



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo da distribuição de selênio em
animais experimentais
em função da espécie de selênio ingerida
e da via de administração**

TESE DE DOUTORADO

EMILENE MENDES BECKER

Santa Maria, RS, BRASIL

2006

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE SELÊNIO EM ANIMAIS
EXPERIMENTAIS EM FUNÇÃO DA ESPÉCIE DE SELÊNIO
INGERIDA E DA VIA DE ADMINISTRAÇÃO**

por

Emilene Mendes Becker

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de
Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR EM
QUÍMICA**

Orientadora: Denise Bohrer

Santa Maria – RS, Brasil

2006

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE SELÊNIO EM ANIMAIS
EXPERIMENTAIS EM FUNÇÃO DAS ESPÉCIES SE SELÊNIO
INGERIDA E DA VIA DE ADMINISTRAÇÃO**

elaborada por

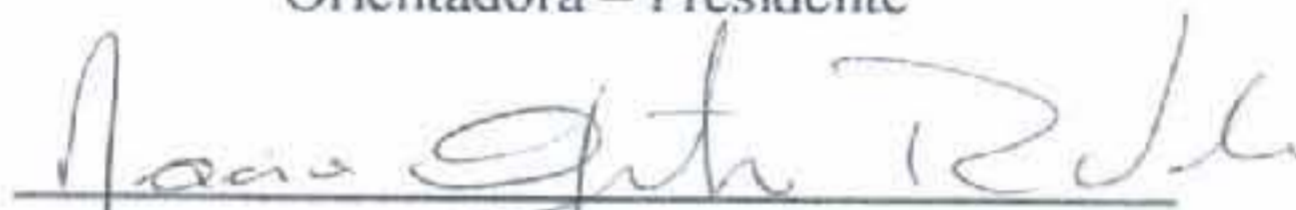
Emilene Mendes Becker

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Química


COMISSÃO EXAMINADORA



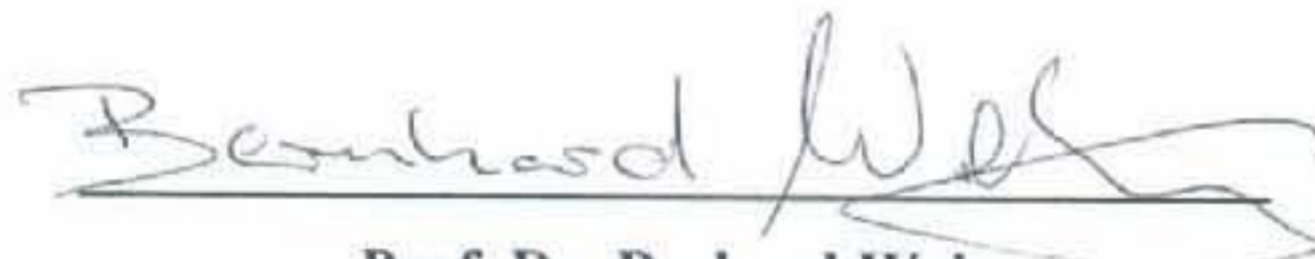
Prof. Dra. Denise Bohrer do Nascimento
Orientadora – Presidente



Prof. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS



Prof.ª Dra. Cristina Wayne Nogueira
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM



Prof. Dr. Bernhard Welz
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC



Prof. Dr. Marcelo Barcelos da Rosa
Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE

Santa Maria, 21 de dezembro de 2006

Ao Antônio, minha fonte de
inspiração e apoio para continuar a luta
de todos os dias. Obrigada pelo
carinho, amizade e amor.

AGRADECIMENTOS

À professora Denise Bohrer meu sincero agradecimento pela orientação profissional, paciência e apoio em todas as etapas, incluindo as mais difíceis, transcorridas ao longo destes quase 8 anos de convivência. O aprendizado adquirido foi muito além dos experimentos científicos. E a amizade cultivada neste período também foi muito importante.

Ao professor Paulo Cícero do Nascimento, muito obrigada pela paciência, incentivo nos momentos mais críticos e sugestões que foram vitais na continuidade do trabalho experimental, principalmente na iniciação do universo da Cromatografia. Pelas sugestões e participação no exame de qualificação. Muito obrigada também pela sua amizade.

À Prof^a. Dr^a. Cristina Nogueira pela sua valiosa participação na etapa mais crucial do trabalho, obrigada por dividir seu conhecimento, pela orientação no projeto, pelas sugestões e críticas, sempre construtivas, e também por disponibilizar seu tempo e os seus alunos. Pela participação no exame de qualificação e na defesa de tese.

À Prof^a. Dr^a. Maria Goreti Vale, nossa colaboradora nas pesquisas, muito obrigada pelo seu apoio, disponibilizando o equipamento para finalizar o experimento deste trabalho. Obrigada também pela sua participação no exame de qualificação e na defesa de tese. Pelo seu carinho e amizade desde que lhe conheci.

Ao Prof. Dr. Bernard Welz pela sua ilustre participação na defesa de tese, sugestões e questionamentos. Obrigada pela sua colaboração que muito contribuiu para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Barcelos da Rosa que se dispôs a participar da defesa de tese. Obrigada pelas sugestões.

A Prof^a. Dr^a. Solange Pumblum que colaborou com sugestões e idéias que se tornaram depois um grande experimento, em uma área que era por mim desconhecida. Obrigada também pelo apoio e por disponibilizar seus alunos.

Ao Prof. Dr. Valdeci Pumblum por reservar um tempo na sua atarefada rotina e fazer com que o experimento fosse concluído. Seus conhecimentos foram também de vital importância.

Ao funcionário Jorge que pacientemente colaborou para que o trabalho pudesse ser realizado, com sua experiência em manejo com animais experimentais. Muito obrigada pelo apoio e amizade.

Ao funcionários do Biotério Central que sempre se dispuseram para orientar e apoiar durante todo o trabalho que foi realizado naquele local.

À Vanessa e à Lucieli, alunas da professora Cristina, que colaboraram com seu tempo e sua experiência no desenvolvimento do trabalho, meu sincero agradecimento.

Ao André, aluno da professora Solange, que disponibilizou seu tempo e seu conhecimento ao longo de mais de dois meses para o tratamento dos animais experimentais.

À minha amiga e (ex) colega Morgana Dessuy, que sempre contribuiu com seus muitos préstimos e sua boa vontade, de perto no início e no final do trabalho, e de longe com seu apoio e amizade, sempre com uma palavra de ânimo e carinho.

À minha amiga e (ex) colega Marení Pauletto por dedicar tempo e auxiliar na rotina de experimentos para que o trabalho pudesse ser iniciado. Obrigada pela tua amizade, carinho e apoio.

À minha amiga e colega Juliana Fronchetti de Moura, obrigada pela tua insistente amizade e apoio nos momentos que foram críticos. As horas que você dedicou foram vitais na realização deste trabalho.

Aos colegas do Lachem com os quais convivi durante todos esses anos, especialmente a Daiane, Luciana, Micheli, Carine e Danieli. A lembrança do convívio diário e dos bons (e também maus) momentos que passamos juntos ficarão na memória por muitos e muitos anos.

A minha grande amiga Márcia Kurz, faço minhas as tuas palavras, foram muitos momentos que compartilhamos: angústias, aflições, dúvidas, alegrias e realizações. Sucesso para nós.

Aos meus pais pelo carinho, torcida e preocupação para que eu obtivesse sucesso.

À UFSM pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

À CAPES suporte financeiro.

À Deus, por mais esta grande conquista.

**“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.**

**Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.**

**Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.**

**Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.**

**O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.**

**Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.**

**O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.**

**Dê ao mundo o melhor de você, mas isso nunca pode ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.**

**Veja você que, no final das contas, é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as outras pessoas.”**

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

TESE DE DOUTORADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE SELÊNIO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS EM FUNÇÃO DA ESPÉCIE DE SELÊNIO INGERIDA E VIA DE ADMINISTRAÇÃO

AUTORA: EMILENE MENDES BECKER
ORIENTADORA: PROF. DR^a. DENISE BOHRER

O selênio (Se) é um micronutriente essencial que atua em muitos processos fisiológicos importantes, participa da atividade de muitas enzimas. Sua significância clínica está relacionada à atuação de seus compostos como coadjuvante na prevenção e combate de diversas doenças entre elas o câncer, doenças cardíacas e doenças imunológicas. A atuação nas diversas funções vitais, no entanto, está relacionada à sua forma química. Vários estudos têm ressaltado a importância da suplementação do selênio na dieta, tanto na forma oral como parenteral, porém há uma incerteza sobre a melhor espécie de Se a ser utilizada.

Neste trabalho, primeiramente, adequou-se a metodologia para quantificação do selênio total em amostras biológicas entre elas levedura e tecidos como músculo e pele. Fez-se um comparativo entre as técnicas de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e geração de hidretos para esta determinação. Os resultados demonstraram que a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos (HG AAS) se mostrou mais adequada para quantificação do Se após o procedimento de digestão da amostra, uma vez que as interferências causadas pela técnica de Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GF AAS) não puderam ser minimizadas.

Para o estudo da absorção e distribuição do selênio utilizaram-se dois modelos animais, aves domésticas e coelhos.

O Se foi determinado na gordura extraída do músculo de frango e no resíduo deste após a digestão. A gordura foi extraída com solventes orgânicos (metanol:diclorometano 1:3) e o Se determinado por GF AAS. O resíduo foi digerido com a mistura de ácidos nítrico e perclórico, e a redução do Se (VI) a Se (IV) realizada com NaBr/ácido sulfâmico, antes da medida por HG AAS.

Os limites de detecção (LOD) encontrados foram 1 µg/L e 6 µg/L para as técnicas de GF AAS e HG AAS. Os resultados mostraram que ocorre a distribuição do selênio entre a gordura extraída (20%) e resíduo (80%).

A análise de especificação dos selenoaminoácidos, selenometionina (SeM) e selenocistina (SeC), foi realizada utilizando os reagentes de derivação para aminoácidos 9-metilfluorenil clorofórmio (FMOC) e *o*-ftaldeído (OPA) com detecção ultravioleta (pré-coluna) e fluorescente (pós-coluna), respectivamente. O método cromatográfico foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-FMOC) o qual utilizou separação em fase reversa, obtendo-se valores de LOD de 0,50 mg/L e 0,20 mg/L respectivamente para SeM e SeC. As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 1,6 e 8,0 mg/L para SeM e 0,80 a 8,0 mg/L para SeC. O método HPLC-OPA baseou-se na cromatografia de troca aniônica, com coluna AminoPac PA1 para aminoácidos, obtendo-se valores de LOD de 0,005 e 0,009 mg/L para SeM e SeC, respectivamente.

A caracterização da levedura (Experimento 1) que é utilizada como suplementação alimentar de aves foi realizada. O Se total, a fração solúvel em água e o Se presente nas proteínas foram determinadas através da digestão ácida, extração com água e separação das proteínas por adsorção em coluna de polietileno em pó, respectivamente. As medidas da concentração de Se foram realizadas por HG AAS (amostra digerida) e GF AAS (extratos aquosos e fração ligada à proteína). Adicionalmente, determinaram-se os selenoaminoácidos no extrato aquoso e na fração ligada à proteína, após a hidrólise, por HPLC-OPA. Verificou-se que no extrato aquoso 6% são Se inorgânico e 94% é orgânico. Considerando a parte orgânica 98% é SeM, 58% está ligado a proteína e 37% está na forma livre.

O comparativo entre suplementação oral com Se inorgânico (selenito de sódio) e orgânico (levedura enriquecida com Se) em aves foi realizado (Experimento 2). O tratamento com levedura promoveu um aumento da concentração de Se total no músculo e na gordura. O valor médio da concentração de Se nas aves tratadas com selenito de sódio foi de 0,13 µg/g e de 0,32 µg/g após a suplementação com Se orgânico (levedura).

Também foi investigado a avaliação da suplementação de Se inorgânico (selenito de sódio) e Se orgânico (SeM) através da via parenteral em coelhos. A administração realizou-se através de dois experimentos diferentes (4 e 5). O experimento 4 foi o estudo cinético, administrando 0,2 mg/kg de Se, e avaliando-se o Se total e as espécies SeM e SeC no soro após 15, 30, 60 e 120 minutos. O Se total teve uma concentração máxima de Se em 15 minutos após a

administração de Se inorgânico. O grupo que recebeu SeM possui valores elevados neste mesmo tempo, porém não pronunciados, podendo evidenciar a sua mais rápida distribuição. Os resultados também mostram que não houve interconversão do Se (IV) em selenoaminoácidos, sendo as variações de concentração similares para os grupos após a administração do Se (IV). A administração de SeM mostrou redução gradual de concentração após 15 minutos, mas nenhuma alteração na concentração de SeC foi observada.

