando citrato de amônio dibásico como constituinte da fase móvel, mais uma vez não foi possível aumentar a resolução cromatográfica da selenometionina ($t_R \sim 6$ min), inviabilizando a análise quantitativa dessa espécie.

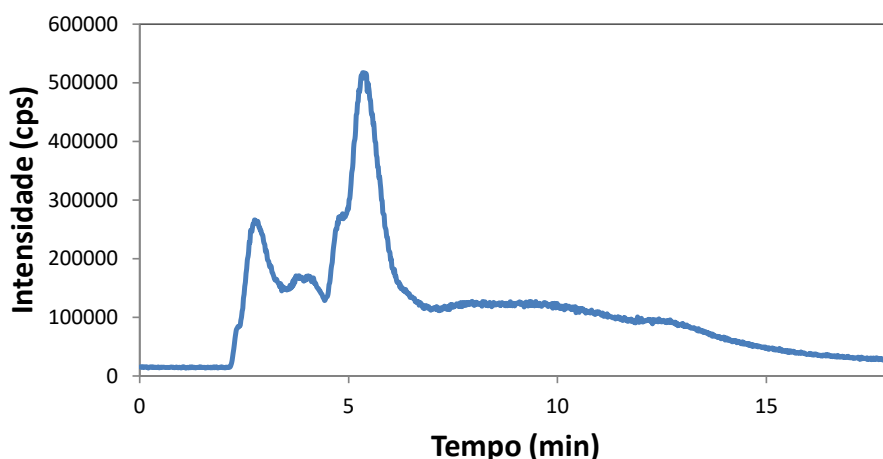


Figura 40: Perfil cromatográfico obtido para extração enzimática da amostra de levedura enriquecida – Troca Aniônica

Como os experimentos realizados com a coluna de troca aniônica forte não resultaram em melhora na resolução cromatográfica, optou-se por utilizar a coluna

de fase reversa (a mesma empregada nos estudos iniciais – item 3.3.2.3), porém agora com HFBA como reagente de par iônico.

4.4.3.3.

Cromatografia de fase reversa com quantificação por IDA espécie-não específica (HFBA como reagente de par iônico)

A escolha do HFBA como reagente de par iônico baseou-se principalmente na avaliação das constantes de termodinâmicas de equilíbrio do analito de interesse. A selenometionina possui dois valores de pKa (2,2 e 9,3), como pode ser observado na Figura 41. Em valores de pH entre 2,2 e 9,3 o grupo amino e o grupo carboxila apresentam-se carregados e nessas condições pode ocorrer uma transferência de próton intramolecular resultando na espécie neutra (MISHRA; PRIYADARSINI; MOHAN, 2005).

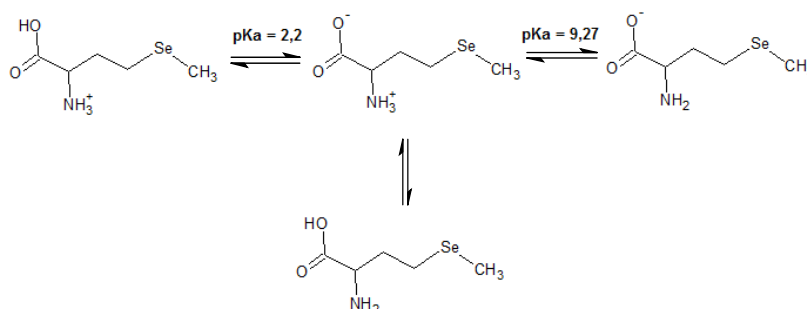


Figura 41: Constantes termodinâmicas (pKa) da selenometionina

Os primeiros experimentos cromatográficos utilizando a coluna de fase reversa (item 5.4.3.1), fase móvel com acetato de tetra-butil amônio e pH ~5,0 não apresentaram resolução cromatográfica adequada. A composição da fase móvel, favorece o rearranjo intramolecular da selenometionina gerando a espécie neutra, como pode ser observado na Figura 41 e esse fato provavelmente desfavorece a interação da selenometionina com o reagente de par iônico TBAAC.

Tendo em vista essas considerações acerca das constantes termodinâmicas da selenometionina, decidiu-se por utilizar HFBA como reagente de par iônico resultando numa fase móvel com pH de aproximadamente 2,5. Nessas condições, espera-se que a selenometionina esteja carregada positivamente resultando em forte interação com o HFBA devido a presença de átomos de flúor em sua estrutura como pode ser visto na Figura 42.

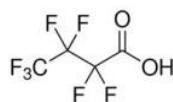


Figura 42: Estrutura química do HFBA

As condições cromatográficas utilizadas para a separação de selenometiona presente no extrato enzimático encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28: Condições instrumentais do HPLC com fase reversa utilizando HFBA como par iônico.

HPLC	
Coluna C18 Luna; Phenomenex	150 mm x 2 mm x 3 μ m
Pré-coluna; Phenomenex	4 mm x 2 mm
Fase móvel	HFBA (0,05 %); MeOH (1%); pH= 2,49
Vazão	0,2 mL min ⁻¹
Volume de injeção	5 μ L
Modo de eluição	Isocrático

OBS: As condições operacionais do ICP-MS encontram-se na Tabela 4

O resultado da análise do extrato enzimático utilizando as condições cromatográficas é apresentado na Figura 43.

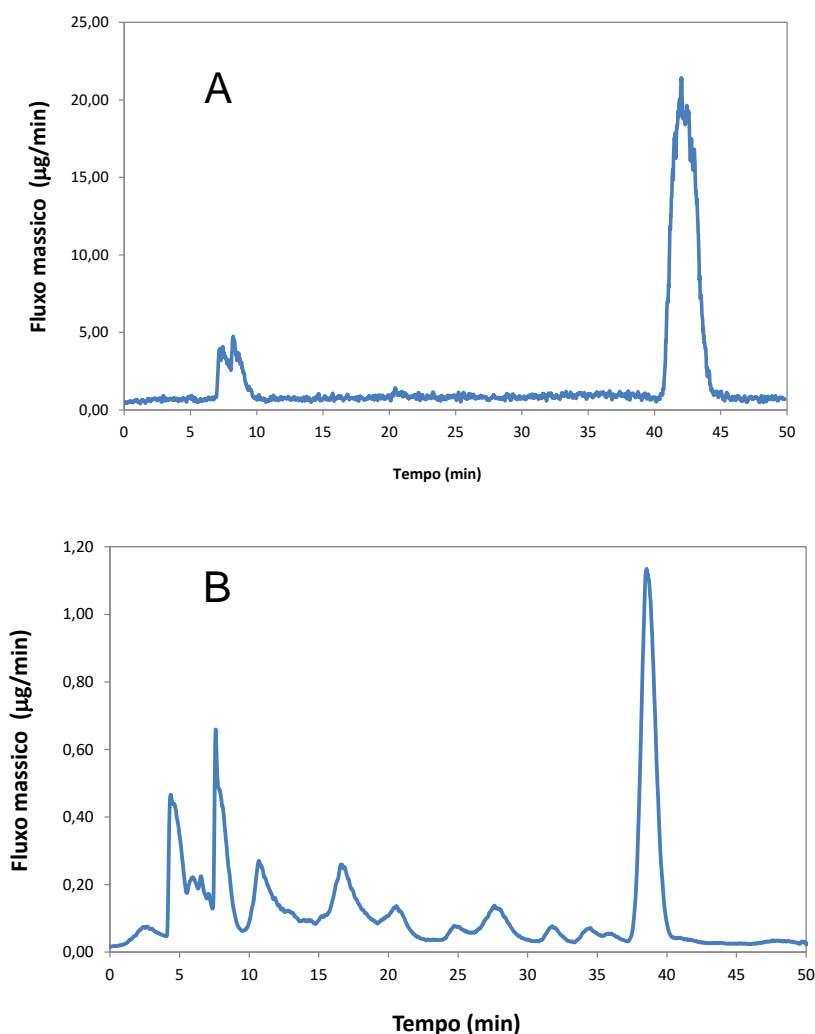


Figura 43: Perfis cromatográficos obtidos para (A) padrão de selenometionina e (B) extração enzimática da amostra de levedura enriquecida isotopicamente – HFBA como par iônico

Como pode ser observado na Figura 43A o tempo de retenção do padrão de selenometionina passou de aproximadamente 5 minutos para 42 minutos, confirmando assim as observações realizadas sobre os aspectos termodinâmicos da interação entre a selenometionina e o reagente de par iônico.

A Figura 43B apresenta o perfil cromatográfico obtido para o extrato enzimático da amostra de levedura isotopicamente enriquecida utilizando HFBA como reagente de par iônico.

Pode-se observar uma melhor resolução cromatográfica entre a selenometionina e as outras espécies de selênio presente na amostra permitindo a realização da quantificação da selenometionina por diluição isotópica espécie-específica resultando na fração mássica de aproximadamente $142 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$.

Uma vez que foi confirmada a existência de forte interação entre a selenometionina e o HFBA, decidiu-se aumentar a concentração do reagente de par iônico de 0,05 % para 0,1 % com o objetivo de avaliar a presença de possíveis espécies coeluinte com o analito de interesse resultando numa fração mássica de selenometionina de $140 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$. Vale ressaltar que para fins de correção de possíveis erros sistemáticos presentes durante o processo de separação cromatográfica, a avaliação da recuperação da coluna foi realizada sendo obtido um valor de $92 \pm 8\%$ para selenometionina e $88 \pm 5\%$ para selênio total. A recuperação obtida para a selenometionina foi considerada quantitativa e os resultados obtidos foram corrigidos pelo fator de recuperação da coluna.

4.4.3.4.

Cromatografia bidimensional (2D) - fase reversa x troca aniônica forte com quantificação por IDA espécie-específica

Para obter maior segurança na eficiência da separação cromatográfica, e agregando as principais vantagens da diluição isotópica espécie-específica, como compensação das perdas parciais do analito durante o processo analítico, realizou-se um experimento de cromatografia bidimensional (fase reversa x troca aniônica) utilizando um padrão de selenometionina de abundância isotópica natural para fins de quantificação.

A adição da solução de padrão às amostras para análise por diluição isotópica reversa novamente foi otimizada observando o fator de propagação de erro apresentado na Figura 44, sendo o R_m estimado em 0,3.

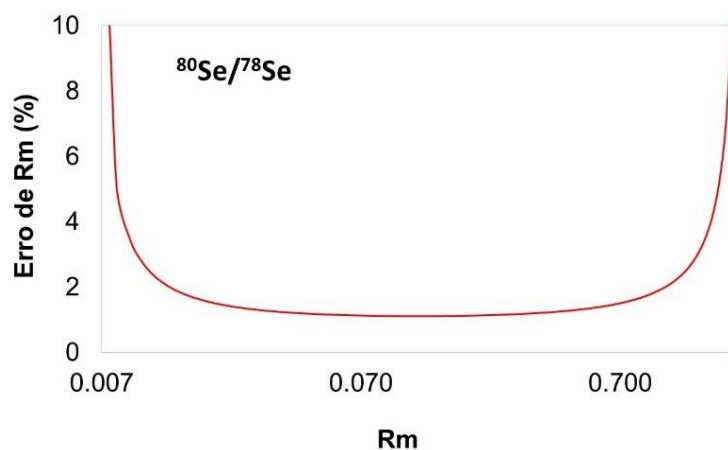


Figura 44: Fator de propagação de erro empregando um padrão de selênio de abundância natural frente à amostra de levedura enriquecida em ^{78}Se

Num primeiro momento foi realizada a injeção da mistura do extrato enzimático da levedura enriquecida isotopicamente e o padrão de selenometionina de abundância natural, na coluna de fase reversa. O pico referente a selenometionina foi coletado, liofilizado e posteriormente injetado na coluna cromatográfica de troca aniônica forte. Dessa maneira espera-se assegurar que outras espécies não estejam eluindo do sistema cromatográfico num mesmo tempo de retenção uma vez que é pouco provável que espécies diferentes possuam a mesma interação com colunas cromatográficas com mecanismos de separação completamente distintos. Os cromatogramas obtidos nesse experimento de cromatografia bidimensional pode ser visto na Figura 45.

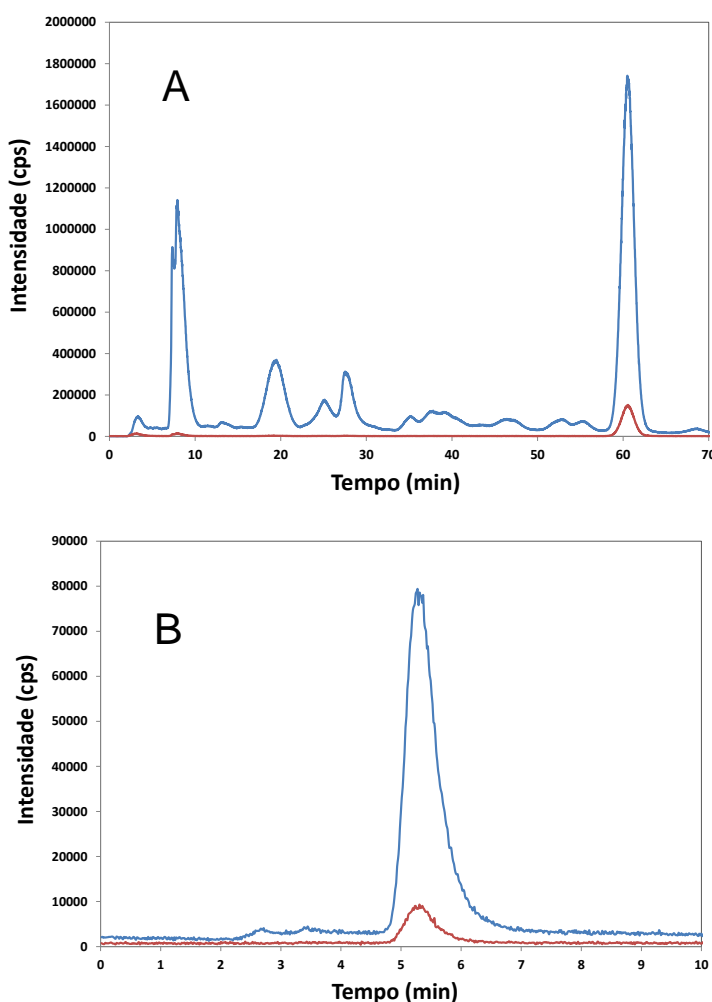


Figura 45: Resultado da cromatografia 2D (A - fase reversa e B - troca aniônica) para quantificação de selenometionina por IDA espécie-específica; — ^{78}Se — ^{80}Se

O cromatograma apresentado na Figura 45 é referente a análise por HPLC-ICP-MS utilizando a coluna de fase reversa (condições cromatográficas na Tabela 28) posteriormente a análise cromatográfica por troca aniônica (condições cromatográficas na Tabela 27).

Como pode ser observado na Figura 45 B duas espécies minoritárias eluem entre os tempos de retenção de 2 a 3 minutos e posteriormente a selenometionina eluindo em aproximadamente 6 minutos. A quantificação da selenometionina utilizando a abordagem de diluição isotópica espécie-específica por cromatografia 2D resultou numa fração mássica de 132 mg kg^{-1} .

A Tabela 29 apresenta os resultados resumidos das quatro estratégias de separação cromatográfica utilizadas para a quantificação de selenometionina na amostra de levedura isotopicamente enriquecida por diluição isotópica.

Tabela 29: Resumo das diferentes abordagens para quantificação de selenometionina

Estratégia de quantificação	Resultado
IDA espécie-não específica (Fase reversa; TBAAc como reagente de par iônico.)	297 mg kg^{-1}
IDA espécie-não específica (Troca aniônica)	$134 \pm 14 \text{ mg kg}^{-1}$
IDA espécie-não específica (Fase reversa; HFBA como reagente de par iônico.)	$140 \pm 14 \text{ mg kg}^{-1}$
IDA espécie-específica (cromatografia 2D)	$132 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$

4.4.3.5.

Identificação de proteínas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS

A identificação de proteínas nas amostras de levedura (enriquecida isotopicamente em ^{78}Se e com abundância natural) foi realizada empregando a cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massa com fonte de ionização por *electrospray*. A princípio buscou-se identificar uma proteína com selênio em sua cadeia proteica nas duas amostras de levedura em estudo com o intuito de se avaliar a viabilidade de utilização da levedura marcada isotopicamente como um padrão para a quantificação absoluta de proteínas por ESI-MS. O desenvolvimento de métodos analíticos para este fim representa um desafio analítico principalmente devido a forte influência da matriz na eficiência

de ionização dos compostos de interesse quando se utiliza uma fonte branda de ionização como o caso da ESI-MS.

Existem diferentes estratégias analíticas para a quantificação absoluta de proteínas entre elas a AQUA (do inglês absolute quantification). A AQUA baseia-se na medição da razão isotópica na solução resultante de uma digestão triptica após a adição de um peptídeo proteotípico, ou seja, pertencente a uma proteína específica, marcado isotopicamente. Dessa maneira, utilizando os conceitos inerentes à análise por diluição isotópica pode-se obter a concentração de proteínas na amostra analisada. Um procedimento analítico geral comumente utilizado para a identificação de proteínas é apresentado na Figura 46.



Figura 46: Procedimento para identificação de proteínas por LC-ESI-MS

Após a realização da digestão triptica de um extrato proteico é adicionado um peptídeo marcado isotopicamente, peptídeo esse que deve possuir concentração e abundância isotópica conhecida. A seguir é realizada uma separação prévia das espécies de interesse por cromatografia com posterior análise por espectrometria de massa molecular.

Para realizar a identificação e/ou quantificação de proteínas pelo procedimento AQUA, pode-se utilizar um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo onde no primeiro quadrupolo (Q1) seleciona-se a razão massa/carga referente ao peptídeo de interesse seguindo-se a sua fragmentação na célula de colisão (Q2). Os fragmentos obtidos são então direcionados para o quadrupolo Q3 onde se realiza a medição da razão isotópica entre os fragmentos oriundos do peptídeo natural (ou endógeno) e o pertencente ao peptídeo marcado isotopicamente. Dessa maneira, é possível obter a concentração da proteína em

termos absolutos contornando todos os problemas relacionados a interferência de matriz que são característicos do processo de ionização por *electrospray*.

Um procedimento similar pode ser empregado quando se utiliza o ESI-Q-TOF-MS, porém, ao invés de se empregar o quadrupolo como filtro de massas para seleção das massas de interesse, utiliza-se a fragmentação obtidas pelo ESI-Q-TOF-MS. Dessa maneira, pode-se selecionar a massa do íon de interesse (peptídeo) e a seguir os íons resultantes da fragmentação desse íon.

4.4.4.

Tratamento de amostras

A amostra de levedura não enriquecida isotopicamente (0,1 g) foi submetida a extração aquosa para obtenção de um extrato rico em proteínas. Para isso foram avaliados diferentes procedimentos para o rompimento da estrutura celular das amostras de levedura, entre eles, rompimento mecânico empregando pérolas de vidro e ultrassonicação em sonda e em banho. Os extratos aquosos obtidos pelos diferentes procedimentos de extração, foram submetidos a análise por HPLC-ICP-MS utilizando uma coluna de exclusão por tamanho (SEC) a fim de se obter o perfil proteico resultante dos diferentes procedimentos de extração (Figura 47) utilizando as condições operacionais apresentadas na Tabela 8.

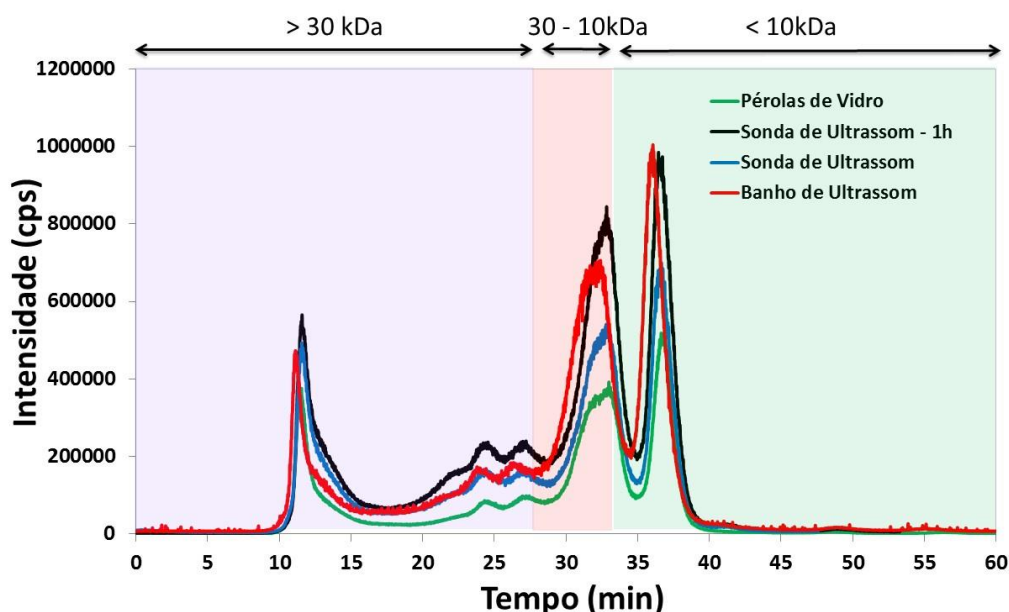


Figura 47: Perfil cromatográfico obtido para extração aquosa da amostra de levedura enriquecida (SEC-ICP-MS)

Pode-se observar na Figura 47 que os perfis proteicos obtidos com os diferentes procedimentos de extração foram similares apresentando proteínas com massa molecular variando entre <10 kDa e >30 kDa. Assim, optou-se por utilizar a extração em banho ultrassônico para os estudos posteriores.