O experimento 5 foi o estudo sub-crônico. A administração de Se orgânico aumentou significativamente o Se total no soro sanguíneo e na urina, bem como nos tecidos cérebro, coração, músculo e baço. Por outro lado, o fígado foi o tecido que mostrou maior acúmulo de Se com a administração de Se (IV). O rim não mostrou diferença significativa entre as formas de Se. Os parâmetros de avaliação toxicológica (medida dos níveis de ALA-D, TBARS, ácido ascórbico) não mostraram alterações significativas entre os tratamentos com as diferentes formas de Se.

Os resultados obtidos com o tratamento oral das aves se mostraram similares ao tratamento parenteral, onde a forma orgânica produz uma disponibilidade maior de selênio em relação ao encontrado no músculo.

ABSTRACT

Selenium is an essential micronutrient that plays an important role in many physiological processes. Its clinical significance is related to the action of selenocompounds as adjuvant in preventing diseases such as cancer and heart failure and also in improving the immunological defenses of the organism. Since the ability of selenium in acting as a protective agent depends on its form, it is important to investigate which form of selenium ingested promotes the best absorption and distribution in the organism.

In this work, the methodology for selenium quantification in biological samples such as yeast, blood and tissues was evaluated. Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) and hydride generation atomic absorption spectrometry (HG AAS) were compared for total selenium quantification. The results showed that the HG AAS is more adequate for Se determination after acidic digestion procedure, since the interferences caused by the acids in the GF AAS measurements could not be minimized.

Two different animals were used as model for studying the absorption and distribution of selenium in different organs, chicken and rabbit.

Selenium was determined or in the fat extracted from the muscle of chicken meat and in the residue of this tissue after fat extraction. Fat was extracted with organic solvents (methanol:dichloromethane 1:3) and analysed by GF AAS. The muscle residue was digested with a HNO₃/HClO₄ mixture and the selenium reduction, before the HG measurement, carried out with NaBr/sulfamic acid. The limits of detection were 1 µg/L and 6 µg/L for GF AAS and HG AAS respectively. The results showed that selenium is distributed between fat (20%) and tissue residue (80%).

The speciation of the selenoamino acids, selenomethionine (SeM) and selenocystine (SeC) was carried out by chromatography using the reagents 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) and *o*-phthaldehyde (OPA) with UV and fluorimetric detection, respectively. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was carried out with reversed phase and FMOC. The limits of detection were 0.50 and 0.20 mg/L for SeM and SeC respectively. In the HPLC-OPA method the amino acids were separated by ion-exchange and the limits of detection were 0.005 and 0.009 mg/L for SeM and SeC, respectively.

The yeast used as selenium supplementation for the chicken analyzed in this work was characterized according to its selenium content. Total selenium, the fraction soluble in water and the selenium present in the proteins were determined by acid digestion, extraction with water, and separation of proteins by adsorption in a polyethylene powder column, respectively. The measurements were carried out by HG AAS (digested sample) and by GF AAS (aqueous extract and proteic fraction). The selenoamino acids were also determined in the aqueous extract and in the protein fraction after protein hydrolysis using the HPLC-OPA method. From the total selenium present in the aqueous extract, 6% was inorganic and 94% organic. Considering the organic part, 98% was present as SeM. Fifty eight per cent was bound to proteins, whereas 37% was found as free amino acid.

Two groups of chicken were treated with selenium, one group with sodium selenite and the other with the above mentioned yeast. The animals treated with the yeast presented higher Se levels in the muscle and also in the fat. The mean value of selenium found in these chickens was 0.13 $\mu\text{g/g}$ for the ones treated with sodium selenite and 0.32 $\mu\text{g/g}$ for those treated with the yeast.

It was also investigated the supplementation of selenium, using both forms, inorganic (sodium selenite) and organic selenium (SeM) through the parenteral via in rabbits. The administration was carried out in two different ways. In one experiment 0.2 mg/kg Se was administrated, and the species SeM and SeC were evaluated in the animal's blood after 15; 30; 60; and 120 min after the injection. In the other, both forms of selenium (0.1 mg/kg) were administrated for 6 weeks, in alternating days (sub-chronic treatment). In the first experiment, significant changes were observed in the total Se in the serum of the animals treated with sodium selenite, whereas in the animals treated with SeM a high but constant Se level was observed. No changes were observed in the SeC level for both groups of animals after the administration of both Se forms. On the other hand, as could be expected, there was a peak of SeM just after the administration (15 min) in the group that received SeM. After the sub-chronic treatment, Se was increased in serum, urine, and also in the brain, heart, muscle, and spleen of the animals treated with SeM. By contrast, Se was increased only in the liver of the animals treated with inorganic selenium. In the kidney no difference was observed either for SeM or selenite administration. The parameters for toxicological evaluation (measurement of ALA-D activity, TBARS, ascorbic acid, among others) did not show any difference between both administrated forms of selenium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da tese	5
Figura 2 – Interações metabólicas entre as formas inorgânicas e orgânicas de selênio	17
Figura 3 – Distribuição do selênio após a ingestão.....	18
Figura 4 – Sistema de HPLC com derivação pós-coluna com OPA-SH e detecção fluorescente usado para a determinação dos aminoácidos, onde EI: 200 mmol/LNaOH e EII: 700 mmol/LNaAc	40
Figura 5 – Sistema de HPLC-UV e derivação pré-coluna com FMOC para determinação dos selenoaminoácidos.....	42
Figura 6 – Sistema empregado no estudo da retenção das proteínas na coluna de polietileno (PE) em pó.....	47
Figura 7 – Curvas de pirólise e atomização de Se IV (●), SeM (■) e SeC (▲) (1 ng de Se) em água (a) e no extrato orgânico do músculo (b) e pele (c). Temperatura de atomização para curvas de pirólise: 2600°C; Temperatura de pirólise para curvas de atomização: 1100 °C. Modificador: NiNO ₃ 2,5 g/L.....	59
Figura 8 – Etapas dos procedimentos de digestão ácida para determinação de Se total por GF AAS e HG AAS.....	63
Figura 9 – Procedimentos de pré-redução do Se VI para determinação de Se total por HG AAS	64
Figura 10 – Recuperação do Se das amostras do músculo após etapa de pré-redução de Se VI com irradiação UV com e sem adição de H ₂ O ₂ . Fortificação pré-digestão com H ₂ O ₂ (◇), fortificação pré-digestão (■), fortificação pré-irradiação UV com H ₂ O ₂ (▲),fortificação pré-irradiação UV (●). Determinação feita por HG AAS	66

Figura 11 – Recuperação de Se das amostras fortificadas antes da digestão e antes da extração da gordura. O Se no extrato de gordura foi determinado por GF AAS e no resíduo por HG AAS após pré-tratamentos de redução: músculo (1) e pele (2).....	67
Figura 12 – Espectro de absorção dos selenoaminoácidos SeM e SeC (400 mg/L) com OPA-SH	69
Figura 13 – Reações da derivação dos aminoácidos com o reagente de derivação OPA-SH (o-ftaldeído).....	71
Figura 14 – Variação da área do pico da SeC 0,8 mg/L (●), SeC 1,6 mg/L (■) e SeC 8 mg/L (▲) em função da concentração do ácido iodo-acético (AIA), em mol/L.....	72
Figura 15 – Reação geral de reação de aminoácidos com ácido iodo-acético (AIA).....	73
Figura 16 – Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de ruído da linha base e sinal do analito	76
Figura 17 – Espectros de absorção molecular dos aminoácidos arginina, metionina, selenometionina e selenocistina 400 mg/L com o reagente de derivação FMOC	79
Figura 18 – Cromatograma típico da solução padrão contendo 8 mg/L dos aminoácidos selenometionina (tR 15,2 min), e selenocistina (tR 26,7 min) com derivação pré-coluna com FMOC e detecção UV (307 nm).....	80
Figura 19 – Variação da área dos picos dos aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L), pelo método de HPLC-UV, em função do tempo de reação (1, 10, 30 minutos) com o derivatizante FMOC antes da extração	81
Figura 20 – Variação da área dos picos dos aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L), pelo método de HPLC-UV, em função da concentração do reagente de derivação FMOC (3, 7,5, 15 e 30 mmol/L)	82
Figura 21 – Variação da área dos picos dos aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L), pelo método de HPLC-UV, em função do tempo após reação de derivação com FMOC (1, 30 e 120 minutos)...	83
Figura 22 – Reação entre os aminoácidos e o reagente de derivação FMOC.....	83
Figura 23 – Etapas dos procedimentos para a caracterização da levedura	85
Figura 24 – Percentual de Se livre e Se ligado às proteínas nos extratos de H ₂ O e de H ₂ O +Tris/SDS da amostra de levedura após separação na coluna de PE, sendo 100% a concentração de Se na amostra	91

Figura 25 – Hidrólise enzimática de 100 µL de soro após os tempos 0, 30, 60, 120 e 1440 minutos de incubação à 37°C, em um volume final de 5 mL da solução enzimática das enzimas pepsina, bromelâina, papaína e pancreatina.....	95
Figura 26 - (a) Concentração de proteína (●) e (b) de aminoácido (◆) na amostra de 100 µg de levedura após a hidrólise enzimática com a papaína, nos tempos 0, 1, 3, 5 e 24 horas de incubação à 37°C.....	96
Figura 27 – Se (µg/g) nas amostras de aves suplementadas com T2: Se (IV), T3: levedura	100
Figura 28 – Etapas da administração parenteral de Se inorgânico e orgânico em coelhos	103
Figura 29 – Distribuição do Se total no soro de coelhos após 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção parenteral do controle (n = 3), Se inorgânico (Se IV) e Se orgânico (SeM) (n = 6). Determinação de Se por GF AAS	104
Figura 30 – Estudo da variação de concentração de SeM (a) e SeC (b) após a administração parenteral de Se (IV) e SeM (c) e SeC (d) após Se orgânico.....	106
Figura 31 – Esquema do metabolismo humano de espécies de Se.....	107
Figura 32 – Concentração de Se no soro dos grupos de coelhos tratados com Se antes (basal) e após o tratamento sub-crônico	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações enterais contendo selênio	13
Tabela 2 – Programa de temperatura para determinação de Se por GF AAS e parâmetros do espectrômetro de absorção atômica	37
Tabela 3 – Programa de MO para abertura das amostras	52
Tabela 4 – Teor de selênio encontrado na gordura e no resíduo das amostras após a extração da gordura e digestão ácida (pré-redução com ác. sulfâmico/NaBr).....	62
Tabela 5 – Distribuição do Se entre pele e músculo em três amostras diferentes	62
Tabela 6 – Comparação dos diferentes tratamentos para amostras fortificadas antes e após o procedimento de digestão. O procedimento de digestão foi realizado após a secagem e extração da gordura do músculo e pele.	65
Tabela 7 – Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação das espécies de selenoaminoácidos, utilizando OPA como derivatizante.....	70
Tabela 8 – Tempo de retenção dos aminoácidos SeM e SeC com sistema HPLC e detecção fluorescente com derivação pós-coluna com OPA-SH.....	73
Tabela 9 – Resultados obtidos para calibração e LOD e LOQ dos selenoaminoácidos com OPA77	
Tabela 10 – Recuperação dos analitos (RSD) para os analitos SeM e SeC por HPLC-OPA-SH .	78
Tabela 11 – Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação das espécies de selenoaminoácidos, utilizando FMOC como derivatizante	79
Tabela 12 – Resultados obtidos para calibração e LOD e LOQ dos selenoaminoácidos com FMOC	83
Tabela 13 – Recuperação dos analitos (RSD) para os analitos SeM e SeC por HPLC-FMOC-UV	84

Tabela 14 – Concentração de Se ($\mu\text{g/g}$) na levedura por HG AAS, após digestão ácida e etapa de pre-redução com NaBr/sulfâmico	86
Tabela 15 – Concentração de Se total na levedura (HG AAS) e o percentual extraído após o procedimento de extração com água e Tris/SDS (GF AAS)	87
Tabela 16 – Distribuição do Se extraído da amostra de levedura entre Se total, Se inorgânico e Se orgânico	87
Tabela 17 – Avaliação da adsorção das espécies de Se IV e SeM ($100 \mu\text{g/L}$) na coluna de PE ...	89
Tabela 18 – Distribuição das espécies de Se livre e ligado à proteína no extrato aquoso da levedura utilizando coluna de PE.....	89
Tabela 19 – Distribuição de Se livre e ligado à proteína no extrato da levedura (0,1 g amostra + 20 mL de água) utilizando coluna de teflon.....	92
Tabela 20: Comportamento das espécies de Se IV e SeM ($100 \mu\text{g/L}$) na coluna de teflon.....	92
Tabela 21: Distribuição das espécies de Se total (GF AAS) e Se inorgânico (Se IV e Se VI, por HG AAS) no extrato da amostra de levedura em %, utilizando coluna de polietileno.....	93
Tabela 22 – Degradação enzimática de proteínas em % para as amostras de soro e levedura com as enzimas papaína e pancreatina após 24 horas de incubação à 37°C pelo método Azul Brillante de Comassie	97
Tabela 23 – Determinação das espécies de SeM e SeC na amostra de levedura e na fração não ligada as proteínas em mg/L (%)	98
Tabela 24 – Selênio na gordura e no resíduo do músculo de aves tratadas com e sem suplemento de Se, após a extração da fração solúvel e digestão ácida	99
Tabela 25 – Efeito do TCA na determinação do Se livre total (GF AAS) nas amostras de soro sanguíneo	101
Tabela 26 – Determinação da concentração de Se em $\mu\text{g/L}$ na urina dos coelhos após o tratamento sub-crônico com Se (IV) e SeM.....	109
Tabela 27 – Concentração de Se ($\mu\text{g/g}$) nos tecidos de coelhos após tratamento sub-crônico....	110
Tabela 28 – Efeito do tratamento com Se (IV) e SeM sobre a atividade da enzima δ -ALA-D em nmol PGB/g proteína	112
Tabela 29 – Efeito do tratamento com Se (IV) e SeM sobre os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nmol/mg proteína, em coelhos	112

Tabela 30 – Efeito do tratamento com selênio sobre a atividade da enzima Na ⁺ , K ⁺ -ATPase cerebral.....	113
Tabela 31 – Efeito do tratamento com Se inorgânico e orgânico sobre os níveis de ácido ascórbico (µg/g) em coelhos	113
Tabela 32 – Peso (g) dos tecidos dos coelhos após o tratamento com Se	114
Tabela 33 – Efeito do tratamento com Se (IV) e SeM sobre parâmetros toxicológicos.....	114
Tabela 34 – Dosagens de colesterol, triglicerídeos e LDH.....	115
Tabela 35 - Avaliação dos níveis de T3 e T4 livre em ng/dL com o tratamento com selênio....	115

LISTA DE ABREVIACOES

HG AAS – Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry)

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

SeM – Selenometionina

SeC – Selenocistina

SeCys – Selenocisteína

kDa – kilo Dalton

TPN – Nutrição parenteral total (Total Parenteral Nutrition)

ALA-D – Aminolevulínico desidratase

TBARS – Índice de peroxidação lipídica

DNA – ácido desoxirribonucléico

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

SePP – Selenoproteína P

T3 – triiodotironina

T4 – tiroxina

ALT – alanina amino transferase

AST – aspartato amino transferase

ATP – Adenosina tri fosfato

LDH – Lactato desidrogenase

PGB - produto porfobilinogênio

SCN – tiocianato

TMTU – 1,1,3,3 tetrametil-2-tiouréia

SEC – Cromatografia por exclusão de tamanho (Size Exclusion Chromatography)

UV – Ultra-violeta

ICP-MS – Plasma indutivamente acoplado ao espectrômetro de massa

GC – Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)

SPE – Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction)

PE – polietileno

PITC – fenilisotiocianato

Dansyl – cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonil

Fmoc – 9-metilfluorenil clorofórmio

OPA – *o*-ftaldeído

FDNB – 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno

FDNPAA – 1-flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina

FDNDEA)– N,N-dietil-2,4-dinitro-5-fluoranilina

AIA – Ácido iodo-acético

FM – Fase Móvel

EI – Eluente 1

EII– Eluente 2

TCA – Ácido tricloro-acético

MO - Microondas

D.L. 50 – Dose letal à 50% da população

RSD – Desvio Padrão relativo

tR – Tempo de retenção

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Selênio	7
3.2. Significância clínica.....	10
3.3. Selênio na nutrição.....	12
3.4. Metabolismo e distribuição.....	15
3.5. Toxicologia	18
3.6. Avaliação da metodologia para determinação de selênio e análise de especiação	19
3.6.1. Espectrometria de absorção atômica.....	19
3.6.2. Pré-tratamentos	21
3.6.2.1. Procedimentos de digestão para determinação de selênio total por HG AAS... 22	
3.6.2.2. Procedimentos de extração para a análise de especiação de selênio em amostras biológicas.....	24
3.6.3. Métodos cromatográficos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. Instrumentação.....	30

4.2.	Reagentes e soluções	32
4.3.	Controle da contaminação	33
4.4.	Avaliação da metodologia para a quantificação de selênio e análise de especiação	34
4.4.1.	Avaliação do nível de selênio em aves	34
4.4.1.1.	Amostras	34
4.4.1.2.	Procedimentos de digestão de amostras.....	34
4.4.2.	Espectrometria de Absorção atômica.....	35
4.4.2.1.	Forno de grafite.....	35
4.4.2.2.	Geração de hidretos	38
4.4.2.3.	Ensaio de recuperação para avaliação da determinação de Se total por GF AAS e HG AAS.....	38
4.4.3.	Cromatografia iônica	39
4.4.3.1.	Medidas espectrofotométricas dos selenoaminoácidos com o <i>o</i> -ftaldeído.....	40
4.4.3.2.	Estudo da concentração do ácido iodo acético na determinação das espécies de selenoaminoácidos.....	41
4.4.3.3.	Determinação simultânea da SeM e SeC.....	41
4.4.4.	Cromatografia por fase reversa.....	41
4.4.4.1.	Reação de derivação com o FMOC.....	42
4.4.4.2.	Medidas espectrofotométricas dos selenoaminoácidos e FMOC.....	43
4.4.4.3.	Escolha da fase móvel e a vazão do sistema HPLC-UV	43
4.4.4.4.	Estudo do tempo de reação e concentração do derivatizante.....	43
4.4.4.5.	Estudo de estabilidade após a reação de derivação.....	44
4.4.5.	Validação dos métodos cromatográficos	44
4.5.	Caracterização da levedura presente na ração animal – Experimento 1	45
4.5.1.	Determinação de Se total nas amostras de levedura.....	45
4.5.2.	Procedimentos de extração	45
4.5.3.	Determinação das proteínas – teste do Azul Brilhante de Comassie.....	46
4.5.4.	Estudo da separação das proteínas extraídas da levedura em colunas de polietileno e teflon	46
4.5.5.	Hidrólise.....	47

4.5.5.1. Hidrólise ácida	48
4.5.5.2. Hidrólise enzimática	48
4.6. Avaliação do selênio em aves tratadas oralmente com Se inorgânico e orgânico – Experimento 2.....	50
4.7. Análise de soro sanguíneo – Experimento 3.....	51
4.7.1. Desproteínização com ácido tricloro-acético (TCA).....	51
4.8. Selênio na nutrição parenteral.....	53
4.8.1. Animais.....	53
4.8.2. Tratamentos	53
4.8.2.1. Administração aguda de Se (IV) e SeM – Experimento 4.....	53
4.8.2.2. Administração sub-crônica de Se (IV) e SeM – Experimento 4.....	54
4.8.2.3. Avaliação dos parâmetros toxicológicos	56
4.8.2.4. Análise estatística	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. Avaliação da metodologia para a quantificação de selênio e análise de especiação	58
5.1.1. Espectrometria de absorção atômica.....	58
5.1.1.1. Forno de grafite.....	58
5.1.1.2. Geração de hidretos	60
5.1.1.3. Avaliação do teor de Se em aves	61
5.1.1.4. Ensaios de recuperação para avaliação da determinação de Se total por GF AAS e HG AAS.....	66
5.1.1.5. Figuras de mérito da espectrometria de absorção atômica	68
5.1.2. Cromatografia iônica	68
5.1.2.1. Estudo da influência da concentração do ácido iodo-acético (AIA) na determinação da SeC e SeM.....	71
5.1.2.2. Determinação simultânea do SeM e SeC.....	73
5.1.2.3. Figuras de mérito	75
5.1.3. Cromatografia de fase reversa	78
5.2. Caracterização da levedura presente na ração – Experimento 1.....	84

5.2.1. Determinação de Se total	86
5.2.2. Estudo da extração das proteínas da amostra de levedura	86
5.2.3. Estudo da separação das proteínas extraídas da levedura em colunas de polietileno e teflon	88
5.2.4. Hidrólise de proteínas de amostras de levedura e soro	94
5.2.5. Determinação de SeM e SeC na amostra de levedura	97
5.3. Avaliação do selênio em aves tratadas oralmente com Se inorgânico e levedura – Experimento 2	98
5.4. Análise de soro sanguíneo – Experimento 3	100
5.4.1. Desproteinização com TCA	100
5.4.2. Hidrólise	102
5.5. Selênio na nutrição parenteral	102
5.5.1. Avaliação cinética de distribuição e transformação das espécies Se (IV) e SeM no soro – Experimento 4	104
5.5.1.1. Quantificação do selênio total	104
5.5.1.2. Determinação dos selenoaminoácidos no soro após a hidrólise com HCl 6 mol/L	105
5.5.2. Avaliação do estudo da administração sub-crônica das espécies de Se – Experimento 5	107
5.5.2.1. Quantificação de selênio total	107
5.5.2.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos	111
6. CONCLUSÕES	116
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1. INTRODUÇÃO

O selênio, um mineral essencial a muitos processos fisiológicos, pode ser encontrado no solo, em plantas e animais [1-2, 6]. No corpo humano, ele está presente em quase todas as células, sendo mais abundante, contudo, nos rins, fígado, baço, pâncreas e testículos.

O selênio, tanto na sua forma inorgânica, como selenito de sódio, ou na forma orgânica, através de leveduras enriquecidas, tem recebido muita atenção recentemente com relação ao seu papel na prevenção de várias doenças, entre elas o câncer [2]. Além disso, o selênio pode proteger o coração, principalmente por reduzir o risco de formação de coágulos, diminuindo, por sua vez, o risco de ataque cardíaco e de derrame. Quando combinado com vitamina E, na sua forma inorgânica (selenito de sódio) pode ter efeito protetor para o estresse oxidativo e, na sua forma orgânica (ebselen) parece apresentar também alguns benefícios antiinflamatórios [3]. Esses compostos de selênio associados a outros nutrientes podem agir como coadjuvantes no tratamento doenças crônicas, como artrite reumatóide, psoríase, lúpus e eczema [5].

Primeiramente, o efeito do selênio em humanos foi associado a sua toxicidade, especialmente, pela exposição ocupacional em processos industriais que o utiliza, bem como pela exploração de rochas, em áreas mineradoras, e consumo de alimentos contaminados. Vários estudos da sua toxicidade em animais, centrados na possibilidade deste elemento ser carcinogênico, estão relacionados a este tipo de exposição. Porém, os estudos não chegaram a resultados conclusivos. Além disso, os compostos de selênio não atuam como agente carcinogênico em doses baixas ou moderadas. O aumento de evidências experimentais, no entanto, sugeriram que a suplementação com selênio na dieta poderia inibir tumores induzidos quimicamente em várias espécies de animais, como também cânceres provocados por vírus. Dos trinta e nove estudos publicados a partir de 1949, trinta e quatro demonstraram que o selênio foi capaz de diminuir o crescimento de tumores, ao passo que três destes estudos não mostraram nenhum efeito e dois demonstraram que o selênio teria efeito no aumento de tumores. Os mecanismos possíveis para o selênio atuar como medida de proteção contra a ocorrência de tumores seria a diminuição da concentração dos radicais livres e hidroperóxidos nos tecidos via

ação da glutathione peroxidase, sendo este mecanismo dependente de selênio. O primeiro trabalho que relata a função biológica do selênio como componente da glutathione peroxidase foi relatado em 1973. Desde então, várias selenoproteínas funcionais têm sido identificadas. Revisões na literatura da década de 80 mostram que existe uma associação inversa entre a concentração de selênio no solo e a ocorrência de câncer do sistema gastrointestinal, do pulmão e de mama, entre outros. Deste modo, após extensiva discussão, foi estipulado pela WHO (World Health Organization) um protocolo para limites considerados seguros para não produzir toxicidade bem como evitar a sua deficiência. [6].

A deficiência de selênio nas pessoas é pontual e dependente da região onde vivem, uma vez que pessoas dependentes de alimentos provenientes de solos com deficiência de selênio também estão sob risco. Ela pode ocorrer, porém, em pacientes com a função intestinal seriamente comprometida, ou que estão submetidos à nutrição parenteral.

A absorção, metabolismo e utilização final do selênio para funções vitais são dependentes da sua forma química. Em plantas ocorre como selenometionina (SeM), mas espécies inorgânicas podem estar presentes. Animais e humanos são capazes de incorporar SeM em proteínas. Contudo, outros estudos mostram que a maior espécie de Se em alimentos de origem animal é selenocisteína (SeCys) presente na enzima glutathione peroxidase e em outras enzimas dependentes de Se [5-6].