O mesmo procedimento foi realizado com a levedura enriquecida isotopicamente para avaliar se essa amostra possui o mesmo perfil proteico da amostra comercial. O extrato aquoso foi analisado por HPLC-ICP-MS monitorando os isótopos de selênio e por HPLC com detecção UV monitorando o comprimento de onda 280 nm característico de absorção molecular de proteínas, para avaliar se os compostos de selênio presentes nas amostras estão associados a proteínas (Figura 48).

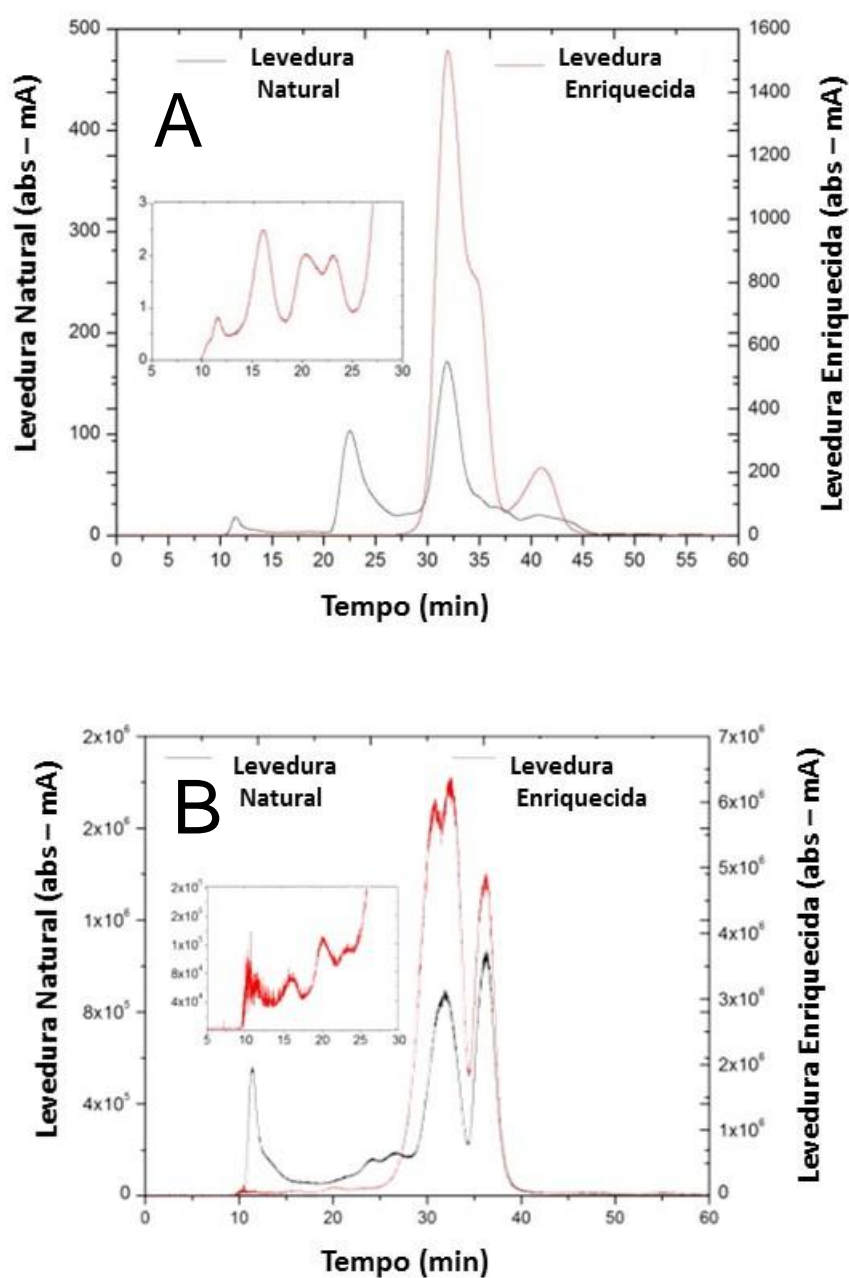


Figura 48: Perfil cromatográfico obtido da extração aquosa da amostra de levedura enriquecida por UV (A) e ICP-MS (B)

Como se pode observar na Figura 48A o perfil cromatográfico obtido para a amostra de levedura comercial revelou a presença majoritária de proteínas de peso molecular de 60 kDa (~20 min) e 12 kDa (~30 min) além da presença um grupo de moléculas que eluíram na zona de exclusão da coluna SEC que *teoricamente* corresponde a compostos com massa molecular >600 kDa. O perfil cromatográfico obtido para a amostra de levedura enriquecida isotopicamente apresentou majoritariamente a presença de um grupo de proteínas de

aproximadamente 12 kDa como pode ser observado na Figura 48; outros grupos de proteínas minoritárias também foram identificados como pode ser visto no destaque na Figura 48A.

Um estudo complementar foi realizado empregando o acoplamento HPLC-ICP-MS e as mesmas condições cromatográficas do estudo anterior para obter a informação elementar do extrato proteico, ou seja, identificar quais grupos de proteínas apresentam selênio em sua estrutura molecular. A distribuição de selênio no extrato aquoso (Figura 48B) coincide com o perfil proteico obtido por SEC-HPLC sendo o grupo de proteínas de aproximadamente 12 kDa escolhido para os estudos subsequentes. Essa fração cromatográfica foi coletada em tubos de polipropileno e liofilizado para posterior digestão trípica.

As frações proteicas liofilizadas foram reconstituídas com 100 μL de água Tipo I seguindo-se a adição de ditioneitol para rompimento das ligações S-S e Se-S. A solução resultante foi deixada em repouso por 1,5h no escuro e após esse período foram adicionados 50 μL de solução de tripsina (20 mg mL^{-1}). As amostras foram levadas a um agitador orbital a 200 rpm e 37°C por 16h, após esse período foi adicionado ácido trifluoracético para interromper a reação enzimática (pH=2). A solução obtida após a digestão trípica foi liofilizada para posterior análise por HPLC-ESI-Q-TOF-MS. Na Tabela 30 são apresentadas as condições instrumentais utilizadas para a análise do digerido trípico.

Tabela 30: Condições instrumentais utilizadas para análise por HPLC-ESI-MS

HPLC	
Fase Móvel	A – Água:Ácido fórmico (0,1:100 v/v)
	B – Acetonitrila:Ácido fórmico (0,1:100 v/v)
Gradiente	0 min – 2% Fase B
	3 min – 2 % Fase B
	75 min – 40% Fase B
	80 min – 80 % Fase B
Vazão	150 $\mu\text{L min}^{-1}$

Como resultado da digestão trípica da fração coletada por SEC-HPLC, pode-se destacar a presença proteína *heat sock* de 12 kDa que foi identificada tanto na levedura comercial quanto na levedura enriquecida isotopicamente. Essa proteína foi escolhida para os estudos subsequentes pois há informações na literatura (POLATAJKO et al., 2005) de que essa proteína possui selenometionina

em sua estrutura proteica. A Figura 49 apresenta a sequência de aminoácidos que foi identificada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Natural yeast

HIT 1

Protein Mass: 11685.659 (monoisotopic) 11692.620(average) Protein Score: **536** Protein pp: **898.4**
sp|P22943|HSP12_YEAST 12 kDa heat shock protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=HSP12 PE=1 SV=1

Sequence:

001 MSDAGRKGFG EKASEALKPD SQSYAEQGG EYITDKADKV AGKVQPEDNK GVFGVHDSA EKGKDNAEGQ GESLADQARD YMGAAKSKLN DAVEYVSGRV 100
101 HGEEDPTKK 109

Sequence Coverage: **52%**

Sequence Tag Coverage: **46%**

Enriched yeast

HIT 1

Protein Mass: 12079.650 (monoisotopic) 12086.611(average) Protein Score: **715** Protein pp: **1047.2**
sp|P22943|HSP12_YEAST 12 kDa heat shock protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=HSP12 PE=1 SV=1

Sequence:

001 MSDAGRKGFG EKASEALKPD SQSYAEQGG EYITDKADKV AGKVQPEDNK GVFGVHDSA EKGKDNAEGQ GESLADQARD YMGAAKSKLN DAVEYVSGRV 100
101 HGEEDPTKK 109

Sequence Coverage: **73%**

Sequence Tag Coverage: **64%**

Figura 49: Sequência de aminoácidos identificados na proteína heat shock 12 kDa nas leveduras comercial e enriquecida em ^{78}Se

Para a interpretação dos dados obtidos para as amostras de levedura (de abundância natural e enriquecida isotopicamente em ^{78}Se) foi realizada a alteração da massa molecular da metionina considerando a substituição do enxofre pelo selênio, convertendo-se assim, em selenometionina, além de considerar a provável oxidação da selenometionina a óxido de selenometionina no motor de busca do *software* *MassMatrix*.

Ao se realizar a avaliação da digestão enzimática buscando os peptídeos que foram identificados na proteína de 12 kDa observa-se que apesar da boa cobertura da sequência proteica, 52% e 73% para as leveduras comercial e enriquecida isotopicamente, respectivamente, os peptídeos que contém o aminoácido selenometionina (DYMGA, onde M denota o aminoácido selenometionina e DYXGA, onde X denota selenometionina marcada com ^{78}Se) não foram identificados nas amostras. Esse fato pode ter sido ocasionado por alguns fatores tais como baixa eficiência de ionização do peptídeo de interesse considerando a complexidade da matriz e a susceptibilidade da fonte de ionização por *electrospray* a esse tipo de problema, digestão trípica incompleta resultando em não clivagem da ligação peptídica no peptídeo de interesse ou até mesmo baixa sensibilidade levando em consideração que não foi utilizada uma coluna preparativa para coleta de uma massa maior de proteína previamente a etapa de

digestão triptica. Entretanto, outras proteínas foram identificadas com sucesso nas duas amostras de levedura em estudo, como pode ser visto nas Figuras 50 e 51.

Protein Hit List			protein description
hit#	score	decoy%	
hit1	536	0.00%	sp P22943 HSP12_YEAST 12 kDa heat shock protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 2
hit2	348	0.00%	sp P00445 SODC_YEAST Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC
hit3	216	0.00%	sp P17536 TPM1_YEAST Tropomyosin-1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c
hit4	203	0.00%	sp P38910 CH10_YEAST 10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae
hit5	188	0.00%	sp Q08245 ZEO1_YEAST Protein ZEO1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c)
hit6	187	0.00%	sp P18899 DDR48_YEAST Stress protein DDR48 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508
hit7	161	0.00%	sp P22803 TRX2_YEAST Thioredoxin-2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c)
hit8	152	0.00%	sp P15992 HSP26_YEAST Heat shock protein 26 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508
hit9	127	0.00%	sp P02400 RLA4_YEAST 60S acidic ribosomal protein P2-beta OS=Saccharomyces cerevisiae (str
hit10	126	0.00%	sp P10591 HSP71_YEAST Heat shock protein SSA1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204
hit11	121	0.00%	sp Q3E754 RS21B_YEAST 40S ribosomal protein S21-B OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC
hit12	121	0.00%	sp P00924 ENO1_YEAST Enolase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN
hit13	118	0.00%	sp P00724 INV2_YEAST Invertase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c)
hit14	106	0.00%	sp P31787 ACBP_YEAST Acyl-CoA-binding protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204
hit15	104	0.00%	sp Q02983 RRN5_YEAST RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN5 OS=Sac
hit16	102	0.00%	sp P02994 EF1A_YEAST Elongation factor 1-alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204
hit17	96	0.00%	sp P39015 STM1_YEAST Suppressor protein STM1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 2045
hit18	85	0.00%	sp P40159 YNU8_YEAST Uncharacterized protein YNL208W OS=Saccharomyces cerevisiae (strain A
hit19	84	0.00%	sp P06787 CALM_YEAST Calmodulin OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) G
hit20	77	0.00%	sp P38616 YGP1_YEAST Protein YGP1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c)
hit21	76	0.00%	sp P05319 RLA2_YEAST 60S acidic ribosomal protein P2-alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (st
hit22	75	0.00%	sp P17695 GLRX2_YEAST Glutaredoxin-2, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain A
hit23	74	0.00%	sp P38879 NACA_YEAST Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Saccharomyces
hit24	71	--	##DECOY## sp Q12504 RKH4_YEAST Ribosomal lysine N-methyltransferase 4 OS=Saccharomyces cer
hit25	67	2.94%	sp Q12513 TMA17_YEAST Translation machinery-associated protein 17 OS=Saccharomyces cerevis
hit26	67	2.94%	sp P10592 HSP72_YEAST Heat shock protein SSA2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204
hit27	64	2.94%	sp P0C590 HSP77_YEAST Heat shock protein SSC1, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (
hit28	63	2.94%	sp P47133 EMC2_YEAST ER membrane protein complex subunit 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (st
hit29	60	2.94%	sp P53141 MLC1_YEAST Myosin light chain 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508
hit30	59	2.94%	sp P09232 PRT8_YEAST Cerevisin OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN
hit31	57	2.94%	sp Q12349 ATP14_YEAST ATP synthase subunit H, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (s
hit32	55	2.94%	sp P00127 QCR6_YEAST Cytochrome b-c1 complex subunit 6 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain
hit33	51	2.94%	sp P22217 TRX1_YEAST Thioredoxin-1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c)
hit34	47	2.94%	sp P07170 KAD2_YEAST Adenylate kinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S2

Figura 50: Proteínas identificadas na fração de 12 kDa da levedura comercial

Protein Hit List			protein description
hit#	score	decoy%	
hit1	715	0.00%	sp P22943 HSP12_YEAST 12 kDa heat shock protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=HSP
hit2	503	0.00%	sp P17536 TPM1_YEAST Tropomyosin-1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=TPM1 PE=1 SV=1
hit3	373	0.00%	sp P00445 SODC_YEAST Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=
hit4	279	0.00%	sp Q08245 ZEO1_YEAST Protein ZEO1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=ZEO1 PE=1 SV=3
hit5	232	0.00%	sp P15992 HSP26_YEAST Heat shock protein 26 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=HSP26 f
hit6	229	0.00%	sp P00724 INV2_YEAST Invertase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=INV2 PE=1 SV=1
hit7	226	0.00%	sp P00359 G3P3_YEAST Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508
hit8	224	0.00%	sp P39015 STM1_YEAST Suppressor protein STM1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=STM1 f
hit9	197	0.00%	sp P38910 CH10_YEAST 10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 /
hit10	190	0.00%	sp P10591 HSP71_YEAST Heat shock protein SSA1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=SSA1
hit11	181	0.00%	sp P02400 RLA4_YEAST 60S acidic ribosomal protein P2-beta OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S2
hit12	179	0.00%	sp P02994 EF1A_YEAST Elongation factor 1-alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=TEF1
hit13	173	0.00%	sp P00924 ENO1_YEAST Enolase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=ENO1 PE=1 SV=3
hit14	165	0.00%	sp P05319 RLA2_YEAST 60S acidic ribosomal protein P2-alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S
hit15	148	0.00%	sp Q3E754 RS21B_YEAST 40S ribosomal protein S21-B OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=f
hit16	145	0.00%	sp P38616 YGP1_YEAST Protein YGP1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=YGP1 PE=1 SV=2
hit17	140	0.00%	sp P07170 KAD2_YEAST Adenylate kinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=ADK1 PE=1 SV=
hit18	140	0.00%	sp P10592 HSP72_YEAST Heat shock protein SSA2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=SSA2
hit19	130	0.00%	sp P0C590 HSP77_YEAST Heat shock protein SSC1, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 /
hit20	125	0.00%	sp P0C590 HSP77_YEAST Heat shock protein SSC1, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 /
hit21	124	0.00%	sp P53141 MLC1_YEAST Myosin light chain 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=MLC1 PE=1
hit22	116	0.00%	sp P18899 DDR48_YEAST Stress protein DDR48 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=DDR48 PE
hit23	112	0.00%	sp P00560 PGK_YEAST Phosphoglycerate kinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=PGK1 PE
hit24	107	0.00%	sp P53163 HMP1_YEAST 54S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 /
hit25	104	0.00%	sp P38879 NACA_YEAST Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (strain A
hit26	98	0.00%	sp P0C608 RLA01_YEAST Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S2
hit27	95	0.00%	sp P40414 TPM2_YEAST Tropomyosin-2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=TPM2 PE=1 SV=1
hit28	90	0.00%	sp P25373 GLRX1_YEAST Glutaredoxin-1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=GRX1 PE=1 SV=1
hit29	89	0.00%	sp P17695 GLRX2_YEAST Glutaredoxin-2, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN
hit30	87	2.38%	sp P47133 EMC2_YEAST ER membrane protein complex subunit 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S
hit31	87	--	##DECOY## sp Q07533 CYK3_YEAST Cytokinesis protein 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) G
hit32	78	2.38%	sp P01098 STF1_YEAST ATPase-stabilizing factor 9 kDa, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204
hit33	76	2.38%	sp P00127 QCR6_YEAST Cytochrome b-c1 complex subunit 6 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c)
hit34	75	2.38%	sp P22803 TRX2_YEAST Thioredoxin-2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=TRX2 PE=1 SV=3
hit35	73	2.38%	sp Q14467 MBF1_YEAST Multiprotein-bridging factor 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN

Figura 51: Proteínas identificadas na fração de 12 kDa da levedura enriquecida isotopicamente em ⁷⁸Se

Como pode-se observar nas Figuras 50 e 51 referentes a análise dos digeridos tripticos das amostras de leveduras comercial e enriquecida isotopicamente, respectivamente, foram identificadas aproximadamente 35 proteínas presentes na fração de 12 kDa. Além da proteína *heat sock* de 12 kDa, foram identificadas as proteínas superóxido dismutase e a tioredoxina-2 que possuem potencial para serem biosintetizadas na presença de padrões isotópicos

como por exemplo Cu ou Zn para a superóxido dismutase e Se para a heat shock e a tioredoxina -2, com o objetivo de serem utilizadas como padrões para quantificação absoluta de proteínas por HPLC-ESI-MS.

5 Conclusão

O emprego de diferentes gases de reação em ICP-MS (DRC II e Nexlon) é uma atraente alternativa para resolver os problemas relacionados com a sobreposição espectral de espécies de Ar sobre ^{80}Se . Metano (CH_4) foi o gás de reação mais adequado, principalmente por que reage especificamente com o dímero de argônio ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$), resultando num limite de detecção menor quando comparado aos obtidos quando NH_3 e O_2 . Embora o CH_4 tenha apresentado bom desempenho analítico, NH_3 e O_2 também foram capazes de resolver de maneira satisfatória as interferências espectrais. Entretanto, esses gases (NH_3 e O_2) também reagem com Se, porém, a reação destes gases com as espécies interferentes possui velocidade de reação maior em relação ao analito, possibilitando assim, o emprego para fins analíticos. De fato, a tecnologia da célula de reação dinâmica demonstrou ser uma poderosa ferramenta para contornar os problemas relacionados à interferência espectral sobre o isótopo mais abundante de selênio.

O método permitiu a determinação exata e precisa de Se total em amostras de suplemento alimentar e de levedura. Os resultados encontrados para essas amostras apresentaram grande variação entre os comprimidos analisados e discrepância considerável em relação ao valor informado no rótulo. O emprego do acoplamento HPLC-ICP-MS permitiu avaliar a conformidade das amostras de suplemento alimentar em relação a presença das espécies informadas no rótulo evidenciando assim, a falta de uma informação clara e objetiva sobre a real composição das amostras de suplemento alimentar.

O emprego de diferentes abordagens de diluição isotópica permitiu a caracterização de uma levedura enriquecida isotopicamente em termos de concentração de selênio total e selenometionina bem como a abundância isotópica.

O emprego da HPLC-ESI-Q-TOF-MS permitiu a identificação de diferentes proteínas em amostras de levedura (amostra enriquecida isotopicamente em ^{78}Se e amostra com abundância natural). A proteína *heat shock* de 12 kDa bem como a superóxido desmutase foram identificadas nas duas amostras de levedura o que pode ser utilizado em trabalhos futuros, para a produção de padrão de levedura

enriquecida isotopicamente para fins de quantificação dessas proteínas em amostras de leveduras comerciais por diluição isotópica.

6

Referências bibliográficas

ABDULAH, R. et al. Chemical forms of selenium for cancer prevention. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, n. 2–3, p. 141–150, 2005.

ALMONDES, K. G. DE S. et al. o papel das selenoproteínas no câncer. **Rev. assoc. med. Bras.**, v. 56, n. 4, p. 484–488, 2010.

ALONSO, J. I. G.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. **Isotope dilution mass spectrometry**. Cambridge: Royal society of chemistry, 2013.

AMOAKO, P. O.; UDEN, P. C.; TYSON, J. F. Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 315–323, out. 2009.

ANVISA. Regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais - Port. nº33. 1998.

ANVISA. **RDC nº360.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc>. Acesso em: 11 jan. 2017.

ANVISA. **RDC nº 269.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_269_2005_COMP.pdf/25aaf9f3-32bc-4e80-aa6c-0520332533a6>. Acesso em: 11 jan. 2017.

B'HYMER, C.; CARUSO, J. A. Evaluation of yeast-based selenium food supplements using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n. 12, p. 1531–1539, 2000.

B'HYMER, C.; CARUSO, J. A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1114, n. 1, p. 1–20, 2006.

BAGHURST, K. **Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand Including Recommended Dietary Intakes.** Disponível em: <https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/n35.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2017.

BANDURA, D. R. et al. Gas-phase ion–molecule reactions for resolution of atomic isobars: AMS and ICP-MS perspectives. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 255–256, p. 312–327, 2006.

BERMEJO, P. et al. Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 654–663, 2004.

BIERLA, K. et al. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. **Anal Bioanal Chem**, v. 390, n. 7, p. 1789–1798, 2008.

BIRD, S. M. et al. High-performance liquid chromatography of selenoamino acids and organoselenium compounds. Speciation by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 789, p. 349–359, 1997.

BJÖRN, E. et al. Investigation and quantification of spectroscopic interferences from polyatomic species in inductively coupled plasma mass spectrometry using electrothermal vaporization or pneumatic nebulization for sample introduction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 53, n. 13, p. 1765–1776, 1998.

BOUCHOUX, G.; RASHAD, A. M.; HELAL, A. I. Theoretical Investigation of Selenium Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **The Journal of physical chemistry. A**, 30 ago. 2012.

CAPELO, J. L. et al. Enzymatic Probe Sonication: Enhancement of Protease-Catalyzed Hydrolysis of Selenium Bound to Proteins in Yeast. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 233–237, 2004.

CARUSO, J. A.; MONTES-BAYON, M. Elemental speciation studies—new directions for trace metal analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 148–163, 2003.

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.

CHANG, J. C. et al. Selenium Content of Brazil Nuts from Two Geographic Locations in Brazil. **Chemosphere**, v. Vol. 30, n. No. 4, p. 801–802, 1995.

CHASSAIGNE, H. et al. Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material. **Journal of Chromatography A**,

v. 976, p. 409–422, 2002.

CHEN, X. et al. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. **Biological Trace Element Research**, v. 2, n. 2, p. 91–107, 1980.

CLARK, R. F. et al. Selenium Poisoning From a Nutritional Supplement. **JAMA**, v. 275, n. No.14, p. 1087–1088, 1996.

CUBADDA, F. et al. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 4, p. 2295–2301, 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. **Analytica Chimica Acta**, v. 698, n. 1–2, p. 6–13, 2011.

DA SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z. Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 1, p. 62–7, 2013.

DAHLKE, F. et al. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE SELÊNIO PARA FRANGOS DE CORTE EM DIFERENTES TEMPERATURAS. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. n. 1, p. 21–26, 2005.

DENG, B. et al. Determination of selenomethionine in selenium-enriched yeast using capillary electrophoresis on-line coupled with electrochemiluminescence detection. **Microchimica Acta**, v. 165, n. 3–4, p. 279–283, 2009.

DERNOVICS, M.; FAR, J.; LOBINSKI, R. Identification of anionic selenium species in Se-rich yeast by electrospray QTOF MS/MS and hybrid linear ion trap/orbitrap MSn. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 1, n. 4, p. 317–329, 2009.

DÍAZ HUERTA, V. et al. Sample preparation for identification of selenocompounds in urine by electrospray-MS/MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, n. 12, p. 1471, 2003a.

DÍAZ HUERTA, V. et al. Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, n. 10, p. 1243, 2003b.

DIAZ HUERTA, V.; FERNANDEZ SANCHEZ, M. L.; SANZ-MEDEL, A. An attempt to differentiate HPLC-ICP-MS selenium speciation in natural and selenised Agaricus mushrooms using different species extraction procedures. **Anal Bioanal Chem**, v. 384, n. 4, p. 902–907, 2006.

DÍAZ HUERTA, V.; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M. L.; SANZ-MEDEL, A. Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 5, p. 644, 2004.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 7, p. 1304–1323, 2006.

ELLISON, S. L. R.; HARDCASTLE, W. A. Causes of error in analytical chemistry: results of a web-based survey of proficiency testing participants. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 17, n. 4, p. 453–464, 2012.

EURACHEM. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. Disponível em: <<https://eurachem.org/index.php/publications/pubarch/81-gdquam20002>>.

FANG, Y. et al. Identification of selenium compounds using HPLC-ICPMS and nano-ESI-MS in selenium-enriched rice via foliar application. v. 9477, 2010.

FAR, J.; PREUD'HOMME, H.; LOBINSKI, R. Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 657, n. 2, p. 175–190, 2010.

FERRARELLO, C. N. et al. Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel *Mytilus edulis* by orthogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 439–449, 2002.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 3, n. 11, p. 172–177, 2002.

GAMMELGAARD, B.; JACKSON, M. I.; GABEL-JENSEN, C. Surveying selenium speciation from soil to cell-forms and transformations. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, n. 5, p. 1743–1763, 2011.

GE, K.; YANG, G. The epidemiology study of endemic of selenium deficiency diseases in the etiological study of endemic disease in China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 259–263, 1993.

GERGELY, V. et al. Selenium Species in Aqueous Extracts of Alfalfa Sprouts by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Electrospray Mass Spectrometry Detection. **J. Agric.**

Food Chem., v. 54, p. 4524–4530, 2006.

GETTAR, R. T. et al. Effect of nebulizer/spray chamber interfaces on simultaneous, axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the direct determination of As and Se species separated by ion exchange high-performance liquid chromatography. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 567–573, 2005.

GIERUS, M. FONTES ORGÂNICAS E INORGÂNICAS DE SELÊNIO NA NUTRIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS: DIGESTÃO, ABSORÇÃO, METABOLISMO E EXIGÊNCIAS. **Ciência Rural**, v. 37, n. N.4, p. 1120–1212, 2007.

GINÉ, M. F.; PACKER, A. P. Online Isotope Dilution and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: from Elemental to Species Quantification. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. No. 4, p. 575–589, 2010.

GOENAGA-INFANTE, H. et al. Total selenium and selenomethionine in pharmaceutical yeast tablets: assessment of the state of the art of measurement capabilities through international intercomparison CCQM-P86. **Anal Bioanal Chem**, v. 390, n. 2, p. 629–642, 2008.

GÓMEZ-JACINTO, V. et al. Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorokiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium. **Pure Appl. Chem.**, v. 84, n. 2, p. 269–280, 2012.

HART, D. J. et al. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1771–1778, 2011.

HATTENDORF, B.; GÜNTHER, D. Strategies for method development for an inductively coupled plasma mass spectrometer with bandpass reaction cell. Approaches with different reaction gases for the determination of selenium. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, p. 1–13, 2003.

HEUMANN, K. G. et al. Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, p. 1001–1008, 1998.

HEUMANN, K. G.; ROTTMANN, L.; VOGL, J. Elemental speciation with liquid chromatography–inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 9, n. 12, p. 1351–1355, 1994.

HINOJOSA REYES, L. et al. Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, n. 10, p. 1210, 2003.

HINOJOSA REYES, L. et al. Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine: application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis-HPLC-ICP-MS Presented at the 2004 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Fort Lauderdale, FL, U. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 9, p. 1230, 2004.

HOFFMANN, E. DE; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. New York: [s.n.].

HØYBRÅTEN, D. **Nordic Nutrition Recommendations 2012 - Integrating nutrition and physical activity**. Disponível em: <<https://www.norden.org/en/theme/nordic-nutrition-recommendation/nordic-nutrition-recommendations-2012>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

HUERTA, V. D.; SÁNCHEZ, M. L. F.; SANZ-MEDEL, A. Qualitative and quantitative speciation analysis of water soluble selenium in three edible wild mushrooms species by liquid chromatography using post-column isotope dilution ICP-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, n. 1-2, p. 99-105, 2005.

IGLESIAS, H. G. **EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN/BIODISPONIBILIDAD DE SUPLEMENTOS DE HIERRO Y SELENIO EN LECHE FORMULA Y ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON YODO DURANTE LA LACTANCIA**. [s.l.] Universidad de Oviedo, 2010.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intake for vitamin C, vitamin E, Selenium and Carotenoids** National Academy Press, , 2000.

ISO. **ISO/IEC 17025: General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. Geneva, Switzerland: [s.n.].

ISO:GUM. **Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição**. [s.l.: s.n.].

JCGM. **Evaluation of measurement data — Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” — Propagation of distributions using a Monte Carlo method**. Disponível em: <<http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

JÓKAI, Z.; FODOR, P. Evaluation of the uncertainty statement in the case of

mercury speciation analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 9, p. 1229, 2009.

KITAGUCHI, T. et al. Speciation of selenium in selenium-enriched seeds, buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow). **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 5, p. 1455–1460, 2008.

KOTREBAI, M. et al. High-performance liquid chromatography of selenium compounds utilizing perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 866, p. 51–63, 2000.

KRAGTEN, J. Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. **Analyst**, v. 119, n. 10, p. 2161–2165, 1994.

KUBACHKA, K. M. et al. Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. **Food Chemistry**, n. 218, p. 313, 2017.

LAFUENTE, J. M. G. et al. Organic and inorganic selenium speciation in urine by on-line vesicle mediated highperformance liquid chromatography–focused microwave digestion–hydride generation– inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 423–429, 1998.

LAFUENTE, J. M. G. et al. Urinary selenium speciation by high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry: advantages of detection with a double-focusing mass analyser with a hydride generation interface. **Talanta**, v. 50, p. 207–217, 1999.

LARSEN, E. H. et al. Selenium speciation and isotope composition in ⁷⁷Se-enriched yeast using gradient elution HPLC separation and ICP-dynamic reaction cell-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, n. 4, p. 310–316, 2003.

LEÓN, C. A. P. et al. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal of Applied Microbiology**, n. 92, p. 602–610, 2002.

LI, F.; GOESSLER, W.; IRGOLIC, K. J. Determination of trimethylselenonium iodide, selenomethionine, selenious acid, and selenic acid using high-performance liquid chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass

spectrometry or flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 337–344, 1999.

LINSINGER, T. **Comparison of a measurement result with the certified value.** Disponível em: <http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_english_rev3.pdf>. Acesso em: 3 maio. 2017.

LIRA, C. R. G. et al. Nutracêuticos: aspectos sobre segurança, controle de qualidade e legislação. **Rev. Bras. Farm**, v. 90, n. 1, p. 45–49, 2009.

LOPEZ HERAS, I.; PALOMO, M.; MADRID, Y. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. **Anal Bioanal Chem**, v. 400, n. 6, p. 1717–1727, 2011.

LUO, Y. et al. Speciation of Selenium, Arsenic, and Zinc in Class C Fly Ash. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 7, p. 2980–2987, 2011.

MACFARQUHAR, J. K. et al. Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement. **Arch Intern Med.**, v. 170, n. NO. 3, p. 256–261, 2010.

MANUEL MARCHANTE-GAYÓN, J. et al. Comparison of different nebulisers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n. 9, p. 1093–1102, 2000.

MCLAFFERTY, F. .; TURECEK, F. **Interpretation of mass spectra.** 4th. ed. [s.l.: s.n.].

MCSHEEHY, S. et al. Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS and electrospray MS-MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, n. 1, p. 68–73, 2001.

MÉNDEZ, S. P.; GONZÁLEZ, E. B.; SANZ-MEDEL, A. Enantiomeric separation of selenoaminoacid derivatives by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography using a mixed micellar system of sodium dodecyl sulphate and taurodeoxycholic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 416, p. 1–7, 2000.

MESKO, M. F. et al. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 307, n. 1–3, p. 123–136, 2011.

MESTER, Z. et al. Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-

1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 1, p. 168–180, 2006.

MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I.; MOHAN, H. **One-electron oxidation of selenomethionine in aqueous solutions**. Disponível em: <<http://www.barc.gov.in/publications/nl/2005/200510-18.pdf>>. Acesso em: 3 maio. 2017.

MONTASER, A. (ED.). **Inductively coupled plasma mass spectrometry**. Washington: [s.n.].

MONTES-BAYON, M. et al. Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1287–1293, 2006.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society reviews**, v. 38, p. 1119–1138, 2009.

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109–121, 2012.

OLIVEIRA, C. G. R. DE. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Biomassa de Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2006.

P. RODRIGUEZ-GONZALEZ et al. Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 3, p. 239, 2010.

POLATAJKO, A. et al. Quantification of a Selenium- containing protein in yeast extract via an accurate determination of a tryptic peptide by species-specific isotope dilution capillary HPLC-ICP-MS. **Chemia analityczna**, n. 50, p. 265, 2005.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **Br J Nutr**, v. 100, n. 2, p. 238–253, 2008.

REID, M. E. et al. A report of high-dose selenium supplementation: Response and toxicities. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 1, p. 69–74, 2004.

REYES, L. H. et al. Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine:

application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis-HPLC-ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom**, v. 19, p. 1230–1235, 2004.

REYES, L. H. et al. Selenium bioaccessibility assessment in selenized yeast after “in vitro” gastrointestinal digestion using two-dimensional chromatography and mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1110, n. 1–2, p. 108–116, 2006a.

REYES, L. H. et al. Application of Isotope Dilution Analysis for the Evaluation of Extraction Conditions in the Determination of Total Selenium and Selenomethionine in Yeast-Based Nutritional Supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 1557–1563, 2006b.

ROCHA, M. S. et al. Selenium: Essentiality, Toxicity, Dietary Supplementation and Analytical Challenges. In: **Selenium: Dietary Sources, Properties and Role in Human Health**. [s.l: s.n.].

RODRIGUEZ-CEA, A. et al. Metal speciation of metallothionein in white sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 963–969, 2006.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. et al. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 2, p. 151–207, fev. 2005.

ROMAN, M. et al. Selenium speciation in rat colon tissues. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 1, p. 100, 2011.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588–590, 1973.

ROTTMANN, L.; HEUMANN, K. G. Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 350, n. 4–5, p. 221–227, 1994.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M. et al. Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, v. 88, p. 272–276, 2012.

SANZ-MEDEL, A. From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics. **Anal Bioanal Chem**, v. 381, n. 1, p. 1–2, 2005.

SARMENTO, R. F. DE O. Revisões Sistemáticas em Terapia Intensiva - Suplementação de Selênio. **Medicina perioperatoria**, v. 101, p. 903–912, 2006.

SILVA, L. et al. Comparison of procedures for selenium species extraction from selenized yeast and evaluation of associated uncertainties. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 12, p. 499, 2013.

SIMMONS, D. B. D.; WALLSCHLÄGER, D. A critical review of the biogeochemistry and ecotoxicology of selenium in lotic and lentic environments. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 24, n. 6, p. 1331–1343, 2005.

SORMO, E. G. et al. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. **Environ Sci Technol**, v. 45, n. 15, p. 6561–6566, 2011.

SOUZA PESSÔA, G. DE et al. Ion mobility mass spectrometry: an elegant alternative focusing on speciation studies. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 1, p. 201, 2011.

STÜRUP, S.; BENDAHL, L.; GAMMELGAARD, B. Optimization of LC-DRC-ICP-MS for the speciation of selenotrisulfides with simultaneous detection of sulfur and selenium as oxides combined with determination of elemental and isotope ratios. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 2, p. 201, 2006.

SUCHAROVÁ, J. Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 9, p. 1756, 2011.

SUTTON, K.; SUTTON, R. M. C.; CARUSO, J. A. Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 789, p. 85–126, 1997.

TANNER, S. D.; BARANOV, V. I.; BANDURA, D. R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: A tutorial review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 9, p. 1361–1452, 2002.

TEMPLETON, D. M. et al. GUIDELINES FOR TERMS RELATED TO CHEMICALSPECIATION AND FRACTIONATION OF ELEMENTS. DEFINITIONS, STRUCTURAL ASPECTS, AND METHODOLOGICAL APPROACHES. **Pure Appl. Chem.**, v. 72, n. No. 8, p. 1453–1470, 2000.

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: A review. **Toxicology Letters**, v. 137, n. 1–2, p. 103–110, 2003.

TSOI, Y. K.; LEUNG, K. S. Toward the use of surface modified activated carbon in speciation: selective preconcentration of selenite and selenate in environmental waters. **J Chromatogr A**, v. 1218, n. 16, p. 2160–2164, 2011.

VACCHINA, V. et al. Simultaneous speciation of selenomethionine and 2-hydroxy-

4-methylselenobutanoic acid by HPLC-ICP MS in biological samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 15–16, p. 1178–1180, 2010.

VALIENTE, L. et al. Determination of selenium in dietary supplements by ETAAS and HG-AAS: A comparative study. **Atomic spectroscopy**, v. 23, n. 4, p. 105–142, 2002.

WACHOWICZ, B.; ŻBIKOWSKA, H. M.; NOWAK, P. SELENIUM COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENT; THEIR EFFECT ON HUMAN HEALTH. **CELL. BIOL. MOL. LETT.**, v. Vol. 6, n. No. 2, p. 375–381, 2001.

WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 11, 2007.

WHO. Selenium in Drinking-water Background document for development of. v. 2, 1996.

WHO; FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2 Edition ed. [s.l: s.n.].

WRÓBEL, K. et al. HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves - A potential dietary source of Se-methylselenocysteine. **Food Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 617–623, 2004.

WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S.; CARUSO, J. A. Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of selenomethionine in yeast and nuts. **Anal Bioanal Chem**, v. 375, n. 1, p. 133–138, 2003.

XU, H.; FREITAS, M. A. A mass accuracy sensitive probability based scoring algorithm for database searching of tandem mass spectrometry data. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 133, 2007.

XU, H.; FREITAS, M. A. Monte Carlo Simulation-Based Algorithms for Analysis of Shotgun Proteomic Data. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 7, p. 2605–2615, jul. 2008.

XU, H.; YANG, L.; FREITAS, M. A. A robust linear regression based algorithm for automated evaluation of peptide identifications from shotgun proteomics by use of reversed-phase liquid chromatography retention time. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 347, 2008.

XU, H.; ZHANG, L.; FREITAS, M. A. Identification and Characterization of Disulfide

Bonds in Proteins and Peptides from Tandem MS Data by Use of the MassMatrix MS/MS Search Engine. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 1, p. 138–144, jan. 2008.

YAMASHITA, Y. et al. Selenoneine, total selenium, and total mercury content in the muscle of fishes. **Fisheries Science**, v. 77, n. 4, p. 679–686, 2011.

YANG, L. et al. Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1055, n. 1–2, p. 177–184, 2004.

YILMAZ, Ü. T.; SOMER, G. Investigation of polarographic interference between Se(IV) and Cr(VI), its elimination and application to Gerede river water. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 633, n. 1, p. 193–197, 2009.

ZENG, H. Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1263–1278, 2009.

7 Anexos

7.1

Detalhamento da estimativa da incerteza de medição

A estimativa da incerteza de medição foi realizada empregando o método relativo de acordo com os guias ISO GUM e EURACHEM. Como mostrado no diagrama de Ishikawa (Fig 1) as principais fontes de incerteza foram consideradas e algumas delas (C_0 and df) contribuem diretamente na quantificação do mensurando e outras fontes (u_{st} and u_{rep}) são inerentes ao processo de medição.

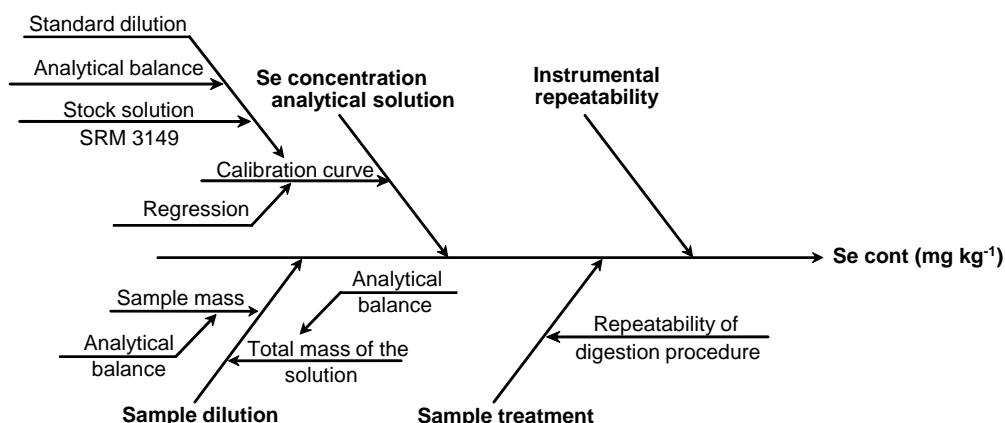


Figura 1. Ishikawa (cause and effect) diagram of the uncertainties for the proposed method of Se determination

Dessa forma, a definição do mensurando pode ser descrita pela Eq 13.

$$Se_{cont} = \frac{C_0 \times df \times f_{st} \times f_{rep}}{1000} \quad (13)$$

Se_{cont} = Concentração de selênio na amostra de levedura (mg kg^{-1})

C_0 = Concentração de selênio na solução analítica ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

df = Fator de diluição da amostra

f_{st} = Fator do tratamento da amostra

f_{rep} = Fator da repetibilidade instrumental

A concentração da amostra foi obtida mediante o uso de uma curva de calibração externa. Os padrões de calibração (St) foram preparados por diluição gravimétrica da solução de calibração NIST SRM 3149 e essas diluições foram consideradas como fonte de incerteza de acordo com a Eq. (14).

$$u_{dil} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (u_{St})^2} \quad (14)$$

Onde u_{dil} é a incerteza padrão associada com a diluição dos padrões da curva de calibração e u_{St} é a incerteza padrão associada com a diluição de cada padrão da curva de calibração.