A análise de especiação do Se no organismo e em fluidos biológicos é importante para o entendimento do ciclo biológico e para definir a difusão e a toxicidade deste elemento no ecossistema, bem como sua incorporação às proteínas e sua distribuição e biodisponibilidade no organismo [4].

A primeira parte deste estudo consistiu da investigação do pré-tratamento de amostras para quantificação de selênio total, por espectrometria de absorção atômica (AAS), e a análise de especiação, para determinação de selenometionina e selenocistina, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme demonstrados na Figura 1.

Uma vez estabelecido os métodos fez-se um estudo para avaliar a influência da forma de selênio na sua distribuição em animais que receberam suplementação de selênio, tanto na dieta quanto através da administração endovenosa. Aves, tratadas com ração suplementada, e coelhos,

tratados parenteralmente, foram utilizados como modelos animal. Devido à forma como as aves são tratadas na indústria, optou-se pela administração oral. A suplementação de selênio se deu através do inorgânico, como selenito de sódio, bem como através do suporte orgânico deste elemento, na forma de levedura enriquecida.

Posteriormente, fez-se a investigação do selênio inorgânico, Se (IV), e orgânico, SeM, em outra via de administração que não a oral, através da administração parenteral, utilizando neste caso os coelhos como animais de experimentação. O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa do experimento consistiu da administração aguda, na qual o objetivo foi avaliar a conversão do selênio inorgânico em orgânico, após a administração de solução de selenito de sódio, bem como a biodisponibilidade após a administração da selenometionina.

O estudo sub-crônico foi realizado na segunda parte do estudo da administração das duas diferentes formas de selênio em coelhos, para avaliar a distribuição nos tecidos e, também, comparar a toxicidade das espécies de selênio inorgânico e orgânico após a administração de selenito de sódio e da selenometionina. Uma vez que o Se é administrado parenteralmente como elemento traço em pacientes através da forma inorgânica selenito de sódio, a proposta do presente estudo foi verificar se outra espécie de Se, como Se orgânico na forma de selenometionina, não teria uma toxicidade menor do que a forma que vem sendo administrada atualmente

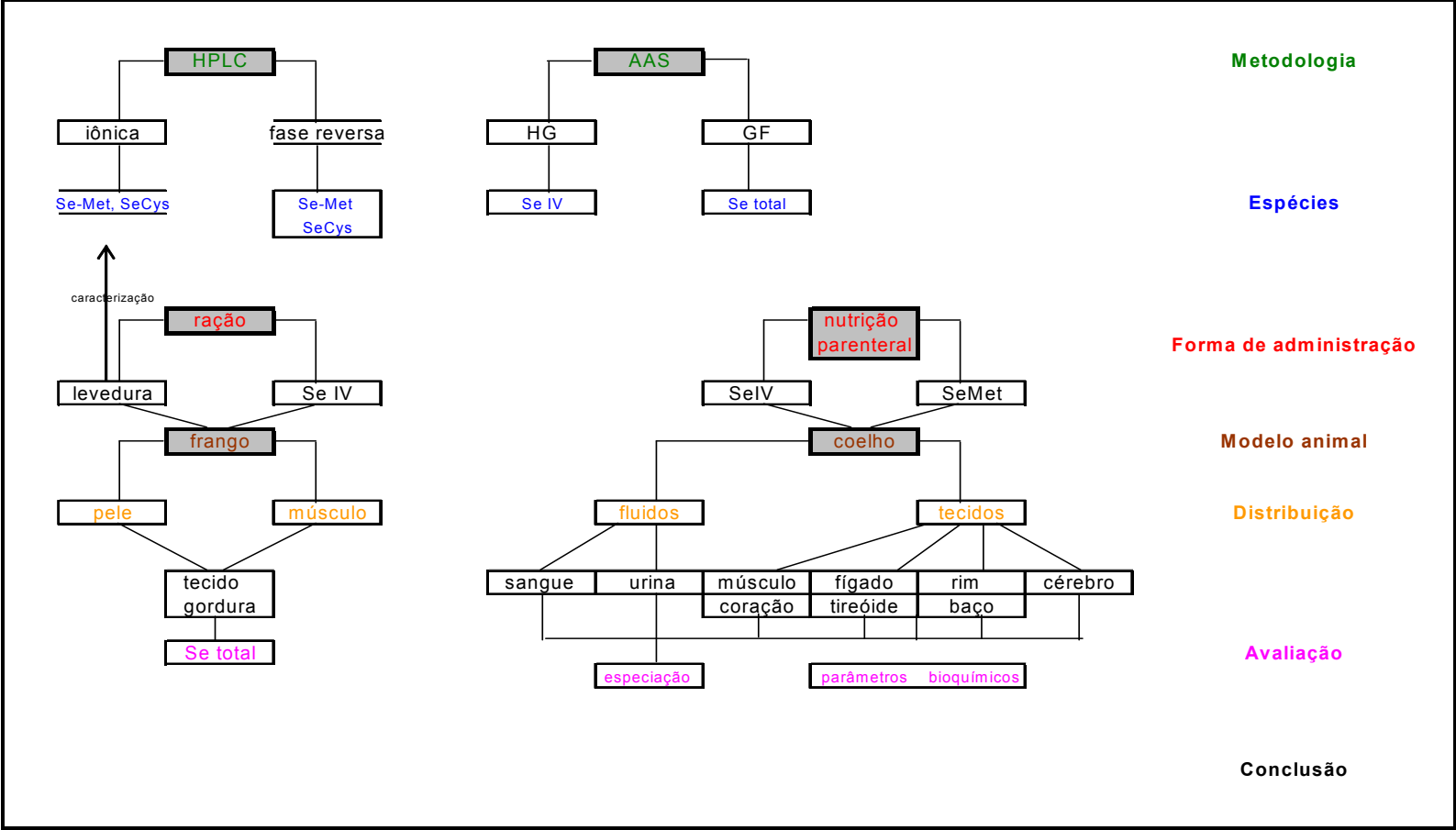


Figura 1: Estrutura da tese

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a distribuição do selênio em animais experimentais em função da espécie ingerida e da via de administração.

Os objetivos específicos foram:

- Adequação da metodologia para determinação de selênio total e selenoaminoácidos em amostras biológicas entre elas levedura, tecidos como músculo, pele, fígado, rim, cérebro, coração, baço, tireóide, gordura e os fluídos biológicos soro sanguíneo e urina.
- Caracterização da levedura utilizada como fonte de Se orgânico na suplementação de selênio em aves, através da quantificação do Se inorgânico e das espécies SeM e SeC.
- Avaliação da distribuição da concentração de Se em músculo e pele em aves através da suplementação oral com Se inorgânico e orgânico (levedura).
- Avaliação da distribuição de Se no sangue, urina e em diferentes tecidos após administração parenteral de Se inorgânico e orgânico em coelhos em estudo sub-crônico (6 semanas).
- Avaliação da distribuição e concentração de Se total e selenoaminoácidos no sangue após administração parenteral de Se inorgânico e orgânico em coelhos em estudo agudo (2 horas).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.Selênio

O selênio (Se) é considerado um elemento-traço importante em muitos processos bioquímicos e fisiológicos. Por ser um nutriente essencial é de fundamental importância na saúde humana [5-10].

O Se pertence ao grupo 16 da tabela periódica localizado entre o enxofre e o telúrio. Possui propriedades físicas e químicas as quais são consideradas intermediárias inorgânicas entre metal e não-metal, com semelhança mais pronunciada com o enxofre. Ele pode existir em quatro estados de valência que são II, 0, IV e VI. A maioria da química de coordenação orgânica envolve o estado de oxidação -II, sendo que este elemento frequentemente substitui o enxofre em espécies orgânicas de aminoácidos tais como selenometionina e selenocisteína [6-7]. Os compostos nos quais têm o estado de oxidação IV e VI incluem SeF_4 e SeF_6 , dióxidos SeO_2 , trióxidos SeO_3 e oxi ácidos tais como OSe(OH)_2 e ácido selênico H_2SeO_4 . Muitos oxi sais como selenitos e selenatos são solúveis em água [6].

Este elemento vem também tendo crescente reconhecimento de sua potencialidade para aplicações industriais. É amplamente utilizado em processos e produtos industriais tais como indústria do vidro, onde perfaz 27% do seu uso. Usos eletrônicos de selênio de alta pureza são relatados pelas suas características semicondutoras e fotoelétricas. Aproximadamente 14% do seu uso estão na produção de pigmentos inorgânicos [6].

Sua utilização na medicina foi relatada primeiramente como medicamento para tratar caspa, no qual os compostos eram usualmente utilizados na forma de mono e disulfetos de selênio. Sabe-se também do uso da espécie $^{75}\text{Selenometionina}$ como marcador radioativo para diagnóstico de vários tumores malignos [6].

Recentemente, o Se tem sido amplamente utilizado para suprir as necessidades nutricionais como elemento-traço antioxidante tanto na nutrição enteral como na nutrição parenteral [8-9].

Sabe-se que nos tecidos o selênio está presente em duas formas: como selenocisteína (SeCys) e selenometionina (SeM). A SeM não pode ser sintetizada no organismo e deve ser fornecida pela dieta. Esta espécie pode substituir a metionina em uma variedade de proteínas [7]. A SeM é considerada como um forma de depósito de selênio; quando o suporte de selênio da dieta é interrompido, este compartimento é movimentado e repõe o selênio no organismo.

A selenocisteína é um composto análogo da cisteína contendo Se, considerada o 21º aminoácido codificado no DNA [5,7, 10]. O selênio constituinte de proteínas, denominadas selenoproteínas, algumas das quais tem funções enzimáticas importantes, está na forma de selenocisteína, sendo a forma biológica ativa de selênio. São exemplos de selenoproteínas que contém SeCys a glutathiona peroxidase, iodotironina deiodinase, selenoproteína P, selenoproteína W e tioredoxina redutase.

Várias selenoproteínas são enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes e regulações redox, tais como a glutathiona peroxidase, tioredoxina redutase e a metionina sulfóxido redutase [11]. O selênio nestas enzimas pode, então, atuar como centro redox, por exemplo quando a selenoenzima, tioredoxina redutase, reduz nucleotídeos na síntese do DNA e ajuda a controlar o estado redox intracelular, ou ainda quando uma iodotironina deiodinase produz o hormônio da tireóide ativo a partir do precursor inativo. O melhor exemplo da função redox, porém, é a redução do peróxido de hidrogênio à produtos inócuos como água e álcoois, pela família das enzimas peroxidases selênio-dependentes tais como glutathiona peroxidase [5]. Estas funções ajudam a manter a integridade da membrana, reduzem a probabilidade de propagação de danos oxidativos de biomoléculas, como lipídeos, lipoproteínas e DNA, com o associado aumento de risco de câncer e arterosclerose [7].

O maior papel na defesa antioxidante é da enzima glutathiona peroxidase. Ela reduz o peróxido de hidrogênio, lipídios e fosfolipídios hidroperóxidos impedindo que ocorra propagação dos radicais livres e espécies oxigênio-ativas. A baixa atividade da GSH-Px em pacientes criticamente doentes está associada com os baixos níveis de Se, onde há um aumento da glutathiona oxidada e dos radicais livres podendo contribuir para a falência dos múltiplos órgãos nestes pacientes [11].

A tioredoxina é uma proteína pequena (12 kDa), com dois resíduos de cisteína, que é regulada e contribui para a tolerância de endotoxinas. A tioredoxina reduz a glutathiona bem como outros peróxidos lipídicos, sendo sua forma oxidada regenerada por diferentes subtipos de

tiorredoxinas redutases selênio-dependentes. Estudos em ratos demonstraram que a atividade desta enzima aumenta com a atividade da GSH-Px após a suplementação com selênio, indicando uma hierarquia na síntese de selenoenzimas [10].

Comparada com outras selenoproteínas, a selenoproteína P (SePP) é incomum uma vez que possui 10 resíduos de SeCys por molécula, contribuindo com até 70% do Se no plasma. A SePP no plasma humano é fortemente dependente da disponibilidade do selênio presente no fígado, local onde ela é quase totalmente sintetizada [7,11-12]. Logo após ter sido identificada, a SePP foi reconhecida como proteína responsável por transportar selênio. Também possui propriedades de defesa oxidativa, uma vez que estudos mostram a defesa do fígado contra necrose e peroxidação lipídica pelo aumento das concentrações desta enzima após a administração de Se em ratos deficientes em selênio [7, 12].