O valor da incerteza padrão de cada padrão da curva de calibração u_{St} pode ser calculado pela Eq. (15) e leva em consideração a concentração e a incerteza da solução estoque (C_s e u_{Cs}), a massa e a incerteza padrão da massa de padrão pesado (sm e u_{sm}) e a massa e a incerteza da massa total da solução (ms e u_{ms}).

$$u_{(St)} = \sqrt{\left(\frac{u_{Cs}}{C_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{sm}}{sm}\right)^2 + \left(\frac{u_{ms}}{ms}\right)^2} \quad (15)$$

Nota: As incertezas-padrão das massas do padrão e da solução (u_{sm} e u_{ms}) foram obtidas pela divisão da incerteza expandida (U) pelo fator de abrangência, ambos indicados no certificado de calibração da balança analítica.

A incerteza da concentração da solução de estoque foi calculada de maneira semelhante de acordo com a Eq. (16), porém empregando os dados constantes no certificado do SRM NIST 3149.

$$u_c = \frac{U}{k} \quad (16)$$

O ajuste linear obtido pelo método dos mínimos quadrados também é uma fonte de incerteza (u_{reg}). De acordo com EURACHEM, esse componente de incerteza pode ser estimado pela Eq. (17).

$$u_{reg} = \frac{\frac{S_{res}}{B_1} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}}{C_0} \quad (17)$$

Onde u_{reg} é a incerteza padrão associada ao ajuste linear da curva de calibração, S_{res} é o desvio padrão residual da regressão que pode ser obtido mediante emprego da equação (18) e (19), B_1 é o coeficiente angular da curva de calibração, C_0 é a concentração da solução analítica, p é o número de medições da curva de calibração, n é o número de replicas de leitura da amostra, S_{xx} é obtido pela equação (20) e \bar{C} é o valor médio das concentrações da curva de calibração.

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (I_j - I_{esp})^2}{n-2}} \quad (18)$$

$$I_{esp} = B_1 x + B_0 \quad (19)$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2 \quad (20)$$

Combinando u_{dil} com u_{reg} pela raiz da soma quadrática, a incerteza padrão associada a concentração de selênio na solução analítica (u_{C0}) foi obtida de acordo com a Eq. (21)

$$u_{C0} = \sqrt{u_{dil}^2 + u_{reg}^2} \quad (21)$$

Outra fonte que contribui para a incerteza global é a incerteza relacionada a diluição da amostra (u_{df}), que possui relação direta com a incerteza da massa de amostra medida durante o processo de diluição e foi obtida pela Eq. (22).

Para garantir aderência ao SI, todas as soluções foram preparadas empregando a abordagem gravimétrica empregando uma balança devida calibrada com pesos padrão rastreáveis.

$$u_{df} = \sqrt{\left(\frac{u_{sm}}{sm}\right)^2 + \left(\frac{u_{tms}}{tms}\right)^2} \quad (22)$$

Onde u_{df} é a incerteza padrão da diluição da amostra, u_{sm} é a incerteza da massa de amostra, sm é a massa de amostra, u_{tms} é a incerteza da massa total da solução.

O procedimento de digestão das amostras (u_{st}) também foi considerado como uma fonte de incerteza por se tratar de uma fonte de variabilidade inerente ao tratamento das amostras e foi estimada pela Eq. (23).

$$u_{st} = \frac{RSD_{vessel}}{\sqrt{n}} \quad (23)$$

Onde u_{st} é a incerteza padrão do tratamento das amostras, RSD_{vessel} é o desvio padrão relativo das concentrações obtido entre os vasos de digestão do HPA-S e n é o número de vasos de digestão ($n=3$).

A incerteza associada a repetibilidade instrumental possui uma importante contribuição na incerteza final e pode ser estimada de acordo com a Eq. (24).

$$u_{rep} = \frac{SD_{Int}}{X_{Int}} \quad (24)$$

Onde u_{rep} é a incerteza relativa da repetibilidade instrumental, SD_{int} e X são o desvio padrão e a média das intensidades obtidas para a amostra na solução analítica respectivamente.

Finalmente a incerteza combinada (u_{comb}) foi calculada pela Eq. (25). Neste trabalho, cada fonte de incerteza foi obtida em sua forma relativa, então u_{comb} foi obtida pela raiz da soma quadrática das fontes individuais de incerteza obtidas previamente, como segue.

$$u_{comb} = \sqrt{(u_{df})^2 + (u_{Co})^2 + (u_{rep})^2 + (u_{st})^2} \quad (25)$$

Como descrito no EURACHEM, as incertezas podem ser classificadas em tipo A e tipo B. As incertezas do tipo A é associada com análises estatísticas de uma serie de observações, enquanto que as incertezas do tipo B são obtidas de outras fontes que não repetições estatísticas como certificados de calibração, etc. Esta discriminação é importante para o cálculo dos graus de liberdade efetivos (v_{eff}) que são necessários para encontrar o fator de abrangência (k) que é usado para a obtenção da incerteza expandida (U).

Para calcular os graus de liberdade efetivos (ν_{eff}) a incerteza padrão combinada e as incertezas do tipo A são consideradas de acordo com a equação de Welch-Satterthwaite, Eq. (26).

$$\nu_{eff} = \frac{u_{comb}^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4}{(n_i - 1)}} \quad (26)$$

Onde u_{comb} é a incerteza padrão combinada e u_i são os componentes de incerteza individuais do tipo A (u_{reg} , u_{st} , and u_{rep}). O fator de abrangência (k) foi obtido através da distribuição *t-student* distribution para 95% de nível de confiança.

A incerteza expandida foi calculada pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência (k), como mostrado na Eq. (27).

$$U = k \cdot u_{comb} \quad (27)$$

Onde k é o fator de abrangência para os graus de liberdade efetivos (ν_{eff}) a 95% de nível de confiança e U é a incerteza relativa expandida.

A incerteza final é obtida pela multiplicação da incerteza expandida relativa pelo mensurando, a concentração de selênio nas amostras de levedura.

7.2

Incerteza de medição espécie-não específica

A estimativa da incerteza de medição para a análise por diluição isotópica espécie-não específica foi realizada de acordo com a lei de propagação de erros. Para tanto, foram determinadas as equações diferenciais da definição do mensurando (equação de fluxo mássico), como segue:

Equação de fluxo mássico:

$$MFS = C_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right)$$

Equação geral para estimativa da incerteza de medição:

$$u_{MFS} = \sqrt{\left(\left(\frac{\partial M_s}{\partial C_{sp}} \right)^2 u_{C_{sp}}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial d_{sp}} \right)^2 u_{d_{sp}}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial f_{sp}} \right)^2 u_{f_{sp}}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial A_{ws}} \right)^2 u_{A_{ws}}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial A_{sp}^b} \right)^2 u_{A_{sp}^b}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial R_m} \right)^2 u_{R_m}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial R_{sp}} \right)^2 u_{R_{sp}}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial w_{sp}} \right)^2 u_{w_{sp}}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial A_s^a} \right)^2 u_{A_s^a}^2 + \left(\frac{\partial M_s}{\partial R_s} \right)^2 u_{R_s}^2} \quad E$$

Derivadas parciais:

$$\frac{\partial M_s}{\partial C_{sp}} = d_{sp} \times f_{sp} \times \left[\frac{A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_{sp})}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right]$$

$$\frac{\partial M_s}{\partial d_{sp}} = C_{sp} \times f_{sp} \times \left[\frac{A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_{sp})}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right]$$

$$\frac{\partial M_s}{\partial f_{sp}} = C_{sp} \times d_{sp} \times \left[\frac{A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_{sp})}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right]$$

$$\frac{\partial M_s}{\partial A_{ws}} = C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times \left[\frac{A_{sp}^b \times R_m}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right]$$

$$\frac{\partial Ms}{\partial A_{sp}^b} = C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times \left[\frac{A_{ws} \times R_m}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right]$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial Ms}{\partial R_m} = & C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times \left[\frac{A_{ws} \times A_{sp}^b}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right] + A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_{sp}) \\ & \times \left[\frac{A_{wsp} \times A_s^a \times R_s}{(A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - R_m R_s))^2} \right] \end{aligned}$$

$$\frac{\partial Ms}{\partial R_{sp}} = - \left[C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times \left(\frac{1}{A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s))} \right) \right]$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial Ms}{\partial w_{sp}} = & - \left[C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_s) \right. \\ & \times \left. \left(\frac{A_s^a \times (1 - R_m R_s)}{(A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s)))^2} \right) \right] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial Ms}{\partial A_s^a} = & - \left[C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_s) \right. \\ & \times \left. \left(\frac{A_{wsp} \times (1 - R_m R_s)}{(A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s)))^2} \right) \right] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial Ms}{\partial R_s} = & - \left[C_{sp} \times d_{sp} \times f_{sp} \times A_{ws} \times A_{sp}^b \times (R_m - R_s) \right. \\ & \times \left. \left(\frac{A_{wsp} \times A_s^a \times R_m}{(A_{wsp} \times A_s^a \times (1 - (R_m R_s)))^2} \right) \right] \end{aligned}$$

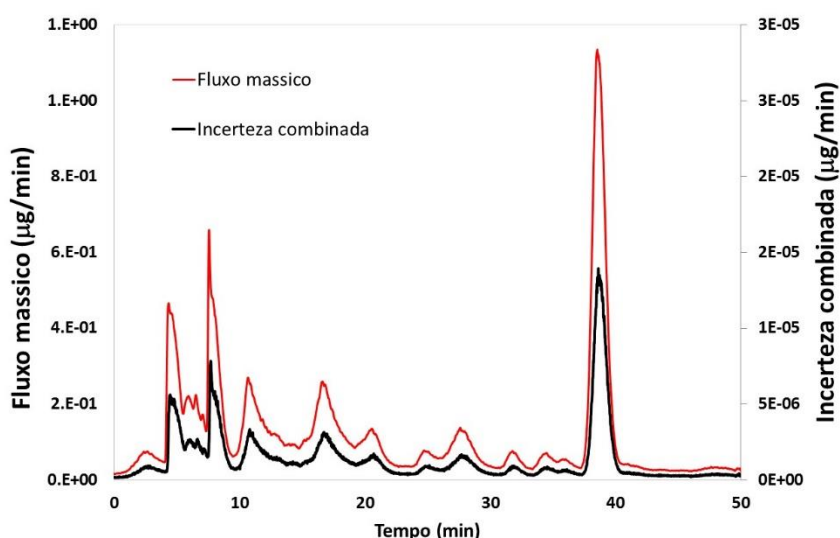
Uma particularidade da aplicação da diluição isotópica espécie-não específica reside no fato de que a solução do padrão enriquecido isotopicamente é adicionada em linha ao efluente da coluna cromatográfica e dessa forma, a estimativa da incerteza de medição foi realizada aplicando as equações

desenvolvidas a cada ponto do cromatograma, como exemplificado na figura abaixo:

15	Time min	R 78/74 (Se)	Csp	dsp	fsp	Awsp	A ^b _{sp}	Rm	Rsp	Awsp	A ^b _s	Rs	uc
16	0.02	2E-02	3E-15	3E-16	4E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	6E-20	2E-18	3E-24	2E-07
17	0.03	2E-02	3E-15	3E-16	3E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	5E-20	2E-18	3E-24	2E-07
18	0.05	2E-02	4E-15	4E-16	5E-14	6E-20	2E-16	0E+00	1E-22	7E-20	3E-18	5E-24	2E-07
19	0.06	2E-02	2E-15	2E-16	3E-14	4E-20	1E-16	0E+00	1E-22	4E-20	2E-18	2E-24	2E-07
20	0.08	2E-02	3E-15	3E-16	4E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	6E-20	3E-18	3E-24	2E-07
21	0.09	2E-02	3E-15	3E-16	4E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	6E-20	2E-18	3E-24	2E-07
22	0.11	2E-02	3E-15	3E-16	4E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	5E-20	2E-18	3E-24	2E-07
23	0.12	2E-02	3E-15	2E-16	3E-14	4E-20	1E-16	0E+00	1E-22	4E-20	2E-18	2E-24	2E-07
24	0.14	2E-02	3E-15	3E-16	3E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	5E-20	2E-18	3E-24	2E-07
25	0.16	2E-02	3E-15	3E-16	4E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	6E-20	3E-18	3E-24	2E-07
26	0.17	2E-02	3E-15	3E-16	4E-14	5E-20	2E-16	0E+00	1E-22	6E-20	2E-18	3E-24	2E-07
27	0.19	2E-02	3E-15	3E-16	3E-14	4E-20	2E-16	0E+00	1E-22	5E-20	2E-18	2E-24	2E-07
28	0.20	2E-02	2E-15	2E-16	3E-14	4E-20	1E-16	0E+00	1E-22	4E-20	2E-18	2E-24	2E-07
29	0.22	2E-02	3E-15	2E-16	3E-14	4E-20	2E-16	0E+00	1E-22	5E-20	2E-18	2E-24	2E-07
30	0.23	2E-02	3E-15	2E-16	3E-14	4E-20	2E-16	0E+00	1E-22	5E-20	2E-18	2E-24	2E-07

No destaque em amarelo da figura acima, pode-se observar o resultado da propagação das incertezas para cada ponto do cromatograma, sendo esta coluna a incerteza combinada.

De posse desses dados, pode-se plotar um cromatograma com os resultados da incerteza padrão combinada como mostrado na figura abaixo.



Como pode-se observar na figura acima, o perfil cromatográfico obtido para o cálculo da incerteza combinada é exatamente o mesmo ao obtido para o fluxo mássico do mensurando, dessa forma, a simples integração dos picos de interesse (selenometionina ~40 min) fornecerá os resultados da massa de selênio presente na amostra injetada bem como a incerteza padrão combinada. Para o exemplo acima o resultado obtido foi $142 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$, já considerando a diluição das amostras.

7.3

Artigos publicados

7.3.1 – Artigo publicado na revista *Food Analytical Methods*

Food Anal. Methods
DOI 10.1007/s12161-017-0861-y



Dynamic Reaction Cell-ICP-MS as a Powerful Tool for Quality Control of a Se-Enriched Dietary Supplement

Jefferson Rodrigues de Souza^{1,2} · Lilian da Silva¹ · Márcia Silva da Rocha¹ · Tatiana Dillenbourg Saint'Pierre²

Received: 20 September 2016 / Accepted: 6 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract The aim of this work was to evaluate different approaches employing a reaction cell to circumvent spectral interferences over $^{80}\text{Se}^+$ to increase the sensitivity in the determination of Se by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Different gases (NH_3 , CH_4 , and O_2) were employed, and the operating conditions were optimized by a central composite design, evaluating the effect of the reaction gas flow rate and the rejection parameter q (Rpq) on the limit of detection (LOD) of the method. All reaction gases studied reduced the interference by $^{40}\text{Ar}_2^+$ over $^{80}\text{Se}^+$, reducing the LOD when compared to the LOD obtained with ICP-MS operating in the standard mode ($\text{LOD} = 0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$). A better LOD ($0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$) was obtained with CH_4 , while $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ was the LOD with NH_3 . The use of O_2 as a reaction gas enabled the determination of Se at m/z 96 ($^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$) with adequate analytical performance ($\text{LOD} = 0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$). The accuracy of the method was evaluated by analyzing the certified reference material (CRM) Selm-1, and the results obtained ranged from 99 to 104% of the certified value. In addition, Se dietary supplements of four different brands and commercial yeast were analyzed, and the major sources of uncertainty were studied. The dietary supplements followed the criteria adopted by Brazilian legislation, although the uncertainty study highlighted the great

variation in the Se content of each brand. Clearly, the manufacturing process of dietary supplements needs more rigorous quality control, considering that this product can affect the health of consumers.

Keywords Selenium · ICP-MS · Reaction cell · Dietary supplement · Yeast sample

Introduction

Selenium is an essential element in the antioxidant function of some enzymes. Selenium-deficient diets are known to be responsible for some health disorders such as Keshan disease (a cardiomyopathy that affects women of childbearing age) and Kaschin-Beck disease (an articular disease that results in bone damage) (Chen et al. 1980; Ge and Yang 1993). To minimize the impact of a Se-deficient diet, Se-enriched dietary supplements are commonly used. In this case, it is important to know the Se chemical form, since the organic Se is more bioavailable than inorganic Se in biochemical processes. Commercial Se supplements are widely used and generally are obtained from *Saccharomyces cerevisiae* enriched in organic Se, which has selenomethionine as the main species.

Although Se is considered an important element in biological processes, the limit between its essentiality and its toxicity is narrow, and it is very important to control the ingestion of Se in a diet (Reid et al. 2004). The occurrence of Se intoxication is rare, but a critical poisoning of 201 people by ingestion of a Se dietary supplement occurred in 2001 in different American states. The US Food and Drug Administration (FDA) laboratories demonstrated that the Se content in the commercialized supplement was approximately 200 times higher than indicated by the labeled value (MacFarquhar et al. 2010). Veatch and co-workers (Veatch et al. 2005)

✉ Jefferson Rodrigues de Souza
jeffersonrodriguesdesouza@yahoo.com.br

¹ National Institute of Metrology, Quality, and Technology (INMETRO), Duque de Caxias, RJ, Brazil

² Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro (PUC-Rio), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

quantified Se in different brands of dietary supplements and reported that the concentrations in micrograms per tablet were higher than the labeled value in 14 of the 15 products analyzed. In this study, measured values differed from -7 to $+39\%$ relative to stated values.

The easy access to dietary supplements makes their uncontrolled use common, which can be potentially dangerous, highlighting the necessity of rigorous quality control in manufacturing and commercialization. For example, in Brazil, in 2014, problems related to misformulated dietary supplements, considering the content of protein and carbohydrate (R7 2014), the origin of the protein (vegetal or animal), and the presence of non-declared substances (INMETRO 2014), considered most samples inadequate for commercialization.

The biological importance of Se made it the focus of many scientific works developing analytical methods to enable the accurate and precise determination of Se in complex matrices (Stivanin de Almeida et al. 2009; Sucharová 2011; De Albuquerque et al. 2012; da Silva and Arruda 2013). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is the most powerful technique for fast elemental determination due to the multi-elemental capacity and the wide linear range. This technique is also useful for Se, which is not totally ionized in the plasma and is subject to spectral interferences in all isotopes. The most abundant isotope ($^{80}\text{Se}^+$, 49.61%) encounters interference mainly from the argon dimer ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) and the less abundant isotopes ($^{76}\text{Se}^+$ 9.37%, $^{77}\text{Se}^+$ 7.63%, $^{78}\text{Se}^+$ 23.77%, $^{82}\text{Se}^+$ 8.73%) used to be employed for quantification, but all of these isotopes are interfered with at some level by polyatomic ions generated mainly with Ar, by recombination in the plasma with other common elements ($^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^+$), which are also called argide ions (Lum and Leung 2016). In addition, interference by doubly charged ions from rare earth elements (REEs) can be of concern for the analysis of specific samples (Bishop et al. 2015). As mentioned by D'Ilio et al. (2011), to solve the problems related to spectral interferences over $^{80}\text{Se}^+$, it is necessary to use a high-resolution ICP-MS operating at a resolution ($m/\Delta m$) of 9521.

The dynamic reaction cell (DRC) was developed to solve problems related to spectral overlap for low-resolution ICP-MS spectrometers. The DRC is a multipole, operating as a mass filter, similar to the quadrupole, by applying electric and radio frequency fields to each pair of poles (Tanner et al. 2002). The DRC is inside a low-pressure compartment, in which a reaction gas (H_2 , NH_3 , CH_4 , O_2 , etc.) is added to react with interfering species, changing their m/z ratio, to eliminate them before the ion beam reaches the quadrupole. Therefore, the reaction gas should be chosen considering the expected interfering species and the analyte of interest. Naturally, there are many possible mechanisms that can occur inside the reaction cell, such as charge transfer, proton transfer, hydrogen transfer, and atom transfer (Iglesias et al. 2002). Knowing the mechanisms and

thermodynamic parameters can help to choose the reaction gas and the best operating conditions for each situation (Lum and Leung 2016). In the case of charge transfer reactions, the potential of ionization (PI) can be used to estimate the thermodynamic probability of the reaction between the reaction gas and the interfering species or the analyte.