As enzimas iodotironina deiodinase tipos I, II e III são selenoproteínas. Estas enzimas removem iodo das moléculas hormonais na tireóide por meio da ativação da tiroxina (T_4) e inativação da triiodotironina (T_3). A iodotironina tipo I, presente no fígado, rim, e tireóide abastece T_3 ao tecido periférico a partir do T_4 secretado pela glândula tireóide. A atividade da enzima tipo I decai com deficiência de selênio. A iodotironina deiodinase tipo II é encontrada no cérebro, glândula pituitária e placenta, regula o T_3 intracelular nestes tecidos e controla a secreção do hormônio que estimula a tireóide. O tipo III inativa T_3 e degrada outros hormônios da tireóide, porém pouco é conhecido sobre sua relação com a deficiência de selênio. A deficiência de Se causa uma diminuição de 15 a 20% dos níveis de T_3 e T_4 [13]. Estudos com animais têm demonstrado que as deficiências de iodo e selênio levam ao hipotireoidismo mais severo do que apenas a deficiência de iodo. Além disso, o cretinismo, doença crônica devida à ausência de secreção tireóidea, em recém-nascidos são devido à deficiência destes dois elementos nas respectivas mães [7].

A selenoproteína W também contém SeCys e foi assim denominada pela possível associação com uma patologia de degeneração muscular (white muscle disease). Esta disfunção é uma desordem metabólica que ocorre em animais domésticos caracterizada pela calcificação do músculo esquelético que pode ser aliviada pela suplementação combinada de selênio e vitamina E [5, 13]. Os níveis desta proteína são afetados pelo status de Se no organismo e ela pode ter um papel fundamental no metabolismo muscular.

3.2. Significância clínica

O reconhecimento da importância do papel das selenoproteínas no metabolismo ajuda a explicar os efeitos adversos da deficiência de selênio na saúde humana e animal. Várias doenças crônicas têm sido relacionadas ao baixo status de Se. A manutenção da concentração ótima de selênio no organismo, bem como as atividades da selenoproteínas, torna-se evidente para prevenção destas doenças.

Baixas concentrações de Se no sangue tem sido associadas à incidência de infarto do miocárdio e aumento da mortalidade de doenças do coração [13-14]. Além disso, a deficiência de selênio pode resultar em acúmulo de peróxidos de ácidos graxos no coração e levar a formação de substâncias que aumentam a formação dos coágulos de sangue. Adequados níveis de Se e da atividade da enzima glutathione peroxidase podem ajudar a proteger as células endoteliais dos vasos sanguíneos contra danos causados por lipoproteínas de baixo peso molecular [13].

A ingestão de baixas quantidades de selênio tem sido relacionada a um aumento do risco de câncer. Experimentos com modelos animais e estudos com humanos tem demonstrado um efeito protetor dado por vários compostos de selênio, em níveis que excedem a nutrição, na inibição do crescimento de tumores [2, 5, 7, 13].

Muitos estudos têm enfatizado a relação entre as doenças renais e o baixo status de Se, tanto para os níveis de Se no plasma, como para a atividade da glutathione peroxidases em pacientes com insuficiência renal crônica e que sofrem hemodiálise [9,15-16]. Embora não se pense a deficiência do selênio como causa da disfunção renal, a diminuição da sua concentração pode agravar as condições dos pacientes. A suplementação com selênio tem provado ser efetiva no melhoramento do quadro de pacientes renais, melhorando a função imune e diminuindo o estresse oxidativo.

Pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) têm relatadas baixas concentrações de selênio. Vários estudos também sugerem que este elemento pode ter um efeito benéfico no tratamento destes pacientes, uma vez que provavelmente permitam reforçar o sistema antioxidante endógeno. As fracas defesas antioxidantes parecem ter um importante papel no aumento do estresse oxidativo, observado dentre as pessoas soro-

positivas. A associação entre mortalidade relatada em pacientes com HIV-1 e a deficiência nutricional de vitaminas, tais como A e B12, e minerais como zinco e selênio mostrou que apenas a deficiência do selênio teve correlação com a diminuição de sobrevivência nestes indivíduos [17]. Estes estudos indicam que a deficiência de selênio é forte indicadora de aumento de mortalidade [8], independentemente do tratamento anti-retroviral.

Outros estudos de relevância clínica do selênio têm sido relatados, como a sua importância na reprodução. Por um longo período, o selênio foi utilizado com sucesso na reprodução animal [5]. Estudos realizados com homens inférteis suplementados com Se e vitamina E mostraram melhora na morfologia do esperma. Indivíduos tratados com selenito de sódio mostram aumento dos níveis de Se no fluido seminal, e, aqueles que receberam Se na forma de levedura enriquecida, tiveram um aumento também na atividade da glutathione peroxidase [5, 13].

Nas atividades cerebrais e no humor há indicação que o selênio também é importante, uma vez que o movimento de neuro-transmissores é selênio-dependente. A concentração de Se no cérebro de pacientes com Alzheimer foi de apenas 60% da concentração encontrada no grupo controle. Baixas concentrações de Se no plasma de pessoas com idade avançada mostrou relação significativa com senilidade [5].

Pacientes com processos inflamatórios, como fibrose cística, e injúrias provocada por queimaduras também tem substancial perda de selênio. A suplementação com minerais como zinco, cobre e selenito de sódio resultam em significativa redução da infecção [10].

Compostos orgânicos de selênio tais como ebselen e disseleneto de difenila podem também estar relacionados com propriedades antiinflamatórias em estudos relacionados com animais [18].

O selênio pode ter ainda um importante papel antagonista na toxicidade de vários metais, tais como cádmio, mercúrio, arsênio, prata, chumbo e cobre, pela formação de complexos inertes com estes [5-6].

3.3. Selênio na nutrição

A primeira função biológica conhecida do selênio foi como um componente da glutathiona peroxidase, relatada em 1973 [19]. Desde então, várias outras funções biológicas tem sido identificadas com uma variedade de funções, onde seu papel antioxidante foi o primeiro foco de atenção de diversos estudos. Essas pesquisas levam às aplicações tais como suplementação de selênio de fórmulas nutricionais infantis, enterais e soluções de nutrição parenteral total [13, 15, 20].

As maiores fontes de dieta de selênio são as plantas na maioria dos países ao redor do mundo. A quantidade de Se no solo é que vai determinar a concentração de Se naquele alimento, ou seja, cereais e grãos dependem do conteúdo de Se presente no solo nos quais são produzidos. Frutas, vegetais e água não possuem quantidades substanciais deste elemento, com exceção da castanha brasileira, que possui quantidades consideráveis na sua composição [6-7].

Uma vez que o selênio está associado às proteínas nos tecidos animais, a formação destas ligações é dependente da fonte deste mineral na dieta. Alguns produtos de origem animal como carne, frutos do mar, ovos contém quantidades elevadas deste elemento, principalmente aqueles que se alimentam de plantas ricas em Se [21].

A ingestão nutricional varia mundialmente e chega até níveis de 750 µg/dia de selênio orgânico sem manifestações de desordens associadas com o selênio. As principais fontes nutricionais de selênio são a selenometionina, de origem vegetal, e a selenocisteína obtida dos produtos de origem animal [6-7]. Os compostos inorgânicos normalmente são fornecidos como suplementos e em dietas experimentais.

Formulações enterais são atualmente suplementadas com selênio, como pode ser observado na Tabela 1. Estes produtos são utilizados para suprir as necessidades nutricionais de pacientes portadores de diversas doenças complexas como câncer, AIDS, doenças pulmonares e intestinais crônicas, diabéticos, bem como para pacientes cirúrgicos pré e pós-operatório, os quais são capazes de se manter parcialmente por via oral [13].

Tabela 1 – Formulações enterais contendo selênio [13]:

Produto	Se (µg/L)	Espécie de Se
Novasource ® ^a	100	Selenito de sódio
Novasource Renal ® ^a	100	Extrato de levedura
Isosource ® ^a	110	Sem identificação
Kindercal ® ^b	32	Sem identificação
Peptamen ® ^c	40	Selenato de sódio
Replete ® ^c	100	Sem identificação
Diabetisource ® ^a	67	Selenito de sódio
Advera ® ^d	60	Sem identificação

^a Novartis Nutrition Corp.; ^b Mead Johnson Nutritionals; ^c Nestlé; ^d Abbott.

Quando os indivíduos são completamente incapazes de comer normalmente ou ingerir alimentos, os quais não podem se manter do ponto de vista nutricional, torna-se necessária a nutrição parenteral total (TPN). Para produzir as necessidades básicas estas formulações além dos nutrientes básicos, aminoácidos e lipídeos, contêm elementos-traço essenciais. Estes elementos-traço normalmente incluem cromo (15 µg), cobre (1,5 mg), iodeto (120 µg), manganês (2 mg), zinco (5 mg) e selênio (100 µg) por um período de 24 horas [15]. Grande parte destes elementos tem um papel fundamental nos processos antioxidantes do organismo, protegendo tecidos contra os nocivos radicais livres.

Formulações de nutrição parenteral contendo selênio também já vêm sendo publicadas, onde selenito, selenato e selenometionina são adicionados a TPN prevenção e tratamento das deficiências de Se. Embora exista uma incerteza sobre a melhor espécie de Se a ser utilizada nestas soluções, selenato e selenito de sódio parecem ser as formas de escolha [9, 13, 22].

Quantidades diárias recomendadas de Se são 20 a 60 µg por dia [6]. Outros autores sugerem que para a população saudável a ingestão recomendada está entre 80 e 100 µg, associada com a quantidade ótima para a atividade da glutathiona peroxidase nas plaquetas, podendo variar para as demais enzimas selênio-dependentes [23]. Para recém nascidos e crianças menores de 5 anos, 2 a 3 µg de selênio por quilograma por dia tem sido recomendada, até um limite de 30 µg/dia [13].

Um estudo com pacientes que recebem TPN suplementado com selênio, na forma de selenito de sódio, foi realizado, e os resultados comparados com o grupo de TPN não suplementado. Os níveis de Se e atividade da glutathione (GSH-Px) no soro diminuíram com o tempo de tratamento da nutrição parenteral no grupo que não recebeu suplemento de Se. A suplementação com Se, 100 µg/dia, resultou em um acentuado aumento da excreção urinária do Se, porém não aumentou os níveis de Se do soro e das células vermelhas, como também não produziu efeitos na atividade da GSH-Px [9].

A concentração de Se no sangue total, plasma e nas células vermelhas é significativamente menor em pacientes renais crônicos que são submetidos à hemodiálise semanal comparados a pessoas saudáveis [20]. De maneira similar à concentração de Se, a atividade da GSH-Px nas células vermelhas também foi reduzida nestes pacientes. O estudo demonstrou, adicionalmente, que a suplementação oral de Se, na forma de levedura, juntamente com a eritropoetina, após 3 meses de tratamento, provocou um aumento da concentração do Se neste grupo em relação ao grupo que recebeu apenas a levedura enriquecida com Se.

Terada [24] investigou a relação entre geração das espécies oxigênio-ativas e os consequentes danos às células causados por compostos de selênio e de enxofre. Selenito, selenato e selenometionina foram adicionados à um meio celular contendo cisteína ou glutathione reduzida e, após incubação à 37°C por 3 horas, os danos celulares foram avaliados. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que 10 µmol/L de selenito, mesmo na presença de glutathione reduzida e cisteína, gerou espécies oxigênio-ativas. As espécies selenato e SeM podem ser mais recomendáveis ao uso parenteral por não terem causado os danos similares mesmo na presença de grupos tióis, podendo ser então administrado juntamente com soluções parenterais que contenham cisteína como aminoácido.

De Bem [25], em 2006, avaliou a toxicidade de selênio através da exposição oral do composto orgânico diseleneto de difenila em coelhos, por um período 8 meses, nas concentrações de 0,3, 3,0 e 30 mg/kg. Os parâmetros avaliados foram a δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), catalase, glutathione peroxidase, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina, índice de peroxidação lipídica (TBARS), ácido ascórbico e também o nível de selênio no sangue e no tecido adiposo. Os resultados demonstraram que 30 mg/kg deste composto causaram aumento significativo da atividade da δ -ALA-D no soro após 6 a 8 meses do tratamento. A ingestão de 3,0 mg/kg aumentou a atividade

da catalase após 8 meses. Porém, outros parâmetros indicadores de toxicidade não foram alterados. O estudo também relata a lipofilicidade do composto uma vez que houve aumento significativo de selênio no tecido adiposo com a ingestão de 30 mg/kg.

3.4. Metabolismo e distribuição

Mais de 50% dos compostos de selênio são absorvidos no trato gastrointestinal pelos mesmos mecanismos de transporte dos aminoácidos correspondentes de enxofre [11]. Porém, a absorção aparentemente não é regular, depende da sua disponibilidade e forma química ingerida [6]. A homeostase do selênio é completada normalmente pela sua excreção via urina [7].

Selenito é absorvido por difusão passiva no trato gastrointestinal muito eficazmente (40-95%). Selenato, a forma ácida, é rapidamente absorvido via um sistema co-transportador de selenato/sódio.

O selênio é encontrado em todos os tecidos, em concentrações variáveis, de acordo com a quantidade e a espécie ingerida [5, 6]. A absorção da SeM foi mais rápida (96%) comparada ao selenito (80%) em estudos com mulheres na Nova Zelândia [6, 26]. A absorção gastrointestinal dos compostos orgânicos é mais completa que a absorção da forma inorgânica como selenito. Após a absorção, ocorre distribuição pelo sangue até órgão e tecidos, sendo o fígado e o rim os órgãos nos quais são encontradas as maiores concentrações em várias espécies animais, suplementados com adequada dieta ou com altas doses de selênio [27, 28].

Os níveis de selênio no sangue têm sido utilizados como indicadores do Se ingerido na dieta bem como o seu status em animais e humanos. O Se presente nas células vermelhas, os eritrócitos, é um indicativo da absorção a longo prazo, acumulado há mais de 4 meses [6, 13]. As concentrações no plasma ou soro dizem respeito ao Se ingerido recentemente ou a curto prazo, podendo indicar o status agudo.

Vários estudos de suplementação oral com selênio têm sido relatados em animais para verificar a disponibilidade no tecido e nos produtos originários destes animais [29]. O Se contido em tecidos de suínos alimentados com selênio inorgânico, como selenito de sódio,

promoveu aumento de 180% e 110% da concentração de Se no fígado e no rim destes animais em relação ao controle [30].

Dentro de certos limites fisiológicos quantidades traço de selênio são retidas no organismo, enquanto que excessivas quantidades são excretadas [31]. A excreção ocorre principalmente na urina, mas uma pequena parte da quantidade absorvida é excretada nas fezes.

Estudos mostram que os compostos de Se são metabolizados em duas etapas: redução e posterior metilação ou incorporação direta as proteínas [6]. O estado de oxidação VI (selenato) primeiramente é reduzido a IV (selenito). Selenato pode sofrer ativação enzimática com ATP formando adenosina-5-selenofosfato, a qual sofre redução não-enzimática à selenito por meio da glutathione. A via da redução-metilação é responsável pela produção de dimetil seleneto para eliminação, o qual tem sido considerado como a forma não-tóxica de selênio, o qual tem baixa atividade biológica tanto nutricional como toxicológica [6].

A Figura 2 mostra as várias interações metabólicas que podem ocorrer entre as espécies inorgânicas e orgânicas de selênio, enquanto que a relação entre o selênio ingerido e o acúmulo no tecido é mostrada na Figura 3.

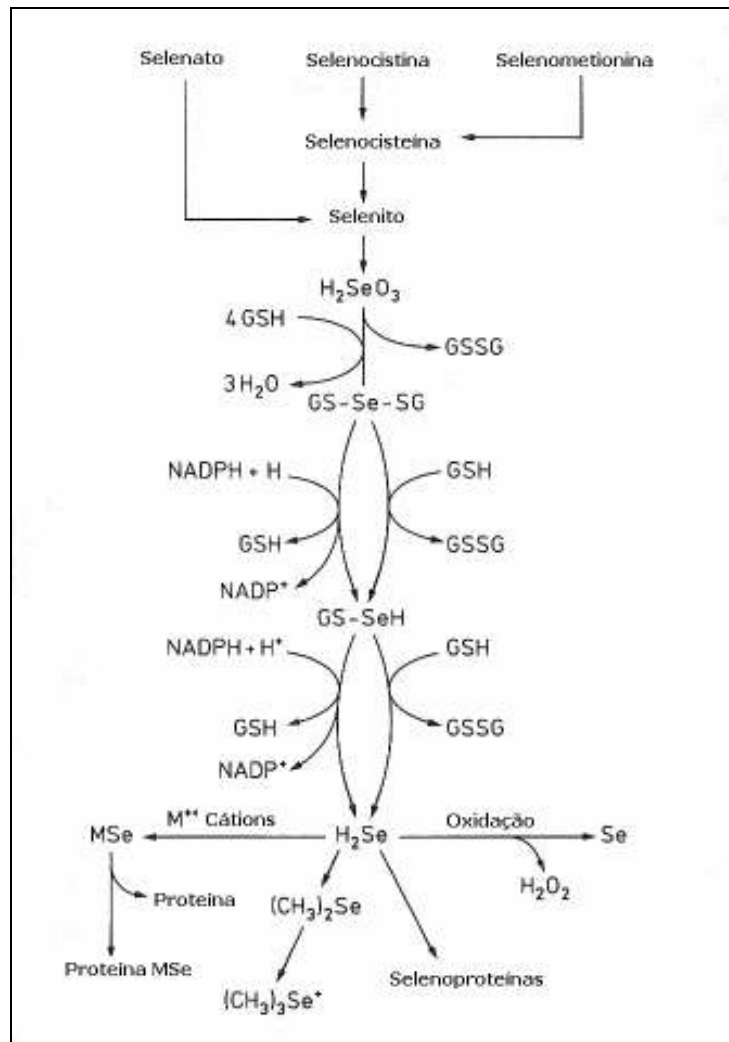


Figura 2 – Interações metabólicas entre as formas inorgânicas e orgânicas de selênio [6].

A síntese de selenoproteínas envolve a conversão do selênio, obtido na dieta e acumulado nos tecidos, a seleneto ou a um composto similar e após, a síntese de selenofosfato, o qual serve como substrato para a conversão de seril-tRNA a selenocisteril-tRNA contido no anticódon UGA. Este é utilizado para incorporar selenocisteína para a formação de polipetideos até mRNA [5].

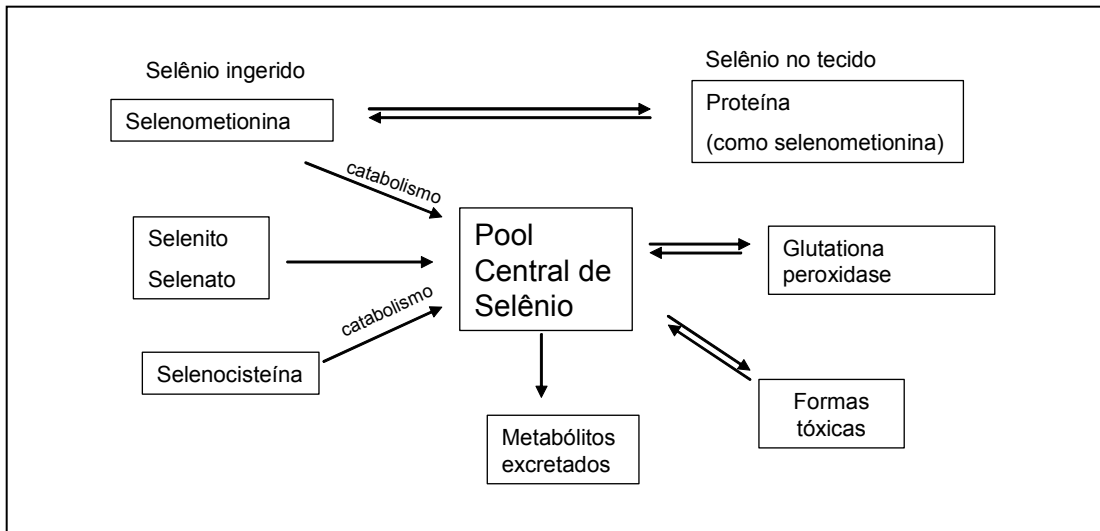


Figura 3 – Distribuição do selênio após a ingestão [6]

Estudos recentes de Suzuki e colaboradores mostraram que os compostos de Se provenientes da dieta são transformados em selenetos, compostos intermediários que serão utilizados para síntese de selenoproteínas ou excretados como seleno-açúcar [32]. Os autores também demonstraram que a SeCys é incorporada à selenoproteína P de maneira similar a SeM, mas a incorporação foi menor que selenito. Além disso, os autores concluíram que SeCys e SeM chegam aos órgãos e tecidos sem sofrerem reações, ou seja, na sua forma intacta, ao contrário da forma inorgânica e que há formação de seleno-açúcar A e B como metabólito a partir da SeCys, SeM e selenito.

3.5. Toxicologia

A toxicidade de selênio em humanos é baseada tanto em observações individuais como em relatos epidemiológicos. Geralmente não são observados efeitos prejudiciais com a ingestão de 5 µg/kg (63 nmol/L) por dia. A suplementação de selênio pode atingir limite máximo entre 750 e 1000 µg/dia por um período curto de tempo. A ingestão oral, através da alimentação, de 5 a 15 mg de selênio, como selenato, por kg de peso corpóreo pode ser considerada intoxicação

crônica. Doses consideradas letais estão na faixa de 1,5 a 6,0 mg/kg de peso corpóreo por dia [6].

Sintomas da intoxicação crônica por selênio incluem hálito com odor de alho, erupções na pele, dermatite, artrite, distúrbios gastrintestinais, queda de cabelo, anomalias do sistema nervoso [7].

Selenoses endêmicas foram descritas na China em 1983, com sintomas não específicos incluindo fragilidade de unhas e cabelo e erupções na pele. Odores de alho ocorrem quando dimetilseleneto é exalado. Os níveis tóxicos no plasma foram encontrados como sendo 1054 µg/L, com uma dose diária de Se estimada em 910 µg. Os dados epidemiológicos sugerem que 750 µg de selênio na forma orgânica é o limite seguro máximo para exposição diária [6]. Contudo, não são considerados os diferentes compostos orgânicos. A ingestão diária de 1600 e 3200 µg de selênio, na forma de levedura enriquecida, por um período de 12 meses, resultou na concentração plasmática de Se de 492 e 640 µg/L, respectivamente. Alterações brandas foram observadas apenas no grupo que recebeu a dosagem maior [33]. A Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization) estipula que a concentração máxima de Se na água para consumo deverá ser 0,01 mg/L [6].

3.6. Avaliação da metodologia para determinação de selênio e análise de especiação

O selênio é encontrado frequentemente em amostras ambientais e biológicas em concentrações muito baixas. Em vista disso, técnicas analíticas altamente sensíveis bem como cuidados especiais na manipulação da amostra como coleta, estocagem e preparo são necessários.

3.6.1. Espectrometria de absorção atômica

Os métodos geralmente empregados para determinação de selênio em matrizes biológicas e ambientais inicialmente envolvem a destruição dos constituintes orgânicos com simultânea oxidação dos compostos ao estado tetravalente ou hexavalente e sua subsequente determinação por uma variedade de técnicas tais como espectrometria de absorção atômica, fluorimetria, espectrometria com plasma indutivamente acoplado e polarografia, entre outras. Dentre estas técnicas, a espectrometria de absorção atômica tem sido extensivamente utilizada para determinação de selênio por que combina excelente sensibilidade com alta especificidade e rapidez de análise.

Uma vez que o selênio pode ser determinado espectrometricamente tanto por forno de grafite (GF AAS) como por geração de hidretos (HG AAS), a escolha entre estas duas técnicas depende do volume de amostra disponível, composição da matriz bem como a espécie presente na amostra. Enquanto a resposta da HG AAS é fortemente dependente da espécie de selênio, GF AAS é adequada para medidas tanto dos compostos inorgânicos como também dos orgânicos [34], desde que condições tais como o uso de modificadores químicos e condições de temperatura da plataforma do forno sejam bem estabelecidas. Os ácidos normalmente utilizados na decomposição da amostra devem ser levados em consideração: ácido nítrico, perclórico e sulfúrico podem interferir na determinação de Se tanto por HG AAS [35, 36, 37] como GF AAS [38-39]. Vários estudos demonstram a existência de interferências em ambas as técnicas [40, 41, 42, 43], porém poucos estudos relatam a comparação por forno de grafite e geração de hidretos com relação à determinação de Se por espectrometria de absorção atômica. Welz e Schubert-Jacobs [44] compararam características de massa, volume de amostra e também a possibilidade de realização da determinação de selênio por sistema de injeção em fluxo e batelada.

Lambert e Turoczy [45] realizaram um estudo comparativo de métodos de digestão para determinação de selênio em amostra de peixe. As técnicas de digestão incluíram digestão úmida e seca, combustão com oxigênio, irradiação ultravioleta e alta pressão. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que apenas a combinação de digestão seca/úmida seguida pela decomposição à alta pressão e determinação por HG AAS foi satisfatória. O estudo também mostrou que a decomposição incompleta da matéria orgânica e perdas do selênio por volatilização foram as causas de insucesso dos demais procedimentos.

A técnica de HG AAS é livre de interferência espectral se apropriados equipamentos são utilizados [46]. Sabe-se, todavia, que um número de metais de transição, principalmente aqueles

dos grupos VIII e XI, podem causar significativa diminuição do sinal, sendo o selênio um dos elementos que mais sofre interferência [47]. Contudo, estas interferências podem ser minimizadas pelo aumento da acidez da amostra ou pela adição de agentes mascarantes, tais como 1, 10 fenantrolina, telúrio, co-precipitação de lantânio ou hidróxido férrico, tiocianato (SCN) e 1,1,3,3 tetrametil-2-tiouréia (TMTU) antes da reação de geração do hidreto [48-49].