Concerning Se determination, the spectral interferences caused by argide ions or by doubly charged REEs over every Se isotope can be eliminated by many different approaches. Tanner et al. (2002) demonstrated that the same reaction gases used to solve the spectral overlap of Ar, ArH, ArO, etc., can be employed for argide ions. In the case of interference by doubly charged ions from REEs, according to Jackson and co-workers (Jackson et al. 2015), the PI of these reactions is between 11 and 12 eV, making the reaction with ammonia (PI ~ 10 eV) thermodynamically allowed. However, the same is not true for methane, for which the ionization potential is 12.6 eV. Hydrogen was used as the reaction gas to circumvent the problems related to doubly charged REEs over Se isotopes. The employment of oxygen as the reaction gas was an option for eliminating interference over selenium, by a mass shift reaction, and monitoring Se at m/z 96. Sucharová (2011) evaluated the employment of ammonia and methane for selenium determination in plants, and ammonia was the reaction gas of choice considering the best performance in solving the spectral interference by a doubly charged REEs. "The use of methane as the reaction gas was impaired by the presence of interfering species such as Br, which in the plasma forms the interfering species $^{79}\text{Br}^1\text{H}^+$ over $^{80}\text{Se}^+$ at high concentrations in the sample matrix. In another paper, Bishop et al. (2015) evaluated the efficiency of He, H_2 , and O_2 as collision/reaction gases for the determination of selenium in serum samples in the presence of gadolinium using ICP-MS/MS. The authors concluded that He as the collision gas and H_2 as the reaction gas at low flow rates were not able to eliminate the interference of doubly charged Gd. However, at higher flow rates, hydrogen considerably reduced the incidence of $^{156}\text{Gd}^{2+}$. The authors finally concluded that the employment of oxygen in the mass shift reaction was the most effective in solving the problems related to the spectral interference of doubly charged gadolinium over the selenium isotopes. Hu and co-workers (Hu et al. 2016) developed a method to perform an accurate quantification of As and Se in food plant samples by ICP-MS/MS, studying H_2 , O_2 , and He as reaction/collision gases. All gases could significantly reduce the spectral interferences over selenium isotopes in a matrix containing 100 mg L^{-1} of Ca and $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ Se. However, H_2 and O_2 showed better performance with all isotopes studied ($^{77}\text{Se}^+$, $^{78}\text{Se}^+$, $^{80}\text{Se}^+$, and $^{82}\text{Se}^+$). The same behavior was not observed when the authors simulated a sample matrix containing $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of Se and $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of REEs. In this case, only the reaction gases could solve the interferences from doubly charged REEs. In another attempt to solve the spectral

interferences over selenium isotopes, Bolea-Fernandez et al. (2015) evaluated CH_3F as a reaction gas. This approach is interesting once CH_3F reacts with selenium to generate $^{80}\text{SeCH}_2^+$ ($m/z = 94$), a species free of known interferences. Considering the importance of selenium to the diet, Kubachka et al. (2017) developed a method to investigate the selenium composition in a dietary supplement for quality control purposes in a routine analysis using hydrogen as the reaction gas. The authors report that this method can be used for the quality control of dietary supplements, which is becoming increasingly important for sub-populations that need to control selenium intake.

The goal of this work was to evaluate different reaction gases (CH_4 , NH_3 , and O_2) and different conditions to resolve the spectral interferences over Se determination by ICP-MS, applying this analytical method for Se determination in dietary supplements and in its main raw material (yeast enriched in selenium). These approaches intend to provide reliable results, thus assuring food safety and helping the manufacturer of dietary supplements to pay attention to the food safety criteria of the product and, consequently, the safety of customers.

Materials and Methods

Reagents and Samples

Hydrogen peroxide and nitric acid (both from Merck, Darmstadt, Germany) were used for sample decomposition. The nitric acid was purified by sub-boiling distillation in a quartz still (Duo-PUR, Milestone, USA) and also used to prepare internal standards and calibration solutions. Distilled water was deionized in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) to a minimum resistivity of 18 M Ω cm.

Argon (Ar, 99.9996%) was used as the plasma gas. Methane (CH_4 , 99.995%), ammonia (NH_3 , 99.999%), and oxygen (O_2 , 99.995%) were used as reaction gases. All gases were supplied by White Martins Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Other gases not available in the laboratory were not studied.

A solution containing 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of Mg, In, U, Ce, and Ba (PerkinElmer, Brazil) was employed for the daily performance optimization of the ICP-MS spectrometers.

A 0.2- $\mu\text{g kg}^{-1}$ Ga solution (SRM NIST 3119a, USA) was used as the internal standard.

The calibration solutions were prepared by gravimetric dilution in HNO_3 (2%, v/v) from a Se standard reference material (SRM) NIST 3149 (10,042 mg kg^{-1} Se solution, from the National Institute of Standards and Technology, NIST, USA).

The Se-enriched yeast certified reference material (CRM) SELM-1 (2059 \pm 64 mg kg^{-1} for total Se, from the National Research Council Canada [NRCC], Canada) was employed for method optimization and accuracy checking.

A commercial yeast sample with approximately 2000 mg kg^{-1} of Se was kindly supplied by Biorigin (São Paulo, Brazil). The yeast sample had a calcium concentration of the same order of magnitude as Se, approximately 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in the sample, which corresponds to approximately 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in the optimization solution.

Samples of Se dietary supplements of four different brands were purchased from a local market and codified as follows: A (27 $\mu\text{g Se/12 tablets}$), B (Se content not listed), C (34 $\mu\text{g Se/tablet}$), and D (34 $\mu\text{g Se/tablet}$).

Equipment

A high-pressure asher (HPA-S), from Anton Paar (Graz, Austria), was used for sample decomposition, and an analytical balance with resolution of 0.01 mg (model ME 235S), from Sartorius (Göttingen, Germany), was used for samples and calibration solution preparation.

Two ICP-MS spectrometers (DRC II and NexIon 300X, both from PerkinElmer, USA) were employed for Se determination in the dietary supplements and yeast samples. The optimization of plasma conditions was carried out by the daily performance procedure, recommended by PerkinElmer, to assure a compromise between maximum sensitivity in the entire mass spectrum ($^{24}\text{Mg}^+$, $^{115}\text{In}^+$, $^{208}\text{U}^+$) and minimum levels of oxides (CeO^+) and doubly charged (Ba^{++}) ions. The internal standard was introduced in line via a t-connector with all solutions (blanks, calibration standards, and samples) to correct instrumental drift and transport effects. Different approaches were evaluated to minimize the spectral interferences over $^{80}\text{Se}^+$. The DRC II model equipment employed NH_3 and the NexIon 300X employed CH_4 and O_2 .

An inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) spectrometer (Ultima 2, Horiba-Jobin Yvon, Longjumeau, France) was used as an independent technique to compare to the results obtained by ICP-MS. The methodology employed was adapted from Silva et al. (2013).

All spectrometers were equipped with introduction systems composed of a Meinhard nebulizer and a cyclonic spray chamber (Glass Expansion, USA). The ICP-MS and ICP OES instrumental conditions are summarized in Tables 1 and 2, respectively.

Sample Preparation

The Se-enriched yeast and CRM SELM-1 samples had the humidity gravimetrically determined for correction of the results. This procedure was not applied to dietary supplements because the value stated in the label was not expressed as dry mass.

The dietary supplement samples were macerated and homogenized, and 0.25 g was weighed and decomposed in the quartz flasks of the HPA-S using 3 mL of a 50% (v/v) HNO_3 /

Table 1 ICP-MS operational conditions

Parameter	DRC II	NexIon
RF power (W)	1350	
Plasma gas (L min ⁻¹)	15	
Auxiliary gas (L min ⁻¹)	1.1	
Nebulizer gas (L min ⁻¹)	0.92–0.96	1.0–1.04
Cones	Pt	
Scan mode	Peak-hopping	
Sweeps/reading	5	
Readings/replicate	1	
Replicates	7	
Dwell time (ms)	50	
Detector operation	Dual	
CH ₄ gas flow rate (mL min ⁻¹)	–	0.9
Rpq	–	0.45
Rpa	–	0
NH ₃ gas flow rate (mL min ⁻¹)	1	–
Rpq	0.40	–
Rpa	0	–
O ₂ gas flow rate (mL min ⁻¹)	–	1.6
Rpq	–	0.65
Rpa	–	0

H₂O₂ solution. This equipment operates with a nitrogen atmosphere to assure better control of the digestion process. The sample decomposition was carried out using the program recommended by the software of the HPA-S system: The program started with the maximum heating power to achieve 70 °C, and then the heating rate was lowered to achieve 120 °C over 20 min; the power was increased again to the maximum to achieve 240 °C, and the temperature was kept at this value for 60 min.

After decomposition, the flasks were cooled to room temperature (21 ± 2 °C), and the digested samples were quantitatively transferred to a polypropylene flask.

Table 2 ICP OES operational conditions (Silva et al. 2013)

Parameter	Condition
RF power (W)	1400
Plasma gas (L min ⁻¹)	15
Auxiliary gas (L min ⁻¹)	0.4
Nebulizer gas (L min ⁻¹)	0.8
Acquisition mode	Peak height
Integration points to measure	5
Integration points for calculation	3
Replicates	7
Integration time (s)	1
Spectral line, λ (nm)	Se(I) 196.026

Results and Discussion

Optimization of Dynamic Reaction Cell

Although univariate studies for optimization purposes are widely used, this practice could lead to errors in the determination of the best operating conditions, mainly by failing to consider the possible interaction effects between the variables. To check if the interactions between the parameters of the reaction cell, the reaction gas flow rate and the rejection parameter q , R_{pq} , are statistically significant, a central composite design was carried out by measuring the signal intensity obtained for Se in the blank and in a yeast sample solution with 25 µg kg⁻¹ of Se and approximately 15 µg kg⁻¹ of calcium. These optimizations were carried out with the commercial yeast sample, given by Biorigin, to set the best conditions for the analysis of commercial food supplements. The criterion for reaction cell optimization was the detection limit (DRC_{LOD}), evaluated in a composite central design, using the modified Eq. (1) described by Tanner et al. (2002). DRC_{LOD} does not express the detection limit of the analytical method but is only a tool used for the optimization purposes.

$$DRC_{LOD} = \frac{3 \times \sqrt{I_{Blank}}}{I_{Sample\ Solution} - I_{Blank}} \times C_{Sample\ Solution} \quad (1)$$

Preliminary studies with the different reaction gases, not shown here, were carried out by monitoring the behavior of ⁷⁸Se⁺ and ⁸⁰Se⁺, and due to the higher sensitivity, ⁸⁰Se⁺ was chosen for the following steps of the optimization protocol, described below.

Ammonia as Reaction Gas

Before the multivariate study and to define minimum and maximum values for the ammonia flow rate, a univariate optimization was performed (Fig. 1), keeping the rejection parameter q fixed at 0.4 for a blank solution (HNO₃ 2%) and for a Se-enriched yeast sample solution (25 µg kg⁻¹).

The increasing NH₃ flow rate reduced the signal intensity obtained for m/z 80 in the blank and in the sample solution, when compared to signals obtained in the standard mode (NH₃ flow rate = 0 mL min⁻¹, Se intensities of approximately 5,000,000 cps in both solutions). For higher NH₃ flow rates (up to 1.2 mL min⁻¹), the intensities for the sample solution continued to decrease while remaining constant for the blank solution. This behavior can be attributed to the thermodynamically allowed reaction between NH₃ and Se, as mentioned in the literature (Bouchoux et al. 2012).

Bouchoux et al. (2012) carried out a theoretical investigation of selenium interferences in ICP-MS, evaluating different reaction gases. The authors reported that the formation of

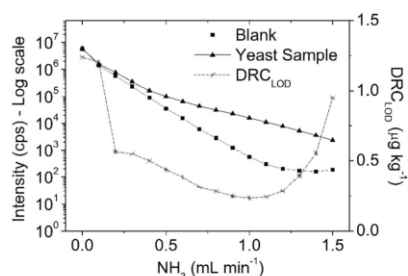


Fig. 1 Effect of NH_3 flow rate on signal obtained at m/z 80, with Rpq of 0.4

SeNH_3^+ (or HSeNH_2^+) and NH_4^+ corresponds to exothermic processes with $\Delta H = -240$ and -50 kJ mol^{-1} , respectively, suggesting the two-step mechanism for this reaction, as shown as follows



These reactions are thermodynamically allowed to occur inside the dynamic reaction cell and are in agreement with the experimental behavior reported by Sucharová (2011). According to these authors, ammonia is a good clustering ligand that is able to generate species of the general form $\text{M}(\text{NH}_3)_n^+$ or ionic condensation products such as $\text{M}(\text{NH})(\text{NH}_3)_n^+$ or $\text{M}(\text{NH}_2)(\text{NH}_3)_n^+$.

Although the formation of these species is undesirable in ICP-MS employing DRC technology, in this case, the reaction between the reaction gas (NH_3) and the interfering species (mainly $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) is faster than the reaction with the analyte ($^{80}\text{Se}^+$), as confirmed by the behavior observed in Fig. 1, allowing its use for analytical purposes. The reaction between $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ and NH_3 is proposed to occur by charge transfer, as shown in the following equation, since the ionization potential of $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ (14.456 eV) is higher than the ionization potential of NH_3 (10.16 eV) (D'Ilio et al. 2011; Bouchoux et al. 2012).



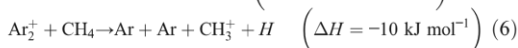
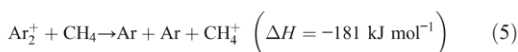
Defined by the limits for the ammonia flow rate, the multivariate optimization by central composite design of the ammonia flow rate and Rpq was carried out, and the resulting Pareto chart and response surface are shown in Fig. 2.

Figure 2a shows that the Rpq demonstrates statistical significance at 95% of the confidence level on the DRC_{LOD} , while the reaction gas flow rate did not affect it significantly. This behavior was expected, since the minimum (0.5 mL min^{-1}) and the maximum (1.5 mL min^{-1}) NH_3 flow rate values employed in the experimental design were selected considering the values obtained in the univariate study. In this experiment, the

intensity for m/z 80 reached a minimum constant value for the blank, indicating that the influence of the $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ species could be disregarded.

Methane as the Reaction Gas

According to Tanner et al. (2002), methane can be used as the reaction gas leading to reactions with polyatomic species of argon. D'Ilio et al. (2011) mentioned that the reaction between CH_4 and $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ occurred by a charge exchange mechanism, since the ionization potential of CH_4 is 12.6 eV, lower than the ionization potential of $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ (approximately 14.456 eV) and confirmed by the enthalpy data for the possible reactions



Then, methane is expected to be adequate for eliminating the interfering species, mainly argon dimer, over selenium isotopes.

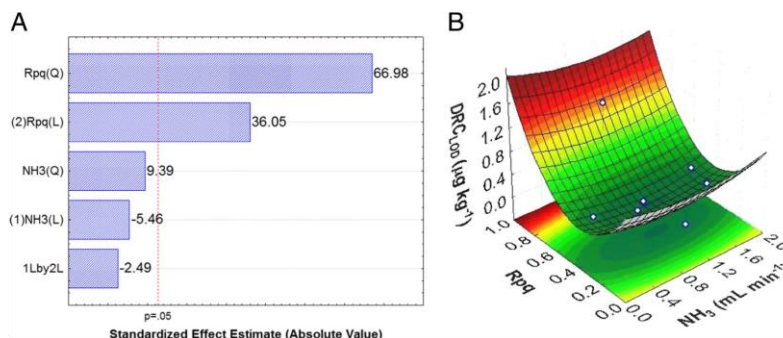
The same optimization protocol used for NH_3 was employed to evaluate the ability of methane to eliminate interfering species over $^{80}\text{Se}^+$ and once again, the interaction factor between reaction gas flow rate (CH_4) and Rpq was not statistically significant (results not shown here).

Figure 3 shows the behavior of methane as the reaction gas for m/z 80, using a blank solution of HNO_3 (2%) and a yeast sample solution of 25 µg kg^{-1} of Se.

As expected, when the equipment was operated in the standard mode, the intensities obtained for the blank and the sample solution were of the same order of magnitude due to the high incidence of spectral overlap by interfering species. Figure 3 shows that the intensity for both solutions was reduced until reaching a complete discrimination between the blank and the sample solution at approximately 0.5 mL min^{-1} CH_4 flow rate. For the sample solution, the signal was reasonably constant up to 1 mL min^{-1} CH_4 flow rate, and then the signal decreased slightly.

Some considerations can be done based on the experimental data obtained in this work. The reaction between CH_4 and $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ is thermodynamically allowed, occurring by means of a charge transfer mechanism. However, the signal intensities decreased for a CH_4 flow rate higher than 1.0 mL min^{-1} , probably due to collisional processes inside the dynamic reaction cell that can cause Se to defocus from the ion beam, considering that the incidence of non-effective collisions is proportional to the quantity of molecules inside the DRC. In this way, the optimization of reaction gas flow rate must be a compromise between reaction efficiency and reduction of analytical signal by collisional processes.

Fig. 2 a Pareto chart and b response surface obtained by central composite design of Rpq and NH₃ flow rate



Oxygen as Reaction Gas

An interesting approach in DRC technology is the possibility of employing a reaction gas to shift the m/z of the analyte by a transfer reaction, and oxygen can be used for this purpose (Stürup et al. 2006; da Silva and Arruda 2013). The reaction between selenium and oxygen is thermodynamically allowed, enabling the analysis of this element by measuring the m/z 96, without the undesirable interference of $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$. In fact, Se reacts with O₂ following Eq. (7)

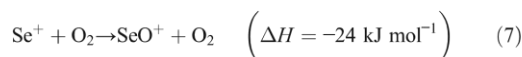


Figure 4a, b shows the univariate experiment carried out to check the feasibility of this approach for the determination of Se in yeast samples.

Figure 4a shows the behavior observed when O₂ was applied as the reaction gas to convert $^{80}\text{Se}^+$ into the $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ species by monitoring the m/z 96. The signal intensity obtained for the sample solution increased slightly with the increase in the O₂ flow rate up to 0.6 mL min⁻¹. However, when the signal-to-background ratio (not shown here) was evaluated, the maximum was obtained at a 1.6 mL min⁻¹ O₂ flow rate.

The reaction between Se and O₂ inside the dynamic reaction cell is not complete because only a small portion of the

total Se converted into the oxidized form (SeO⁺). The efficiency of this reaction was estimated using Eq. (8), at approximately 10%. This statement is in agreement with a previous study described in the literature (Stürup et al. 2006).

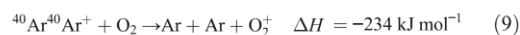
$$\% \text{SeO} = \frac{I_{\text{SeO}}}{I_{\text{SeO}} + I_{\text{Se}}} \times 100 \quad (8)$$

where

I_{SeO} = net intensity at m/z 96

I_{Se} = net intensity at m/z 80

Figure 4b shows the behavior of O₂ as the reaction gas to solve the interference of $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ over $^{80}\text{Se}^+$. Hattendorf and Günther (2003) mentioned that O₂ reacts with $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ by a charge transfer mechanism, according to Eq. 9.



Therefore, as previously demonstrated in that work, the reaction of O₂ with Se also occurred, but to a lesser extent, with the ΔH of -24 kJ mol^{-1} (Hattendorf and Günther 2003; Bandura et al. 2006), which makes possible its use for analytical purposes, as shown in Fig. 4. Therefore, the determination of Se in both m/z ratios (96 and 80) was studied with further experiments.

Figures of Merit

The limit of detection was obtained employing the 3σ of the blank concentration criteria. Table 3 shows the instrumental LODs obtained with the different approaches (different gases and optimized conditions) studied in this work.

The lowest LOD was obtained with CH₄ as the reaction gas, mainly because this gas reacts specifically with the $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ interfering species, keeping the Se signal constant. This behavior was not observed when NH₃ and O₂ were employed as reaction gases, although both significantly reduced the incidence of interfering species. Figures 1 and 4

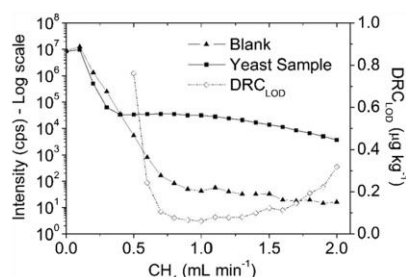


Fig. 3 Effect of CH₄ as reaction gas on signal obtained for m/z 80 with Rpq of 0.45

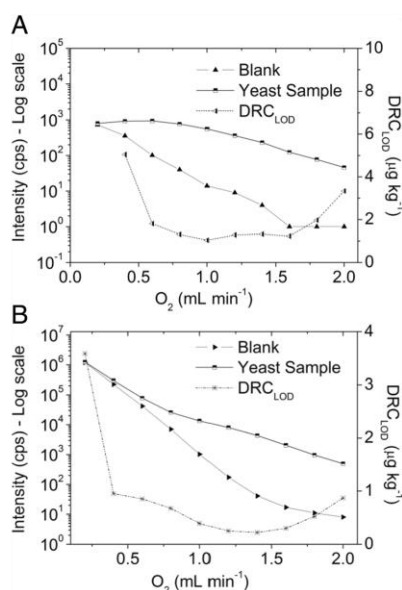


Fig. 4 Effect of O_2 as reaction gas on signal obtained for **a** m/z 96 ($^{80}Se^{16}O$) and **b** m/z 80 (^{80}Se) with R_{pq} of 0.65

show that NH_3 and O_2 also react with Se, decreasing its signal intensity and consequently raising the limits of detection. Although the approach employing O_2 and monitoring the m/z 96 has presented the lowest sensitivity (approximately 10% of ^{80}Se is converted into $^{80}Se^{16}O^+$), this approach showed a lower LOD than the approach using NH_3 and O_2 and monitoring the $^{80}Se^+$.

Analytical Application

Analysis of Se-Enriched Yeast and Dietary Supplement Samples Table 4 shows the concentration of selenium in commercial yeast obtained employing the different reaction gases studied in this work and the result obtained by an independent technique—ICP OES.

The results obtained by ICP-MS employing different reaction gases were in good agreement with the certified value,

Table 3 DRC conditions selected for the determination of Se in yeast samples and obtained limits of detection

Approach	Gas flow rate (mL min ⁻¹)	R_{pq}	LOD ($\mu g\ kg^{-1}$)
Methane (^{80}Se)	0.9	0.45	0.01
Oxygen ($^{80}Se^{16}O$)	1.6	0.65	0.03
Oxygen (^{80}Se)	1.6	0.65	0.06
Ammonia (^{80}Se)	1.0	0.40	0.1
Standard mode (^{82}Se)	—	—	0.2

Table 4 Concentration of selenium in yeast samples

Approach (measured isotope)	Yeast sample (mg kg ⁻¹)	CRM SELM-1 (2059 ± 64 mg kg ⁻¹) (% of the certified concentration)
Methane (^{80}Se)	2136 ± 111	2141 ± 139 (104%)
Ammonia (^{80}Se)	2187 ± 209	2048 ± 105 (99%)
Oxygen (^{80}Se)	2298 ± 176	2137 ± 181 (104%)
Oxygen ($^{80}Se^{16}O$)	2286 ± 173	2122 ± 204 (103%)
Standard mode (^{82}Se)	2171 ± 131	—
ICP OES (196 nm)	2169 ± 107	2048 ± 69 (99%)

Results expressed as $\bar{x} \pm U(n = 5; p = 0.05)$

and the degree of accuracy was in the range of 99 to 104% for the CRM SELM-1. Comparing the results obtained by ICP OES and the approaches employed in ICP-MS, all results were statistically similar, considering the uncertainty ranges. These results demonstrate the efficiency of the reaction gases studied in this work in circumventing the spectral interferences over $^{80}Se^+$, not only those Ar-based species but also Ca species, once the yeast sample had a calcium concentration of approximately 1000 mg kg⁻¹ (determined by semiquantitative analysis).

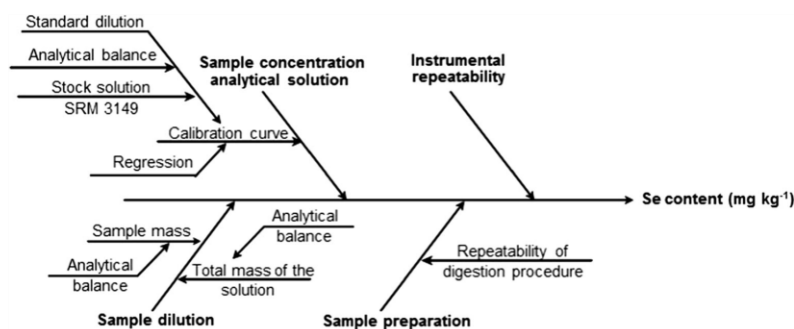
The measurement uncertainty was obtained employing the concept of error propagation according to ISO GUM (JCGM 101: 2008). The uncertainty sources considered in this work were as follows: (i) Se concentration in analytical solution— u_{Co} , (ii) instrumental repeatability— u_{rep} , (iii) standard dilution— u_{dil} , (iv) sample dilution— u_{dil} , and (v) sample preparation— u_{prep} . These sources of uncertainty are shown in the Ishikawa diagram (Fig. 5).

The methodology developed in this work was applied to an evaluation of some commercial brands of dietary supplement obtained in the local market. Since all gases had similar behavior in the interference correction and due to technical facilities, only NH_3 was used as the reaction gas in this analysis. Table 5 shows the selenium content measured in these samples.

In 2003, the Brazilian Health Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA)) has published a resolution (RDC no. 360) establishing technical requirements for the labels of packaged food, as well as of dietary supplements. This document (RDC no. 360) presents aspects concerned with nutritional information, including the adoption of a tolerance of +20% of the discrepancy between the real content of the nutritional parameter (for example, Se mg per tablet) and the value declared on the label (ANVISA 2003).

According to the criteria adopted by Brazilian Legislation (ANVISA 2003), the brands C and D can be considered adequate for consumption considering the uncertainty of the

Fig. 5 Ishikawa diagram of uncertainty sources



measurement. Although the results found for Brand A correspond only to 71% of the labeled value for Se content, this sample was not considered inappropriate for consumption according to the legislation because RDC no. 360 does not address differences lower than labeled.

In Brazil, the recommended dietary allowance for Se is 34 μg for adults, according to ANVISA (2005), but this limit might be different according to country or authority (WHO 2004; Baghurst 2005; Høybråten 2012). Therefore, the dietary supplement samples analyzed in this work do not represent a real risk for consumers.

To perform a critical evaluation of the results found for selenium content in dietary supplements, an uncertainty study was carried out (Fig. 6).

In this study, the overall uncertainty is fragmented as to its individual sources, making possible the evaluation of the contribution of each source to the final result. As seen in Fig. 6, the variability between tablets of each dietary supplement represents the major uncertainty source, contributing almost 50 and 80%, in relation to the combined uncertainty, for brands C and D, respectively.

In general, the contribution of the uncertainty sources arising from the analytical method did not contribute significantly to the final result, except for brand B, in which the uncertainty of Se concentration in analytical solution— u_{C_0} —contributed almost 80%, mainly because the selenium content was much lower in this sample than in the others. Despite the results

being in agreement with the legislation, the great variability inside each bottle, near 20%, highlights the need of a more robust quality control in the manufacturing process of dietary supplements. This evidence can be confirmed by the uncertainty study shown in Fig. 6.

Other recent studies dealing with method development and quality control for dietary supplements have found similar results, confirming that misformulated products are commonly available in the market (MacFarquhar et al. 2010; Niedzielski et al. 2016). In 2002, Valiente et al. (2002) published a comparative study of 15 samples of commercial dietary supplements, and the authors found Se content ranging from -50 to $+224\%$ related to the labeled value. In another study, Niedzielski et al. (2016) evaluated different selenium-enriched dietary supplements available in the Polish market, where the real selenium content ranged from 12 to 280% in agreement with the declared selenium content. Although these studies had found disagreement between measured and labeled Se content, the dietary supplements also did not represent a health risk for the consumers. We also found in the literature a study in which the results measured in dietary supplements were in reasonable agreement with the manufacturer-declared value (Tyburska and Jankowski 2013).

All these studies and ours corroborate the necessity of a more rigorous quality control of supplement contents, considering that the label claims might be inaccurate (B'Hymer and Caruso 2000; Valiente et al. 2002).

Table 5 Selenium content in commercial dietary supplement

Samples	Se content ($\mu\text{g Se tablet}^{-1}$)	Variability inside the bottle (%)	Lower ($\mu\text{g Se tablet}^{-1}$)	Upper ($\mu\text{g Se tablet}^{-1}$)	Discrepancy with labeled value (%)
Brand A (2.25 μg) ^a	1.6 ± 0.1	6	1.5	1.7	-29
Brand B (NI)	0.25 ± 0.02	8	0.23	0.27	-
Brand C (34 μg)	42 ± 8	19	34	50	+23
Brand D (34 μg)	39 ± 6	15	33	45	+15

Results expressed as microgram per tablet; $\bar{x} \pm U$ ($k = 2$; $n = 5$)

NI not informed

^a Value labeled 27 μg 12 tablets⁻¹

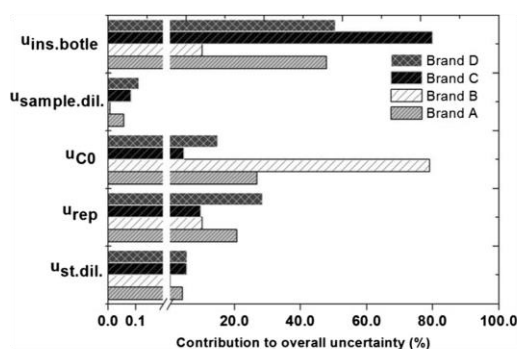


Fig. 6 Contribution of individual sources to overall uncertainty. $u_{ins.botle}$ the variation between tablets of the same brand, $u_{sample.dil.}$ sample dilution, u_{Co} Se concentration in analytical solution, u_{rep} instrumental repeatability, $u_{st.dil.}$ standard dilution

Conclusions

The employment of different reaction gases in DRC-ICP-MS is an interesting alternative to solve the problems related to spectral overlap of argon polyatomic species over $^{80}\text{Se}^+$. Methane was the most adequate reaction gas, which reacted specifically with $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ dimer, resulting in a lower limit of detection than the limit of detection obtained with NH_3 and O_2 . Although CH_4 has shown better performance, NH_3 and O_2 were also able to satisfactorily solve the spectral interference over $^{80}\text{Se}^+$. Nevertheless, NH_3 and O_2 also react with Se^+ , but their reaction with interfering species is faster than with the analyte, enabling its use for analytical purposes.

The dynamic reaction cell technology is demonstrated to be a powerful tool to circumvent problems related to spectral interferences over the most abundant isotope of selenium in yeast samples. The method allowed the analysis of dietary supplements with good precision and accuracy. The results found for these samples showed a great variation between the tablets from the same brand and a considerable discrepancy of selenium content with respect to labeled value. In addition to these discrepancies, the dietary supplements were considered adequate for consumption, according to Brazilian legislation requirements. Supported by the results obtained in this work, we can conclude that there is a need for a most rigorous quality control of dietary supplement in Brazil.

Acknowledgments The authors thank Biorigin (São Paulo, Brazil) for supplying the Se-enriched yeast. The authors also thank CNPq for financial support: Prometro 563105/2010-0.

Compliance with Ethical Standards This article does not contain any studies with human or animal subjects.

Funding This study was funded by CNPq (Prometro 563105/2010-0)

Conflict of Interest Jefferson Rodrigues de Souza declares that he has no conflict of interest. Lilian da Silva declares that she has no conflict of interest. Márcia Silva da Rocha declares that she has no conflict of interest. Tatiana Dillenburg Saint'Pierre declares that she has no conflict of interest.

Informed Consent Not applicable.

References

- ANVISA (2003) RDC no360. http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fe713-9c66-4512-b3e1-afee57e7d9bc. Accessed 11 Jan 2017
- ANVISA (2005) RDC no 269. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_269_2005_COMP.pdf/25aa9f3-32bc-4e80-aa6c-0520332533a6. Accessed 11 Jan 2017
- B'Hymer C, Caruso JA (2000) Evaluation of yeast-based selenium food supplements using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 15:1531–1539. doi:10.1039/b006437h
- Baghurst K (2005) Nutrient reference values for Australia and New Zealand including recommended dietary intakes. https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/n35.pdf. Accessed 1 Jan 2017
- Bandura DR, Baranov VI, Litherland AE, Tanner SD (2006) Gas-phase ion–molecule reactions for resolution of atomic isobars: AMS and ICP-MS perspectives. *Int J Mass Spectrom* 255–256:312–327. doi:10.1016/j.jms.2006.06.012
- Bishop DP, Hare DJ, Fryer F et al (2015) Determination of selenium in serum in the presence of gadolinium with ICP-QQQ-MS. *Analyst* 140:2842–2846. doi:10.1039/c4an02283a
- Bolea-Fernandez E, Balcaen L, Resano M, Vanhaecke F (2015) Interference-free determination of ultra-trace concentrations of arsenic and selenium using methyl fluoride as a reaction gas in ICP-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 407:919. doi:10.1007/s00216-014-8195-8
- Bouchoux G, Rashad AM, Helal AI (2012) Theoretical investigation of selenium interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Phys Chem A*. doi:10.1021/jp304644u
- Chen X, Yang G, Chen J et al (1980) Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Elem Res* 2:91–107. doi:10.1007/BF02798589
- D'Ilio S, Violante N, Majorani C, Petrucci F (2011) 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* 698:6–13. doi:10.1016/j.aca.2011.04.052
- da Silva MAO, Arruda MAZ (2013) Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves. *Metallomics* 5: 62–67. doi:10.1039/c2mt20154b
- De Albuquerque FI, Duyck CB, Fonseca TCO, Saint'Pierre TD (2012) Determination of As and Se in crude oil diluted in xylene by inductively coupled plasma mass spectrometry using a dynamic reaction cell for interference correction on ^{80}Se . *Spectrochim Acta—Part B At Spectrosc* 71–72:112–116. doi:10.1016/j.sab.2012.05.008
- Ge K, Yang G (1993) The epidemiology study of endemic of selenium deficiency diseases in the etiological study of endemic disease in China. *Am J Clin Nutr* 57:259–263
- Hattendorf B, Günther D (2003) Strategies for method development for an inductively coupled plasma mass spectrometer with bandpass reaction cell. Approaches with different reaction gases for the determination of selenium. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 58:1–13
- Høybråten D (2012) Nordic Nutrition Recommendations 2012—integrating nutrition and physical activity. <https://www.norden.org/en/>

- theme/nordic-nutrition-recommendation/nordic-nutrition-recommendations-2012. Accessed 11 Jan 2017
- Hu X, Cao Z, Sun W et al (2016) Accurate determination of arsenic and selenium in plant food samples by using ICP-MS/MS. *Anal Methods* 8:6150–6157. doi:10.1039/C6AY01414C
- Iglesias M, Gilon N, Poussel E, Mermet J-M (2002) Evaluation of an ICP-collision/reaction cell-MS system for the sensitive determination of spectrally interfered and non-interfered elements using the same gas conditions. *J Anal At Spectrom* 17:1240–1247. doi:10.1039/b204786c
- INMETRO (2014) Relatório final sobre a análise em suplementos proteicos para atletas—whey protein. http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio_Whey_Final.pdf. Accessed 1 Jan 2015
- Jackson BP, Liba A, Nelson J (2015) Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly chaeged interferences for arsenic and selenium analysis in foods. *J Anal At Spectrom* 1179
- JCGM (2008) Evaluation of measurement data — Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” — Propagation of distributions using a Monte Carlo method. <http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>. Accessed 22 Mar 2017
- Kubachka KM, Hanley T, Mantha M, et al (2017) Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chem* 313. doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.086
- Lum T-S, Leung KS-Y (2016) Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *J Anal At Spectrom* 1078. doi:10.1039/C5JA00497G
- MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P et al (2010) Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med* 170: 256–261. doi:10.1001/archinternmed.2009.495
- Niedzielski P, Rudnicka M, Wachelka M et al (2016) Selenium species in selenium fortified dietary supplements. *Food Chem* 190:454–459
- R7 (2014) No title. <http://noticias.r7.com/saude/anvisa-retira-do-mercado-20-lotes-de-suplementos-27022014>. Accessed 18 Dec 2014
- Reid ME, Stratton MS, Lillico AJ et al (2004) A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J Trace Elem Med Biol* 18:69–74. doi:10.1016/j.jtemb.2004.03.004
- Silva L, Souza JR, Sanchez MLF et al (2013) Comparison of procedures for selenium species extraction from selenized yeast and evaluation of associated uncertainties. *Brazilian J Anal Chem* 12:499
- Stivanin de Almeida CM, Ribeiro AS, Saint’Pierre TD, Miekeley N (2009) Studies on the origin and transformation of selenium and its chemical species along the process of petroleum refining. *Spectrochim Acta—Part B At Spectrosc* 64:491–499. doi:10.1016/j.sab.2009.02.002
- Stürup S, Bendahl L, Gammelgaard B (2006) Optimization of LC-DRC-ICP-MS for the speciation of selenotrisulfides with simultaneous detection of sulfur and selenium as oxides combined with determination of elemental and isotope ratios. *J Anal At Spectrom* 21:201. doi:10.1039/b514633j
- Sucharová J (2011) Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. *J Anal At Spectrom* 26:1756. doi:10.1039/c1ja10095e
- Tanner SD, Baranov VI, Bandura DR (2002) Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochim Acta—Part B At Spectrosc* 57:1361–1452. doi:10.1016/S0584-8547(02)00069-1
- Tyburska A, Jankowski K (2013) Determination of selenium in dietary supplements by optical emission spectrometry after alkaline dissolution and subsequent headspace solid phase microextraction. *J Pharm Biomed Anal* 268
- Valiente L, Piccinna M, Alea ER, et al (2002) Determination of selenium in dietary supplements by ETAAS and HG-AAS: a comparative study. *At Spectrosc* 129–134
- Veatch AE, Brockman JD, Spate VL et al (2005) Selenium and nutrition: the accuracy and variability of the selenium content in commercial supplements. *J Radioanal Nucl Chem* 264:33–38. doi:10.1007/s10967-005-0671-3
- WHO, Food and Agricultural Organization of the United Nations (2004) Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2 Edition

7.3.2 - Artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* – BrJAC

Comparison of procedures for selenium species extraction from selenized yeast and evaluation of associated uncertainties

Lilian da Silva(PQ)^A, Jefferson Rodrigues de Souza(PQ)^{A,B}, Maria Luiza Fernandez Sánchez(PQ)^C, Thiago de Oliveira Araújo(PQ)^A and Márcia Silva da Rocha(PQ)^{A*}

A) National Institute of Metrology, Quality and Technology – Inmetro, Chemical Metrology Division – Dquim /Inorganic Analysis Laboratory – Labin – Av Nossa Senhora das Graças 50, Xerém, Duque de Caxias, RJ, Brazil. 25250-020 – Phone: 55 21 26799579 - Fax: 55 21 26799069

B) Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro – PUC, Department of Chemistry - Marquês São Vicente, 225, Gávea, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. 22451-041

C) University of Oviedo – Department of Physical and Analytical Chemistry – Julian Clavería, 8, Oviedo, Asturias, Spain. 33006.

Abstract

Several extraction procedures have been investigated in order to obtain the highest selenium extraction efficiency in yeast samples. In this work, 10 different procedures using enzymatic and non-enzymatic extracting solutions were studied for this purpose. Selenium extraction yields were estimated based on the results found by ICP OES determination of the total selenium content on the extract and on the whole digested sample from a high pressure asher (HPA-S). Extraction using the solution with only protease led to appropriate recoveries of Se ($88 \pm 6\%$) while selenomethionine (SeMet) was the major observed species. The accuracy of total Se and SeMet determinations were evaluated by analysis of the certified reference material CRM SELM-1. Speciation studies of the extracts were carried out by ion-pairing reversed phase liquid chromatography. This separation mechanism was suitable to isolate the main extractable Se species. The detection limit (LOD) for SeMet was $36 \mu\text{g kg}^{-1}$, the linearity was satisfactory in the studied range ($0.5 - 3.0 \text{ mg kg}^{-1}$; $y = 134685x + 1411$; $R^2 = 0.99586$; for SeMet) and the extraction efficiency ranged from 82 % to 92 % for different proteolytic extractions and from 12 % to 22 % for non-proteolytic extractions. Recovery obtained for total selenium in CRM SELM-1 was 99.2 %, confirming the reliability of the method. The uncertainty sources were described in each step of the analytical procedure, according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). The uncertainty sources were discerned in each step of the analytical procedure, employing the rules of propagation of errors. The main uncertainty sources were instrumental repeatability and SeMet concentration in the analytical solution, their sum representing 58 % of the total uncertainty value for SeMet (protease extraction).

***Corresponding author:**
Márcia Silva da Rocha
Phone: 55 (21)2679-9579
Fax: 55 21 2679 – 9069
E-mail Address:
msrocha@inmetro.gov.br

Keywords: selenium speciation, yeast samples, HPLC-DRC-ICP-MS, measurement uncertainty

1 Introduction

Selenium is an essential trace element in human nutrition, present in selenoproteins as aminoacid selenocysteine. In humans, more than two dozen of selenoproteins that play critical roles in reproduction, thyroid hormone metabolism, DNA synthesis, and protection from oxidative damage and infection have been identified [1].

Selenium is found in food in two forms: inorganic (selenate and selenite) and organic (selenomethionine and selenocysteine). Both forms can be good dietary sources of selenium. Recently, selenium supplements have been used as chemopreventive to reduce the risk of prostate, lung and colon cancers [2]. On the other

hand, when Se ingestion is higher than the organism's absorption and excretion capacity this element can present toxic effects. A serious Se acute intoxication was identified in the United States of American (USA) in 2008 due to the ingestion of a dietary supplement that contained 200 times the labeled content of selenium, affecting 201 people in 10 states [3]. This incident highlights the importance of quality control of nutritional supplements and development of analytical methods able to provide accurate, precise and reliable results for this kind of samples.