Uma das vantagens da técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) é a ausência da necessidade do processamento de uma variedade de amostras. Amostras líquidas e sólidas, freqüentemente, podem ser analisadas sem etapas de pré-tratamento, com o uso de modificadores para minimizar possíveis interferências da matriz [28].

As técnicas de modificação química têm geralmente duas finalidades: i) diminuir a volatilidade do analito para prevenir a perda por volatilização na etapa de pirólise e ii) aumentar a volatilidade da matriz para remover sua remoção antes da atomização [50]. Vários estudos têm sido realizados na investigação de modificadores químicos para determinação de Se por GF AAS [28]. O níquel tem sido muito utilizado como modificador para diminuir a volatilidade do Se e modificação da matriz [43] em diferentes matrizes, se mostrando adequado para evitar as perdas de selênio até temperatura de 1200° C. O efeito do níquel é, provavelmente, a formação de selenetos de níquel relativamente não voláteis dentro do forno. Fernandez [43] obteve bons resultados utilizando níquel como modificador para a determinação de Se por GF AAS e correção de background com efeito Zeeman.

O efeito de estabilização térmica do selênio parece não ser decorrente unicamente do níquel. Misturas de sais de níquel, cobre e paládio, na forma de nitratos, com magnésio foram investigadas para determinação de Se em amostras água e soro sanguíneo utilizando deutério como correção de background [51]. Os autores concluíram que a mistura de cobre e paládio com magnésio permitiu a determinação de Se diretamente nestas amostras, utilizando curvas de calibração com padrões aquosos. Porém o uso dos modificadores de níquel, bem como a mistura deste com magnésio, por sua vez, não foi capaz de estabilizar o selênio da mesma maneira nas diferentes matrizes, sendo necessário utilizarem à técnica de adição do padrão.

3.6.2. Pré-tratamentos

O conjunto dos procedimentos necessários para converter quimicamente uma amostra em uma forma que permita efetuar a determinação do(s) analito(s) e realizar sua quantificação o quanto mais precisa e exata é o termo que indica pré-tratamento de amostra [52].

O objetivo da etapa de pré-tratamento das amostras é i) dissolver a amostra; e ii) separar o analito dos componentes da matriz [53]. A exigência da eliminação de interferentes impõe-se com muita frequência, dependendo de muitos fatores, mas particularmente, do tipo de técnica de detecção [53]. A preparação de amostras deve contemplar a obtenção do melhor resultado, no menor tempo, com mínima contaminação, baixo consumo de reagentes e geração de poucos resíduos e efluentes. Algumas técnicas analíticas permitem que seja possível analisar a amostra sem a etapa de pré-tratamento tais como raios X, métodos nucleares, termo-análise e espectrométricos com fontes de arco e centelha e ablação com laser. As demais técnicas disponíveis para análise como métodos clássicos, métodos espectrométricos, eletroanalíticos e cromatográficos, requerem, contudo, de solubilização completa da amostra ou separação dos analitos de interesse da matriz e, em alguns casos, também pré-concentração [54].

3.6.2.1. Procedimentos de digestão para determinação de selênio total por HG AAS

Na técnica de HG AAS os elementos que formam hidretos devem ser reduzidos ao seu menor estado de oxidação antes da reação com NaBH_4 . As etapas de pré-redução utilizadas para redução de Se (VI) para Se (IV), após os procedimentos de decomposição da amostra, incluem o uso de HCl [34, 55], irradiação ultravioleta [37], e o uso de sais de brometo [57-58]. A velocidade de geração do hidreto é muito rápida, porém a redução de Se (VI) para Se (IV) é lenta.

A determinação de selênio em amostras biológicas tem sido realizada utilizando a técnica de geração de hidretos. Esta técnica requer a decomposição total da amostra a qual pode ser realizada por via úmida em sistema aberto. Contudo, completa mineralização e oxidação da amostra devem ser realizadas, uma vez que os efeitos de volatilização podem acarretar em perda do analito. A mistura de ácidos $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ tem sido utilizada por causar oxidação da amostra, e reter o Se em solução evitando perda por volatilização [56].

Estudos realizados por Brown [48] mostraram que o procedimento de oxidação de amostras sólidas empregando ácido nítrico causa a formação de óxidos de nitrogênio no procedimento de digestão. Estes óxidos inibem evolução dos hidretos de arsênio (AsH_3) e selênio (SeH_2) e podem resultar em efeito memória para análises subseqüentes. Estes interferentes podem ser minimizados pela adição de ácido sulfâmico, para remover os óxidos de nitrogênio. Os autores também relatam o uso de BH_3CN^- como agente redutor efetivo para reação de formação do hidreto a partir de As (III) e (V) e Se (IV) na presença de metais de transição como cobre e níquel, para eliminar ou minimizar a interferência causada por estes metais.

A determinação de Se (VI) e Se (IV) em amostras de água do mar foi realizada utilizando como etapa de pré-tratamento para redução de Se (VI) a acidificação da amostra e o tratamento com NaBr 4 % (m/v) e aquecimento à 70°C por 60 minutos [57]. A determinação do selênio foi feita por espectrometria de fluorescência com geração de hidretos e fluxo contínuo.

A investigação de condições suaves para redução de Se (VI) foi realizada pela mistura de HCl 0,48 mol/L e KBr 1,4 mol/L e os resultados comparados com a etapa de pré-redução utilizando HCl 5mol/L. A pré-redução com brometo possibilitou uma alternativa, onde concentrações mínimas de tetraborato de sódio e HCl para geração do hidreto foram obtidas [58].

O estudo de especiação de selênio com amostras biológicas foi realizado por cromatografia iônica e detecção por HG AAS em um sistema *online* utilizando microondas para conversão das espécies de selênio para Se (IV). A pré-redução de selenato a selenito, antes da reação de formação do hidreto, foi realizada com a mistura de ácido bromídrico e brometo de potássio. Resultados satisfatórios da etapa de pré-redução foram obtidos comparando-se com o uso de HCl [59].

Irradiação ultravioleta e por ultra-som tem sido relatadas como procedimento para reações redox para determinação de Se e espécies de selênio por absorção atômica com geração de hidretos e detecção fluorescente [60]. A análise de especiação de Se inorgânico e orgânico também tem sido investigada utilizando a HPLC e irradiação UV *online* com detecção por HG AAS [61].

3.6.2.2. Procedimentos de extração para a análise de especiação de selênio em amostras biológicas

A identificação e determinação quantitativa de espécies químicas de metais em diferentes matrizes tais como alimentos e amostras biológicas e ambientais apontam um desafio. As etapas de extração e separação devem cuidadosamente consideradas para se manter a integridade das diferentes espécies químicas. As condições de extração devem ser quimicamente brandas e suficientemente eficazes para liberar as espécies da matriz [62].

Geralmente as metodologias para análise de especiação de selênio em amostras biológicas incluem procedimentos de hidrólise ácida, alcalina e enzimática [62]. Os procedimentos enzimáticos tradicionais conduzem a um consumo excessivo de tempo, além de não serem quantitativos e poderem causar interconversão entre as espécies. Tais procedimentos devem ser realizados com incubação à 37° C, ou com ajuda de ultra-som, e são utilizados na sua grande maioria para amostras de levedura enriquecidas com selênio, onde este se encontra na forma de selenoaminoácidos.

A análise de especiação de selenoaminoácidos e compostos orgânicos de Se foi realizada por Bird e colaboradores utilizando procedimentos de extração com água, e temperatura elevada, sendo comparadas ao procedimento utilizando hidrólise enzimática, com protease não específica [63]. Os resultados semi-quantitativos obtidos mostraram que 10% do selênio foram extraídos com água, enquanto que 90% foram extraídos através da hidrólise enzimática.

Chassaigne desenvolveu um procedimento de extração seqüencial foi realizado para o fracionamento dos compostos em amostras de levedura [64]. Este procedimento permitiu a extração da fração solúvel em água e a fração não solúvel utilizando água, dodecil sulfato de sódio, respectivamente, com auxílio de ultra-som. Os resultados para quantificação do selênio nestes extratos foram comparados com o procedimento de digestão via úmida. O fracionamento dos compostos de selênio nestes extratos foi também realizado utilizando colunas preparativas Superdex 75 e 200. Os resultados mostraram que o Se na estava presente nas frações com variada distribuição de massa, tanto de baixo peso molécula (≤ 10000) como na selenocompostos de alto peso molecular na faixa entre 10000 e 100000.

Procedimentos sequenciais de extração em amostra de levedura para análise de especiação foram também realizados por Spunar e colaboradores [65]. O estudo mostrou o fracionamento do selênio em duas classes de compostos, a caracterização da fração das proteínas solúveis em água e o fracionamento das espécies de alto peso molecular através da cromatografia de exclusão por tamanho, após a extração sequencial com dodecil sulfato de sódio, enzimas proteolíticas e hidrólise.

Câmara [66] descreveu um procedimento mais eficaz para determinação de Se total e especiação de compostos de selênio, utilizando enzimas proteolíticas combinado com ultra-som. Em ambos os casos o meio aquoso foi utilizado, minimizando o risco de interconversão das espécies e contaminação, bem como o tempo total de análise.

As espécies de selênio presentes em frações de proteínas solúveis em água de amostras biológicas liofilizadas tais como peixes, ostras, tecidos vegetais e levedura enriquecida com selênio foram investigadas por Moreno. As frações aquosas com e sem dodecil sulfato de sódio foram analisadas por cromatografia por exclusão de tamanho acoplado ao espectrômetro de massa indutivamente acoplado (SEC-ICP-MS) e ao espectrômetro UV. Os extratos aquosos sofreram hidrólise enzimática e os resíduos foram analisados por cromatografia iônica, com troca catiônica, sendo detectadas por ICP-MS. Foram encontradas selenoproteínas de alto peso molecular (150-50 KDa) nas amostras estudadas, exceto para amostras marinhas [67].

Embora o uso de hidrólise enzimática seja bastante difundido, a hidrólise ácida tem sido também uma alternativa bastante eficiente tanto para utilização em amostras de leveduras como também para análise de polipeptídeos e matrizes biológicas. A quantificação de selenometionina em amostras de levedura foi realizada com um método de digestão utilizando ácido metanosulfônico 4 mol/L por 16 horas e a determinação realizada por GC ICP-MS [68].

A determinação de selenoaminoácidos em amostras biológicas foi realizada por cromatografia iônica e detecção eletroquímica. A hidrólise das proteínas foi realizada com ácido clorídrico 6 mol/L e fenol utilizando irradiação por microondas. A caracterização dos aminoácidos foi realizada nos extratos de proteína de fígado de animais marinhos, onde o processo de desintoxicação do metil mercúrio por compostos de selênio foram também relatados [69].

A análise de especiação por HPLC, especialmente em fluidos biológicos, requer que compostos macromoleculares, como proteínas, sejam removidos uma vez que podem

precipitar pela presença de solventes orgânicos ou a presença de sais que contenham as fases móveis utilizadas. Estas interações podem causar uma ligação irreversível com conseqüente efeitos deletérios às fases estacionárias, levando a redução de vida útil das colunas cromatográficas.

Vários métodos de pré-tratamento (*clean up*) de amostras de fluídos biológicos são descritos na literatura, sendo a desproteinização por precipitação com adição de ácidos, solventes orgânicos e ultrafiltração os mais utilizados [70]. Outros métodos incluem a extração em fase sólida que favorecem a limpeza da amostra e a pré-concentração dos analitos [71].

Atualmente, um grande número de publicações relatam o uso preferencial de procedimentos de extração em fase sólida (SPE), no pré-tratamento de diversas matrizes. A partir desta técnica, os analitos são simultaneamente extraídos ou separados e pré-concentrados durante a passagem da amostra por uma pré-coluna, contendo material adsorvente apropriado. Após, os analitos são quantitativamente eluídos com um pequeno volume de solvente adequados e levados à quantificação [71]. A SPE é uma técnica de separação e pré-concentração, realizada principalmente com uso de pré-coluna, muito utilizada na determinação de traços metálicos [72].

Estudos relatam à utilização de polietileno (PE) em pó como adsorvente para separação *online* das proteínas do soro e determinação de sódio, potássio, cálcio e magnésio e quantificação utilizando a técnica de HPLC. A metodologia proposta se mostrou concordante com as metodologias consagradas na determinação destes analitos [73].