The beneficial effects of selenium supplementation have encouraged the search for supplement food. Yeast

is a preferred source for supplementation due to the presence of high levels of selenium, as selenomethionine, a less toxic form with more bioavailability and to its low cost [4,5].

Nowadays it is well known that bioavailability, toxicity, environmental impact, etc., of selenium are closely related to its chemical form. Therefore selenium speciation analysis has been the focus of scientists in recent years. Several analytical approaches based on coupling of HPLC with ICP-MS are well established for the determination of selenospecies.

Speciation analysis of yeast requires the development of robust extraction methods able to extract selenospecies present in yeast and the answers to these questions still represent a challenge to analytical chemists that should guarantee species integrity in order to avoid the loss of chemical information of the analytes of interest.

In fact, sample preparation increases the risks of contamination and analyte losses, since they involve sample manipulation to modify the matrix and to make the species more adequate for the analysis.

In speciation analysis, soft extraction procedures are necessary to avoid species interconversion during extraction. Furthermore, storage procedures (light protection, temperature control, etc.) of the samples should also preserve the original species. In some studies, the oxidation of the selenomethionine to selenomethionine oxide [6] and the oxidation of Se (IV) to Se (VI) have been observed.

Different extraction methods have been employed in the development of analytical methods aiming at speciation. Among them, enzymatic extraction [7,8], alkaline [9,10] and acid extraction [11,12], and extraction with water [13-15] and with buffer solutions [16,17]. According to Cañas et al. [18], buffer salts are used to obtain the ionic strength necessary for optimal solubilization of protein and Tris-HCl is often used due to liberate the free or weakly bonded inorganic species and aminoacids [19]. Sodium dodecyl sulfate has also been widely used to denature proteins and, by forming ion pairs, to render them water soluble, increasing extraction efficiency [20].

The use of proteolytic enzymes for Se-species extraction is one of the most used methods for the extraction of selenomethionine from yeast, without degradation of selenoaminoacids. However, proteolytic enzymes destroy all the information relating to selenium proteins in the original sample as protease is a non-specific enzyme able to act along the whole protein structure [21,22]. Several enzymatic hydrolyses with protease XIV have been used as extraction techniques to release protein-bound compounds such as selenomethionine (SeMet) from food and dietary supplements [23,24]. Enzymatic digestion can also be combined with

ultrasonic energy [21,25] and with microwave radiation, reducing hydrolysis time [24].

On the other hand, the sample preparation procedures for determination of total selenium, employing HNO_3 and H_2O_2 as an oxidant mixture, have shown good analytical performance, since they are simple and apparently do not present problems related to the loss of volatile species of selenium.

Another important aspect that should be taken into account in speciation analysis is the rigorous quality control of the results. Although there are a significant number of articles in the literature about Se speciation, few deal with quality assurance issues, including the validation of the methods, estimate of measurement uncertainty and traceability of the results to the SI.

The measurement uncertainty, for example, is an important parameter that enables evaluation of result quality, since this parameter provides the quantification of the measurement quality. During a chemical analysis, several steps are necessary to obtain a measurement result, including sampling, sample preparation, introduction of the sample into the equipment, separations in speciation analysis and evaluation of the results. Also, slight variations in the environmental conditions, instrumental drift and others external effects can occur, resulting in dispersion of the final results and, consequently, the analytical results should not be expressed as unique values but as an average values with a dispersion which characterizes the measurement: its uncertainty.

In this work, different enzymatic (lipase, protease) and non-enzymatic (water, SDS, Tris-HCl) extraction procedures were investigated in order to evaluate the most adequate extracting agent. Quantification of SeMet was performed by reversed phase ion pair HPLC coupled to DRC-ICP-MS. The method developed was optimized, validated and the uncertainty sources were investigated according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) [26].

2 Experiment

2.1 Reagents and instrumentation

The standard reference material NIST SRM 3149 (Se: $10110 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1}$ in 10 % HNO_3) was used to prepare the calibration curves and a stock solution was used to obtain suitable dilutions.

Standards of Se-DL-methionine and selenocystine (both from Sigma-Aldrich, Dorset-UK) were used to compare retention times in the samples.

Methanol (Chromasolv for HPLC ≥ 99.9 %, Sigma-Aldrich, São Paulo-Brazil), acetonitrile (ACN, HPLC/spectro > 99.9 %, Tedia, OH-USA), tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH, ≥ 97 %, Sigma-Aldrich, São Paulo-Brazil) and ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich, Steinheim-Germany) were used as mobile phase reagents.

Protase type XIV from *Streptomyces griseus* (Sigma, Japan) and lipase type VII from *Candida rugosa* (Sigma, Japan), sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck), tris (hydroxymethyl)aminomethane (ultra-pure, $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich, MO-USA), and fuming 37 % hydrochloric acid (Merck, Darmstadt-Germany) were used for selenium extraction procedures.

65 % nitric acid (Merck, Darmstadt-Germany) was further purified by sub-boiling distillation in a quartz cell, model Duo-PUR (Milestone, U.S.A.).

Type I water with resistivity of 18 M Ω cm from a Milli-Q System (Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.) was used to prepare solutions.

Standard solutions of L-selenocystine (3000 mg kg⁻¹) and selenomethionine (10000 mg kg⁻¹) were prepared in 2 % v/v HCl and preserved at -20 °C. Selenite and selenate (10000 mg kg⁻¹) were prepared in hydrochloric (Merck, Germany) and nitric acids, respectively, and preserved at 4 °C in the dark.

The yeast sample was kindly supplied by a national manufacturer. The strain of *Saccharomyces cerevisiae* was enriched in selenium to a target concentration of 2000 mg kg⁻¹.

PVDF syringe filters, pore size of 0.45 μ m, were used for filtration of samples (Nova Analítica, Brazil).

A C18 Luna column (Phenomenex, USA) was used with the chromatographic system.

An analytical balance from Sartorius, model ME 235S (Germany) was used to weigh samples and standards.

Other equipments, necessary for this work were a pHmeter, MP 230 (Mettler Toledo, Switzerland), an AP 56 vortex (Phoenix, Brazil), a shaker thermostat NT 712 (Nova Ética, São Paulo, Brazil), a Z300K centrifuge (Hermle, Germany), an air oven (Nova Ética, São Paulo, Brazil), an ultrasonic bath, model Ultra cleaner 1400A (Unique, Brazil), a Minipuls III peristaltic pump (Gilson, France) and a high pressure asher (HPA-S) (Anton Paar, Austria).

A sequential radial view inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP OES), model ULTIMA 2 (Jobin Yvon-Horiba, Longjumeau, France), was used to determine the content of total selenium.

An inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS), model Elan DRC II (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) was used, coupled to chromatography.

A HPLC system from PerkinElmer, model Flexar (Shelton, USA), was coupled to the Elan DRC II by a EV750-100-S2 switch valve (Cetac, USA). The chromatographic effluent reaches the plasma through a system composed of a cryogenic spray chamber (Isomist Kit, Australia) and a parallel flow nebulizer (Miramist Burgener, Canada).

2.2 Procedures

The HPLC was equipped with a quaternary pump,

degasser, autosampler and column oven. The HPLC column was connected to a switching valve via PEEK tubing (0.18 mm id). This valve was coupled to the Elan DRC-ICP-MS. Ammonia was used as reaction gas at 1.0 mL min⁻¹ gas flow rate. This system allowed the ICP-MS daily performance check and chromatographic column conditioning at the same time, the column effluent was drained to waste while the daily performance solution was pumped to the ICP-MS. When the valve position is changed, the column chromatographic effluent enters the ICP-MS and the separation of the Se compounds can be detected.

Chromera[®] speciation software (version 4.0) was used for monitoring both instruments (HPLC and Elan DRC-ICP-MS) and the integration of the chromatographic signal.

Ion-pair reversed phase separation of the selenium compounds was performed on a C18 column. The mobile phase was prepared using TBAOH at 0.05 mmol L⁻¹, NH₄H₂PO₄ at 0.5 mmol L⁻¹ and ACN at 1 %. The injected volume was 5 μ L, using a 200 μ L sample loop.

The sample introduction system of the Elan DRC-ICP-MS was set up at 10 °C, minimizing fluctuations and organic solvent losses and increasing the analytical stability of the plasma.

2.3 Moisture content determination

The moisture content of the CRM SELM-1 and yeast sample was determined by removal of water by heating until constant weight at 105 °C.

2.4 Digestion procedures of yeast samples

Before weighing, both CRM SELM-1 and the yeast sample were homogenized manually and approximately 0.25 g were weighed and quantitatively transferred to a quartz digestion vessel using 1.5 mL of concentrated HNO₃ and 1.5 mL H₂O₂. After decomposition, the vessels were cooled until room temperature (21 \pm 2 °C) and made up to 15 mL with water. A second dilution of approximately 73 times was realized for analysis.

A high pressure asher (HPA-S) decomposition system was used to digest the samples (240 °C during 60 min) according to an application note supplied with the equipment. This equipment operates in a nitrogen atmosphere, assuring better control of the digestion process.

2.5 Extraction procedures of selenium compounds

(Non-enzymatic and enzymatic extraction of Se compounds)

Extraction procedures were investigated for recovery of selenocompounds based on enzymatic and non-enzymatic extraction. Ten sample preparations (solid-liquid extraction, realized in triplicate) were used. For each one, an aliquot of 0.25 g of yeast was weighted

followed by the addition of the reagents (listed below). The total volume was 5.0 mL for each procedure. A second dilution of approximately 195 times, for proteolytic extractions, was realized for the analysis.

- i. Tris-HCl (30 mmol L⁻¹, pH 7.5);
- ii. Tris-HCl + protease (30 mmol L⁻¹, pH 7.5 + 4 mg g⁻¹);
- iii. SDS (0.2 %);
- iv. SDS + Tris-HCl (0.2 % + 30 mmol L⁻¹, pH 7.5);
- v. SDS + protease (0.2 % + 4 mg g⁻¹);
- vi. SDS + protease + Tris-HCl (0.2 % + 4 mg g⁻¹ + 30 mmol L⁻¹, pH 7.5);
- vii. Protease (4 mg g⁻¹);
- viii. Lipase (2 mg g⁻¹);
- ix. Protease + lipase (4 mg g⁻¹ + 2 mg g⁻¹) and
- x. Water

The yeast samples were mechanically shaken for approximately 30 s in a vortex and incubated in a shaker thermostat, at 200 rpm, during 16 h at 37 °C.

After extraction, the samples were centrifuged for 30 min at approximately 2489 g and the supernatant was filtered through a 0.45 µm filter. The resulting solution was stored at -20 °C and diluted appropriately when analyzed by HPLC-DRC-ICP-MS and ICP OES.

2.6 Operational conditions of ICP OES

Total amount of selenium was determined by ICP OES using external calibration. The operational conditions are shown in Table I.

Table I. Operational conditions of ICP OES

Parameters	Values
Radio frequency power (W)	1400
Auxiliary gas flow rate (L min ⁻¹)	0.4
Nebulizer gas flow rate (L min ⁻¹)	0.8
Sample flow rate (mL min ⁻¹)	1.0
Detector voltage (V)	900
Wavelength (nm)	196

2.7 Operational conditions of HPLC-DRC-ICP-MS

Before analysis by HPLC-DRC-ICP-MS, the DRC-ICP-MS was optimized. The optimization of ICP-MS operating in standard mode was carried out by daily performance check keeping the doubly charged (Ba⁺⁺) and oxide (CeO⁺) levels less than 3 % and with higher sensitivity, evaluating the intensities obtained for Mg, In and U.

The speciation analysis was carried out by the coupling HPLC-DRC-ICP-MS. The DRC conditions were previously optimized (NH₃ gas at 1.0 mL min⁻¹, RPq of 0.45 and RPa of 0), see item 3.3.

The separation and elution of the S compounds

(selenomethionine, selenomethionine IV and selenocystine) was achieved in less than 15 min using 0.05 mmol L⁻¹ of TBAOH, 0.5 mmol L⁻¹ of NH₄H₂PO₄ and 1 % of ACN as mobile phase (≈ pH 6.3) at 0.25 mL min⁻¹. This mobile phase was compatible with the ICP-MS operating conditions. A solution of 2 % HNO₃, as make-up, was introduced through a "T" piece, increasing the total flow rate into the nebulizer to 1.25 mL min⁻¹. The HNO₃ solution also minimizes the undesirable effects of the mobile phase organic modifier (ACN) as carbon deposits in injector, cones and other parts of the equipment.

The quantification was realized by external calibration, using peak area measurement of the chromatographic signal intensities by monitoring the ⁸²Se, ⁸⁰Se and ⁷⁷Se signals.

More experimental information for the HPLC-DRC-ICP-MS system is summarized in Table II.

Table II. Operational conditions of HPLC-DRC-ICP-MS

Parameters	
HPLC	
Column: C18 Luna; Phenomenex	150 mm x 2 mm x 3 µm
Pre-column Security Guard, Phenomenex	4 mm x 2 mm
Mobile phase	TBAOH (0.05 mmol L ⁻¹); NH ₄ H ₂ PO ₄ (0.5 mmol L ⁻¹); ACN (1 %)
Elution mode	Isocratic
Flow rate	0.25 mL min ⁻¹
Injection volume	5 µL
Column temperature	35 °C
DRC-ICP-MS	
RF power	1350 W
Nebulizer gas flow rate	0.96 L min ⁻¹
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	1 L min ⁻¹
Scan mode	Peak-hopping
Sweeps	1
Readings	3183
Replicates	1
Dwell time (ms)	250
Detector operation	Dual
RPq	0.45
Rpa	0
Cell gas flow rate, NH ₃	1.0 mL min ⁻¹
Monitored isotopes	⁷⁷ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se

2.8 Uncertainty sources identifications

In this work, the uncertainty associated with the result was estimated from the specification of the mea-

surand. The measurand is the SeMet concentration, analyzed by HPLC-DRC-ICP-MS, present in selenized yeast, which is defined as Eq. (1).

$$C_{SeMet} = C_0 \times df \times f_{ext} \times f_{rep} \times f_{moist} \quad (1)$$

Where C_{SeMet} is the selenomethionine concentration in the original sample, C_0 is the SeMet concentration in the analytical solution, df is the dilution factor of the sample, f_{ext} is the factor of sample extraction, f_{rep} is the factor of instrumental repeatability and f_{moist} is the factor of moisture.

According to the "Ishikawa diagram" (Figure 1), the uncertainty components include the uncertainty of the selenium concentration in the analytical solution (u_{C_0}), the uncertainty of the sample dilution (u_{df}), the uncertainty of the sample extraction (u_{ext}), the uncertainty of the instrumental repeatability (u_{rep}) and the uncertainty associated with moisture (u_{moist}).

3 Results/Discussion

3.1 Optimization of operational conditions of ICP OES

The optimization of the operational conditions of ICP OES was carried out by varying the instrumental parameters of the equipment using a solution of $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ of Se diluted in 2 % HNO_3 .

The influence of radiofrequency power (RF) on the Se signal intensity was evaluated in the range 1000 – 1400 W. Selenium has a high ionization potential (9.75 eV) which results in low sensitivity. The intensity of selenium was improved when the RF power was increased from 1000 W to 1400 W. The selenium signal was approximately 3400 counts per second (cps); so, the detector voltage was changed from 750 V to 900 V, increasing the intensity to 13000 cps, approximately. The RF power of 1400 W and a detector voltage of 900 V were then chosen for the subsequent studies.

The auxiliary gas flow rate was evaluated and the intensity of selenium increased when the auxiliary gas flow rate was changed from 0.2 L min^{-1} to 0.4 L min^{-1} . This signal improvement probably occurs due to the changing of the plasma position in the radial view with higher auxiliary flow rates reaching, a good alignment between the analytical zone of the plasma (emission zone) and the entrance slit of spectrometer at 0.4 L min^{-1} .

The sample flow rate on the analytical signal was also investigated. As expected the improvement of the sample flow rate resulted in an increase of the selenium signal due to the higher quantity of sample that reaches the plasma. However, when the quantity of sample in the plasma is too high, a reduction of the energetic conditions can occur, leading to reduction of the population of excited/ionized atoms and ions. This behavior can be observed with sample flow rates greater than 1 mL min^{-1} , thus 1 mL min^{-1} was chosen for subsequent studies.

The Ar nebulizer flow rate was investigated in the range $0.4 - 1.0 \text{ mL min}^{-1}$ and the signal intensity increased up to 0.8 L min^{-1} . With higher Ar nebulizer flow rates, the efficiency of the transport of sample to plasma was improved and consequently the signal intensity increased. So, the Ar nebulizer flow rate of 0.8 L min^{-1} was chosen for selenium determination in yeast samples.

3.2 Validation of total Se determination by ICP OES

Once the instrumental conditions were optimized to be more appropriate for total Se determination by ICP OES (item 3.1), the validation parameters repeatability, detection limits, linearity of calibration curve and method accuracy by CRM SELM-1 analysis were determined.

The instrumental repeatability was defined as relative standard deviation (RSD) obtained for analysis of a Se standard

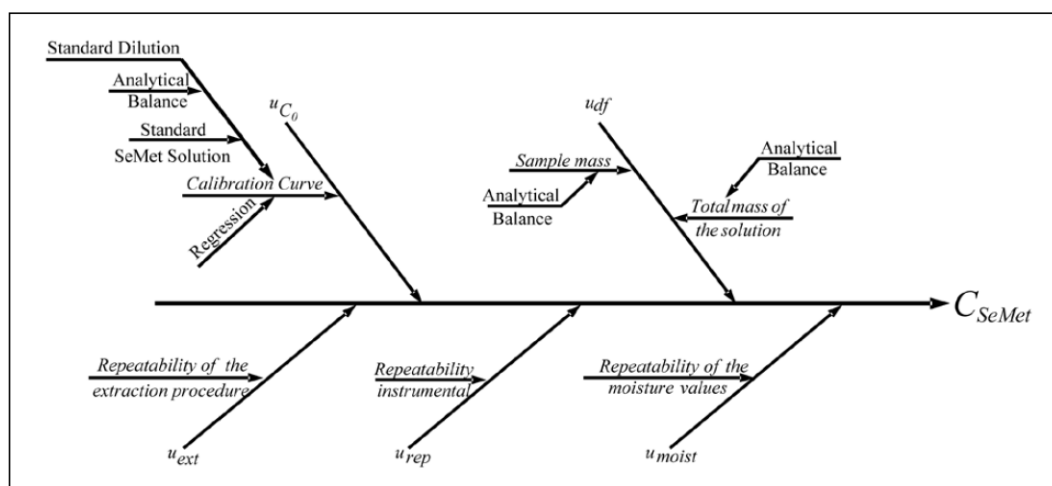


Figure 1. Ishikawa Diagram for determination of SeMet and total selenium concentration.

solution of 0.45 mg kg^{-1} , being 2.0 % the value found for 7 replicates.

The linearity of the calibration curve was considered satisfactory in the range $0.15 - 0.90 \text{ mg kg}^{-1}$ with $R^2 = 0.99902$; $y = 2556418x - 427$.

The limit of detection (LOD), $5.0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, was obtained by employing the criteria of 3σ of blank concentration.

Method accuracy was evaluated by CRM SELM-1 analysis and good agreement was achieved between the total Se obtained ($2048 \pm 69 \text{ mg kg}^{-1}$) and the certified value ($2059 \pm 64 \text{ mg kg}^{-1}$).

3.3 Optimization of operational conditions of the dynamic reaction cell (DRC)

In order to reduce the spectral interference on selenium isotopes in ICP-MS, ammonia was used as a reaction gas, enabling the employment of the most abundant isotope of selenium, ^{80}Se . The optimization of the operational conditions of the DRC was carried out using the mobile phase (TBAOH, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and ACN), considered as a blank solution, and the yeast sample, $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ diluted in mobile phase. Figure 2 shows the influence of reaction gas flow rate (NH_3) on the m/z 80 intensity.

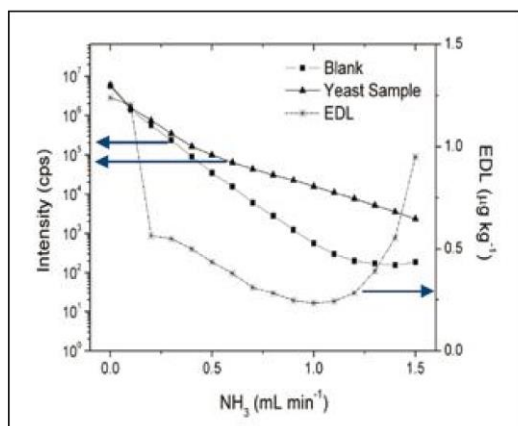


Figure 2. Influence of reaction gas (ammonia) on m/z 80.

The estimated detection limit (EDL) was used as a criterion for dynamic reaction cell optimization, according to Tanner *et al.* [27]. Broadly, the EDL (Eq. 2) is an optimization parameter obtained for each reaction gas flow rate and represents, indirectly, the efficiency of ammonia as reaction gas to solve the problem related with spectral overlap. Although the EDL does not represent strictly the detection limit of the method, it is considered a good estimate.

$$EDL = \frac{3 \times \sqrt{I_{Blank}}}{I_{Sample\ Solution} - I_{Blank}} \quad (2)$$

As can be seen in Figure 2, the m/z 80 intensity was reduced from 5×10^6 to around 200 cps and 8000 cps for blank (■) and yeast sample (▲), respectively. The increase of ammonia flow rate reduced the incidence of interfering species, mainly $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$; in this way the ^{80}Se was used for subsequent studies. The most adequate operational conditions of DRC were determined observing the lower estimated detection limit (EDL; *) this value being 1 mL min^{-1} .

3.4 Optimization of selenium species separation by HPLC-DRC-ICP-MS

Different percentages of ACN were investigated and the optimal amount was established at 1 %. The employment of higher percentages of the organic modifier can result in carbon deposits in mechanical parts of the equipment (DRC-ICP-MS) while lower values retard the elution of selenium species on the column. In order to avoid the elution of inorganic selenium species in the dead volume of the column, TBAOH was used as ion-pairing reagent and its concentration was selected taking into account chromatographic resolution. The concentration chosen was 0.05 mmol L^{-1} . $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ at 0.5 mmol L^{-1} was used to adjust the pH to 6.3.

The samples were prepared in water since differences were not observed in the chromatographic profile between samples prepared in water or in mobile phase.

3.5 Validation of HPLC-DRC-ICP-MS coupling

The repeatability was defined as relative standard deviation (RSD) of the peak area for six injections of $^{80}\text{SeMet}$, representing 3 % of the precision of the instrumental setup. The calibration curve was built from the SeMet standard solutions using Chromera[®] speciation software to integrate the chromatographic peak areas. Good linearity was achieved in the concentration range studied ($0.5 - 3 \text{ mg kg}^{-1}$ as SeMet, $n = 3$). The Figure 3 shows the calibration curve obtained for different selenium isotopes

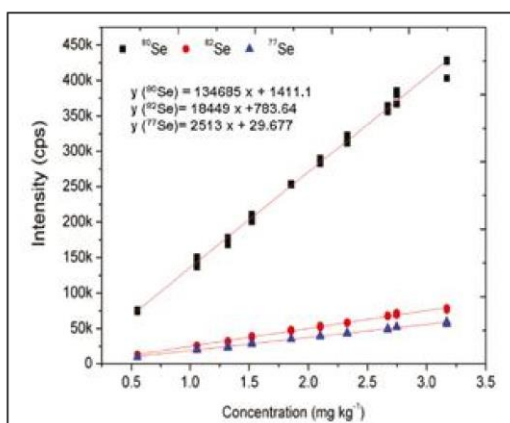


Figure 3. Calibration curve of SeMet; isotopes 82, 80 and 77.

The detection limit (calculated as the concentration for the net signal equivalent to three times the background noise in the chromatogram) was $36 \mu\text{g kg}^{-1}$ for $^{80}\text{SeMet}$.

The method accuracy employed for Se speciation by HPLC-DRC-ICP-MS was evaluated by analysis of CRM SELM-1 and the results obtained for SeMet determination ($3420 \pm 295 \text{ mg kg}^{-1}$) were in good agreement with the certified value ($3448 \pm 146 \text{ mg kg}^{-1}$), indicating that the sample preparation allowed extracting SeMet and that neither degradation nor interconversion of the analyte was observed.

3.6 Selenium determination in extracted samples

3.6.1 Determination of total Se by ICP OES

The method employed for total Se determination by ICP OES was optimized (item 3.1) and validated (item 3.2). The results obtained ($2048 \pm 69 \text{ mg kg}^{-1}$) were in good agreement with the certified value ($2059 \pm 64 \text{ mg kg}^{-1}$).

Total Se in the enzymatic and non-enzymatic extracts was also determined by ICP OES using external calibration in the range of $0.2 - 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$. All the sample extracts were adequately diluted in 2 % HNO_3 and analyzed under the experimental conditions given in Table I.

The values obtained for extraction employing non-proteolytic procedures were in the concentration range from $274 \pm 18 \text{ mg kg}^{-1}$ to $502 \pm 32 \text{ mg kg}^{-1}$ and for proteolytic procedures were in the range from $1888 \pm 123 \text{ mg kg}^{-1}$ to $2042 \pm 120 \text{ mg kg}^{-1}$, corresponding to 12 - 22 % and 82 - 92 % of the total Se content in the yeast samples, respectively (values corrected for moisture). These values were obtained by the division of total Se concentration in the extracts by the total Se concentration in the digested yeast sample [28] (value 2170 mg kg^{-1} used as reference). Figure 4 shows the recovery of the selenium for different extraction procedures.

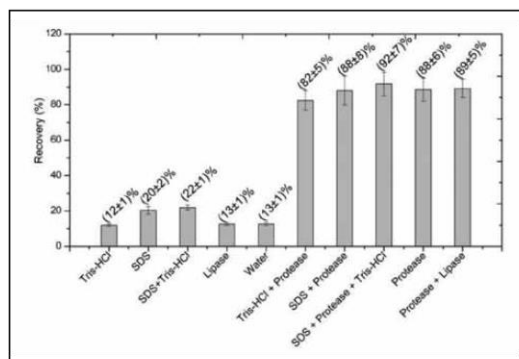


Figure 4. Recovery of selenium with different extraction procedures.

The procedure employing Tris-HCl, close to the physiological pH 7.5, showed similar recovery (12 %) to the water

only procedure (13 %). It can be explained by extraction of inorganic species and selenocompounds soluble in water. The use of SDS increased the selenium extraction (20 % for SDS and 22 % for SDS+Tris-HCl) corresponding to the free fraction (also extracted with the water procedure) and the fraction weakly bound to protein [29].

Lipase is able to release selenocompounds bound in the lipidic fraction. The results obtained by this extraction procedure were similar to those obtained with water and Tris-HCl extractions.

Enzymatic hydrolysis using protease has been one of the most common techniques for selenium compound extraction in yeast samples due to the high extraction yields, in the range 80-90 % [28-30]. As can be seen in Figure 4, the recovery for proteolytic procedures was higher than non-proteolytic ones. This fact can be explained by the action of protease on proteins with high selenium levels present in the sample yeast. This enzyme acts to release the selenium aminoacids in no specific way. Thus the enzymatic extraction with protease was selected for further analysis due to be the most efficient procedure for extracting selenium without degradation of selenoamino acids.

3.6.2 Determination of SeMet by HPLC-DRC-ICP-MS

The main problem concerning the development of analytical procedures for Se speciation is the lack of CRMs [31], qualified standard solutions of some selenium species and poor knowledge about the stability of this species in different matrices. Furthermore, sample preparation is the critical point to assure method accuracy, since it is necessary to obtain appropriately efficiency extractions without degradation or interconversion of the analytes.

Selenium speciation studies in yeast samples confirmed the presence of a variety of chemical forms in these organisms. In this sense, the use of different extraction protocols to distinguish between different fractions of selenium present in the sample was investigated.

The extraction protocols were described in the item 2.5. The non-proteolytic extracts were diluted 1:3 with Type I water before injection in the HPLC system. The chromatographic profiles obtained by Tris-HCl, SDS, SDS + Tris-HCl and water procedures were similar according to Figure 5. The selenium compounds obtained were not quantified due to absence of standards and low recovery, the signal intensities of some peaks on the chromatograms were close to quantification limits.

The chromatograms obtained using non-proteolytic extractions showed up to 6 Se species. Trying to assign the identity of the observed chromatographic peaks, their retention times were compared with those of the selenium standards available in our lab (selenite, selenate, selenomethionine and selenocystine) by analysis of a sample fortified with these standards.

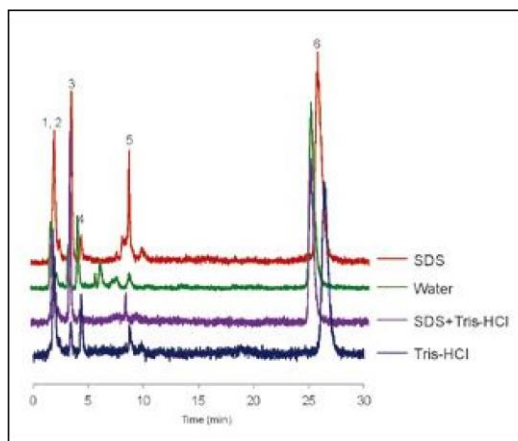


Figure 5. Non-enzymatic extraction, ^{80}Se .

According to Casiot [29], the compounds extracted include weakly bound and water-soluble selenite, selenoamino acids and possibly trimethylselenonium and selenogluthathione.

Looking at the extraction procedures in general, some topics were investigated. First, non-proteolytic extraction conditions showed low recoveries ($< 25\%$, see Figure 4), the SDS procedure tended to show a slight increase of selenium intensity when compared with other non-proteolytic extracts. SDS is widely used to denature proteins and to render them water soluble by forming ion pairs [20].

The chromatograms (Figure 5) showed Se species peaks near dead volume, probably $\text{Se}(\text{Cys})_2$ and SeOMet , peaks 1 and 2. SeMet (peak 3) and Se(IV) (peak 5) were confirmed with retention times of 3.39 and 8.96 min, respectively, using spiked solutions. A major peak (peak 6) eluted at 28 min could not be identified due to the absence of selenium standards.

In the enzymatic hydrolysis with protease, the enzyme breaks the peptide bonds of unspecified forms, releasing the selenoaminoacids present in proteins without their degradation; on the other hand, the information of the proteins in the original sample is lost. According to Szpunar and collaborators [30] the predominant form of Se in yeast is selenomethionine (SeMet) ($\approx 80\%$), whereas other compounds are in smaller quantities.

The profiles observed for enzymatic hydrolysis with protease (Figure 6) showed selenomethionine as a major species, minor chromatographic peaks and others in the dead volume, the last ones could not be quantified due to their low intensity and lack of resolution. Gosetti *et al.* [32] found similar unknown peaks when extracting selenium from yeast using a similar extraction procedure and chromatographic conditions.

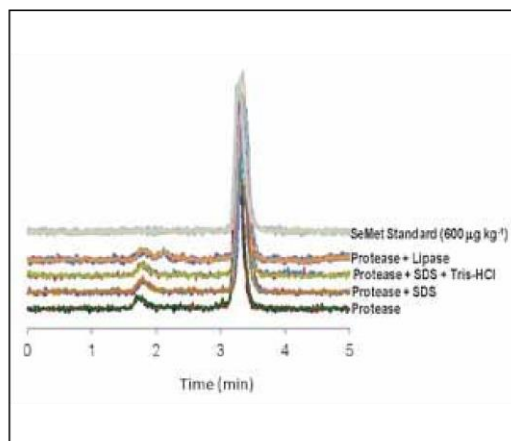


Figure 6. Different extraction procedures of SeMet from a yeast sample using protease, $n=3$.

The concentration of $^{80}\text{SeMet}$ was $3011 \pm 288 \text{ mg kg}^{-1}$ in the sample analyzed in triplicate using only protease and external calibration ($0.10 - 0.85 \text{ mg kg}^{-1}$; $y = 168431x - 340$, $R^2 = 0.99594$). The high contents of SeMet , which appear in small quantities in the non-proteolytic extract, implies that most selenoamino-acid is incorporated mainly into selenoproteins in the solid sample [20].

The extraction solution using only protease was able to extract the selenium compounds from the yeast sample with high extraction yields, assuring reliable results with acceptable accuracy. For being simpler, faster and less susceptible to cross contamination, after validation with CRM SELM-1, this extraction is the authors' choice to be applied in the next steps of this work.

3.7 Measurement uncertainty

The estimative of the measurement uncertainty in speciation analysis is complex because of several reasons: (i) chemical measurements are more difficult to model; (ii) there are more uncertainty sources that are often very difficult to quantify; (iii) inhomogeneity of the samples and (iv) the separation of the chemical species to be determined [33].

According to Figure 1 (Ishikawa diagram), in this work the uncertainty sources investigated were: uncertainty of the SeMet concentration in the analytical solution (u_{co}), the uncertainty of the sample dilution (u_{df}), the uncertainty of the sample extraction (u_{ext}), the uncertainty of the instrumental repeatability (u_{rep}) and the uncertainty associated with moisture (u_{moist}). Figure 7 shows the relative uncertainty of each source.

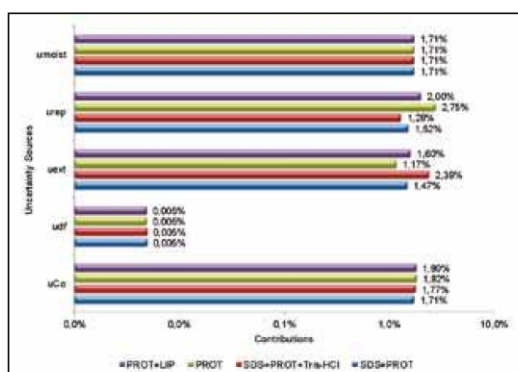


Figure 7. Relative uncertainty contributions.

The major relative uncertainty contribution for SeMet determination was instrumental repeatability (u_{rep}). This uncertainty source depends on several factors: (i) the interaction between mobile phase, column and analyte, (ii) efficiency of transport of the analyte in the interface HPLC-DRC-ICP-MS, (iii) repeatability of the volume injection, (iv) peak integration, (v) column temperature, (vi) imperfect functioning of mechanical parts of the chromatographic pump or electronic parts of the system, (vii) pulses from the peristaltic pump (make-up flow rate), (viii) fluctuation of nebulizer gas, (ix) inefficient mixing between column effluent and make-up flow in the T piece, etc. [34]. These variables can explain the elevated contribution of this parameter to measurement uncertainty.

The relative uncertainty sources of u_{ext} , u_{CO} and u_{moist} have similar contributions (1.6 % - 1.8 % in relation to SeMet concentration in the sample).

The extraction procedure (u_{ext}) depends on enzyme activity, in other words, the ability of protease to fragment selenoproteins from yeast into its respective selenoaminoacids. The enzymatic activity depends on small variations in pH, temperature, sample to enzyme mass ratio and the time of reaction [24]. The specificity of the reaction and the spatial arrangement between the protease and the proteins also contribute to the vulnerability of the extraction procedure, resulting in greater dispersion of values.

Calibration curve regression is the major factor responsible for the variation of the SeMet concentration in the analytical solution (u_{CO}). The uncertainty of the estimated coefficients, the residual behavior of the calibration curve, assuming linearity in the case of slight nonlinearity of the calibration curve and instrumental repeatability are considered as critical points that increase the contribution of this uncertainty source [33].

The procedure used to determine sample moisture was made at 105°C in an air oven until constant weight.

The water amount in yeast samples can be problematic for accurate analysis. Generally, high values of uncertainty (u_{moist}) can be explained due to volatilization problems of some component of the samples and the difficulty of removing all of the water molecules originally present without changing the mass of matrix and the chemical species [35], important in speciation analysis.

4 Conclusion

The HPLC-DRC-ICP-MS method developed in this work was optimized and validated. Good agreement of the certified value of SeMet was obtained for CRM SELM-1 (value obtained: 3420 ± 295 mg kg⁻¹ and certified value: 3448 ± 146 mg kg⁻¹) and the figures of merit were considered adequate for the intended use.

The DRC effectively reduced the argon dimer interferences enabling the use of the most abundant isotope ⁸⁰Se and consequently to obtain a higher signal/noise ratio.

Different extraction protocols were evaluated to determine the presence of species of selenium in selenized yeast. The results obtained showed that the main Se species present in yeast is SeMet. Higher extraction efficiencies were obtained using the proteolytic method. SeMet appears in lower amounts when non-proteolytic procedures were used, indicating that this aminoacid is not free, but incorporated into selenoproteins.

This work provides metrological information on selenomethionine determination in yeast samples since it is part of a broader project aimed to production of a national certified reference material. The main uncertainty sources which affect the measurand (C_{SeMet}) were the instrumental repeatability (u_{rep}) and SeMet concentration in the analytical solution (u_{CO}), that contributed 35 % and 23 %, respectively, for ⁸⁰SeMet and protease extraction.

Acknowledgements

The authors are grateful to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) – Brazil, (Project: PROMETRO 563105-2010-0) for financial support.

References

- Heras, I.L.; Palomo, M.; Madrid, Y.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 1717.
- Clark, L.C.; Combs, G.F.; Turnbull, B.W.; Slate, E.H.; Chalker, D.K.; Chow, J.; Davis, L.S.; Glover, R.A.; Graham, G.F.; Gross, E.G.; Krongrad, A.; Leshner, J.L.; Park, H.K.; Sanders, B.B.; Smith, C.L.; Taylor, J.R.; *J. Am. Med. Assoc.*, 1996, 276, 1957.
- MacFarquhar, J.K.; Broussard, D.L.; Melstrom, P.; Hutchinson, R.; Wolkin, A.; Martin, C.; Burk, R.F.; Dunn, J.R.; Green, A.L.; Hammond, R.; Schaffner, W.; Jones, T.F.; *Arch. Intern. Med.*, 2010, 170, 256.
- Yang, L.; Sturgeon, R.E.; McSheehy, S.; Mester, Z.; *J. Chromatogr. A*, 2004, 1055, 177.
- Dumont, E.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, 1304.

6. Larsen, E.H.; Sloth, J.; Hansen, M.; Moesgaard, S.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 310.
7. Vacchina, V.; Moutet, M.; Yadan, J.; Baene, F.; Kudla, B.; Lobinski, R.; *J. Chromatogr. B.*, 2010, 878, 1178.
8. Dernovics, M.; Lobinski, R.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 744.
9. Kitaguchi, T.; Ogra, Y.; Iwashita, Y.; Suzuki, K.T.; *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, 227, 1455.
10. Wróbel, K.; Wróbel, K.; Kannamkumarath, S.S.; Caruso, J.A.; Wysocka, I.A.; Bulska, E.; Świątek, J.; Wierzbicka, M.; *Food Chem.*, 2004, 86, 617.
11. Wrobel, K.; Wrobel, K.; Caruso, J.A.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 1048.
12. Grant, T.D.; Montes-Bayón, M.; LeDuc, D.; Fricke, M.W.; Terry, N.; Caruso, J.A.; *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1026, 159.
13. McSheehy, S.; Pohl, P.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 68.
14. Far, J.; Preud'homme, H.; Lobinski, R.; *Anal. Chim. Acta.*, 2010, 657, 175.
15. Fang, Y.; Zhang, Y.; Catron, B.; Chan, Q.; Hu, Q.; Caruso, J.A.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 1657.
16. Roman, M.; Sánchez, M.L.F.; Sanz-Medel, A.; Iglesias, H.G.; Cescon, P.; Barbante, C.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 100.
17. Montes-Bayón, M.; Molet, M.J.D.; Blanco-Gonzalez, E.; Sanz-Medel, A.; *Talanta*, 2006, 68, 1287.
18. Cañas, B.; Pineiro, C.; Calvo, E.; López-Ferrer, D.; Gallardo, J.M.; *J. Chromatogr. A*, 2007, 1153, 235.
19. Mesko, M.F.; Hartwig, C.A.; Bizzi, C.A.; Pereira, J.S.F.; Mello, P.A.; Flores, E.M.M.; *Int. J. Mass Spectrom.*, 2011, 307, 123.
20. Huerta, V.D.; Sánchez, M.L.F.; Sanz-Medel, A.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 644.
21. Reyes, L.H.; Sanz, F.M.; Espílez, P.H.; Marchante-Gayón, J.M.; Alonso, J.I.G.; Sanz-Medel, A.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 1230.
22. Stefánka, Z.; Ipolyi, I.; Dernovics, M.; Fodor, P.; *Talanta*, 2001, 55, 437.
23. Infante, H.G.; O'Connor, G.; Rayman, M.; Wahlen, R.; Entwistle, J.; Norris, P.; Hearn, R.; Cattericka, T.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 1529.
24. Peachey, E.; McCarthy, N.; Goenaga-Infante, H.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 487.
25. Capelo, J.L.; Ximénez-Embún, P.; Madrid-Albarrán, Y.; Cámara, C.; *Anal. Chem.*, 2004, 76, 233.
26. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*. International Organization for Standardization (ISO), JCGM 100:2008.
27. Tanner, S.D.; Baranov, V.I.; Bandura, D.R.; *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, 1361.
28. Huerta, V.D.; Reyes, L.H.; Marchante-Gayón, J.M.; Sánchez, M.L.F.; Sanz-Medel, A.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 1243.
29. Casiot, C.; Szpunar, J.; Łobiński, R.; Potin-Gautier, M.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 645.
30. Polatajko, A.; Banaś, B.; Encinar, J.R.; Szpunar, J.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 844.
31. Rodríguez-Gonzalez, P.; Alonso, J.I.G.; *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 239.
32. Gosetti, F.; Frascarolo, P.; Polati, S.; Medana, C.; Gianotti, V.; Palma, P.; Aigotti, R.; Baiocchi, C.; Gennaro, M.C.; *Food Chem.*, 2007, 105, 1738.
33. Leito, S.; Mölder, K.; Künnas, A.; Herodes, K.; Leito, I.; *J. Chromatogr. A*, 2006, 1121, 55.
34. Barwick, V.J.; *J. Chromatogr. A*, 1999, 849, 13.
35. ElSayed, N.I.; Mekawy, M.M.; Megahed, F.M.; *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 2011, 5, 582.