O *clean up* para quantificação da tiamina, vitamina B1, em amostra de soro sanguíneo [74] foi também investigado utilizando coluna de PE. Os resultados obtidos relatam que o polietileno foi adequado para retenção de proteínas da amostra. Este estudo também demonstrou que é possível utilizar o PE para quantificar o cobre no soro, sem alterações das propriedades físico-químicas da matriz, demonstrando resultados concordantes com a ultrafiltração. Outros polímeros, como o politetrafluoretileno, teflon, também se mostraram adequados para esta proposta podendo ser utilizados para realizar o *clean up* de fluidos biológicos.

3.6.3. Métodos cromatográficos

O método atualmente mais empregado para análise de especiação do selênio emprega técnicas cromatográficas com uma variedade de detectores, tais como os eletroquímicos [69], UV [75], fluorimétrico [76], ou detecção por espectrometria atômica [77,78,79]. Detecção eletroquímica e por espectrometria molecular sofrem numerosas interferências da amostra e reagentes. Os detectores que utilizam a espectrometria atômica tais como absorção atômica, plasma indutivamente acoplado com espectroscopia de emissão ótica (ICP-OES) e plasma indutivamente acoplado ao espectrômetro de massa (ICP-MS) são boas ferramentas para minimizar estas interferências, porém são bastante dispendiosas.

A determinação cromatográfica de aminoácidos é muito estudada devido a importância biológica dos mesmos. A separação cromatográfica de aminoácidos baseia-se, em princípio, na carga ou hidrofobicidade dos aminoácidos. Devido ao elevado número de aminoácidos e diferentes aplicações, as técnicas podem ser muito variadas [80]. Considerando a natureza dos aminoácidos, existem basicamente dois modos de conduzir a separação. Um, envolve o uso de resinas iônicas (normalmente catiônicas), e eluição através de um gradiente de tampões que alteram gradativamente a carga dos aminoácidos devido aos seus diferentes pontos isoelétricos. O outro modo, faz uso de sistemas de fase reversa com derivação pré ou pós-coluna. Nos dois casos a detecção tanto pode ser espectrofotométrica (ninidrina, 2,1,3-oxadiazol e fenil isotiocianato), quanto fluorimétrica (*o*-ftalaldeído ou dansil).

Baffi e colaboradores [81] realizaram o estudo da fase-reversa C₁₈-sílica em cromatografia para a determinação de aminoácidos livres dissolvidos e complexos de aminoácidos-cobre II em matrizes marinhas. Georgi e colaboradores [82] realizaram determinação por HPLC, de aminoácidos em proteínas hidrolisadas e em plasma usando uma pré-coluna de derivação com *o*-ftalaldeído (OPA), combinado com 2-mercaptoetanol, a coluna utilizada foi uma RP-18.

Em um estudo baseado na comparação de métodos de derivação de aminoácidos realizado por Fermo [83], foi usada coluna ODS (125 x 4,6 mm d.i.), e os eluentes foram (A) 72% água, 20% tampão de propionato de sódio, 8% acetonitrila e (B) 45% água, 30%

acetonitrila, 25% metanol. O fluxo usado foi de 1,4 mL/min e os gradientes utilizados para a separação dos aminoácidos foram diferentes para cada método de derivação.

De um modo geral, os métodos baseiam-se no uso de uma resina catiônica e derivação pós-coluna com ninidrina [82] ou OPA [83]. No caso da análise por fase reversa, a derivação pré-coluna pode ser feita com OPA [84], fenilisotiocianato (PITC) [85], cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonil (dansyl) [86], 9-metilfluorenil clorofórmio (FMOC) [87], 1-fluor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) [88], 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina (FDNPAA) [89] e N,N-dietil-2,4-dinitro-5-fluoranilina (FDNDEA) [83].

As desvantagens do uso de dansyl, FDNB, FDNPAA e FDNDEA são a formação de interferentes na amostra depois da derivação e a necessidade de remoção dos reagentes por secagem. O FMOC tem como desvantagem usar um excesso de solvente (pentano ou hexano) para extrair manualmente o produto da derivação evitando a sua hidrólise.

Fürst e colaboradores [90] compararam quatro métodos de derivação pré-coluna, com OPA, PITC, FMOC e dansyl, para determinação de aminoácidos em materiais biológicos por HPLC. O método de FMOC foi recomendado somente para a determinação de aminoácidos secundários, e o dansyl para a análise de cistina. O método do OPA apresentou as vantagens de uma preparação da amostra mais simples, derivação mais rápida, e a possibilidade de automação aliadas a uma alta sensibilidade para análise de aminoácidos primários em fluidos biológicos. Entretanto, a maior desvantagem deste método é a incapacidade de detectar a cistina e os aminoácidos secundários, além de apresentar derivados instáveis.

McClung e colaboradores [91] compararam cinco métodos de derivação em pré-coluna em termos de limites de detecção, precisão e estabilidade. Eles concluíram que o método de PITC apresenta maior estabilidade. O método do OPA foi o mais adequado considerando os termos de limite de quantificação e o dansyl como o de maior precisão.

Fermo [83] comparou o OPA e o FDNDEA para a análise de aminoácidos em soro sanguíneo por HPLC. Concluíram que se a quantidade de aminoácidos presentes é bastante pequena o método preferido é o do OPA devido a alta sensibilidade e o do FDNDEA para a análise de aminoácidos secundários.

Um método para determinação simultânea de compostos biológicos importantes contendo grupos tióis como cisteína e a homo cisteína no plasma humano foi realizado utilizando HPLC e detecção fluorimétrica com reação de derivação com OPA. Os autores concluíram que somente foi possível determinar cisteína e homocisteína após a proteção dos grupos sulfidrílicos dos aminoácidos com ácido iodo-acético antes da reação com o derivatizante [92].

Outro relato do uso do ácido iodo-acético foi realizado por Cooper e Turnel, uma vez que, segundo os autores, uma desvantagem da reação do OPA é que a cisteína, assim como outros aminoácidos contendo aminas primárias, produzem derivados com fluorescência mínima. Este problema poderia ser contornado pela oxidação da cistina e cisteína à ácido cisteíco, quando então poderia proporcionar um composto fluorescente comparável a outros aminoácidos. Porém, é difícil obter reprodutibilidade de reação, sendo contornado pelo uso do ácido iodo-acético [93].

Um método descrito baseado na reação fluorescente da selenocisteína com o ácido n(iodo acetilaminoetil)-5-naftilamina-1- sulfônico foi realizado tendo resposta linear e baixo limite de detecção para amostras de soro e plasma sanguíneo, sem interferências dos grupos tióis do plasma, sendo então uma alternativa de custo menor, e com excelente sensibilidade [94].

Poucos estudos relatam a utilização de métodos para análise de especiação de selênio utilizando métodos desenvolvidos para os aminoácidos análogos de enxofre [75].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- Espectrômetro de Absorção Atômica Varian (Melbourne, Austrália), equipado com atomizador forno de grafite GTA 100 e gerador de hidretos por fluxo contínuo VGA 77.
- Cromatógrafo à líquido Dionex DX-300 (Sunnyvale, USA) com sistema de eluição por gradiente.
- Detector de fluorescência HP 1100, Agilent Technologies (Palo Alto, EUA).
- Coluna analítica Aminopac PA1 (250 × 4,6 mm de d.i.; 5 µm) Dionex (Sunnyvale, USA).
- Cromatógrafo à líquido Shimadzu (Tokio, Japão) bomba LC-10AD com sistema de eluição isocrática.
- Detector espectrofotométrico UV-Visível SPD-10 AV.
- Coluna analítica C18 Supercosil (150 × 4,6 mm de d.i.; 5 µm), Supelco (St. Louis, EUA);
- Interface para aquisição informatizada de dados KNAUER (Alemanha).
- Sistema informatizado de aquisição de dados, integração e registro via EUROCHROM 2000 SOFTWARE ® basic edition Versão 2.05 para windows.
- Espectrofotômetro Hewlet Packard 8453 (Waldbronn, Alemanha).
- Bomba de vácuo Leybold-Heraeus D3 (Alemanha).
- Bomba peristáltica ICP Ismatec (Glattbrugg-Zürich, Suíça).
- Câmara de fluxo laminar Trox do Brasil, Classe 100 (São Paulo, Brasil).
- Estufa Ehret (Emmendingen, Alemanha);

- Digestor UV 705, Metron (Herisau, Austria) equipado com lâmpada de Hg 500 W;
- Destilador de ácidos a Berghof BSB 939-IR (Eningen, Germany);
- Agitador mecânico Edmund Bühler 7400;
- Medidor de pH Digimed D 20 (São Paulo, Brasil);
- Banho ultra-som Bandelin Sonorex RK 510 (Berlim, Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore (resistividade 18,2 MΩ.cm);
- Balança analítica Sartorius com precisão de 0,1 mg.
- Agitador Vórtex.

4.2. Reagentes e soluções

Utilizou-se água destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 M Ω .cm) no preparo das soluções.

Todos os reagentes utilizados foram produtos de grau de pureza analítico.

Utilizaram-se sais de selenito, selenato de sódio (Merck), selenometionina e selenocistina (Acròss).

Ácido nítrico destilado, ácido perclórico, ácido clorídrico, brometo de sódio e ácido sulfâmico e peróxido de hidrogênio (Merck) foram empregados nos pré-tratamentos testados. Utilizou-se nitrato de níquel (Merck) para o preparo do modificador químico.

Polietileno 40-60 mesh (Merck) e politetrafluoretileno (teflon) 150-180 mesh (Aldrich) – utilizados na confecção de colunas de separação de proteínas.

Metanol, acetonitrila, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, acetato de sódio p.a. (Merck, Darmsttat) – utilizados no preparo dos eluentes.

o-ftalaldeído, etanotiol e 9-metilfluorenil clorofórmio (Acròss) (Merck, Darmsttat) – reagentes de derivação.

Kits comerciais para determinação de uréia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) (LABITEST, Diagnostica S.A.).

As soluções estoque dos aminoácidos de 1000 mg/L foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas de seus sais em água e armazenadas sob refrigeração. A solução de selenocistina foi preparada em HCl 0,1 mol/L. As soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas por diluição das soluções estoque.

O reagente de Comassie foi preparado misturando-se para 100 mL de solução 10 mg de Azul Brillhante de Comassie G-250 (Sigma), 5 mL de EtOH, 10 mL de ácido fosfórico 85%, respectivamente. Após o volume foi completado a 100 mL com água.

A fase móvel (FM) para o sistema de derivação pós-coluna constituiu-se de 2 eluentes: o eluente 1 consistiu de uma solução 0,2 mol/L de hidróxido de sódio; enquanto o eluente 2 consistiu de uma solução 0,7 mol/L de acetato de sódio.

A solução de derivação de *o*-ftalaldeído (OPA) foi preparada adicionando-se 2,0 g de bórax anidro (Acròss) a 90 mL de água (com ajuda banho de ultra-som). Após dissolução, foram

adicionados 0,25 g de OPA sob agitação, e 5 mL de metanol, completando-se o volume a 100 mL. Após, filtrou-se à vácuo utilizando membrana de 0,45 µm de acetato de celulose, e 0,25 mL de etanotiol. Agitar, liberando a pressão, repetindo-se este procedimento várias vezes.

Pesaram-se 1,5 g do ácido iodo-acético (AIA) (Biogen) e dissolveram-se em solução de bórax 0,1 mol/L pH 10,5, preparada previamente. Ajustou-se o pH até 10,5-11,5 com solução de NaOH e completou-se o volume à 40 mL. A solução foi mantida sob refrigeração.

Tampão borato 0,1 mol/L foi preparado a partir de tetraborato de sódio (Merck) e o pH ajustado a 10,5 com NaOH.

Para o preparo da FM com o sistema de derivação pré-coluna e detecção UV, utilizou-se 2 eluentes com diferentes composições. Uma solução tampão acetato pH 4,4 a qual foi preparada pela adição de 3 mL ácido acético glacial e 1 mL trietilamina (Sigma) à 900 mL água. O pH foi ajustado com NaOH. Fase móvel A constitui-se da mistura de acetonitrila, metanol e tampão acetato (20:30:50) e a fase móvel B na proporção de 40:10:50 dos mesmos reagentes, respectivamente.

Para a solução de derivação FMOC 15 mmol/L, pesou-se o reagente em tubo de plástico e completou-se o volume com acetona p.a (Merck). Esta solução foi preparada diariamente.

Para a solução tampão borato 0,4 mol/L, o pH foi ajustado a 7,9 com NaOH.

4.3. Controle da contaminação

Para garantir superfícies livres de contaminação por metais, fez-se o uso de material plástico (polietileno, polipropileno) para armazenar as soluções utilizadas no presente estudo. Os recipientes utilizados, tanto de vidro quanto de plástico, foram deixados em contato com uma solução de HNO₃ 10% (v/v) em etanol por 48 horas, e lavados posteriormente com água purificada antes de serem utilizados.

Preliminarmente ao procedimento de descontaminação com HNO₃, os recipientes de vidro foram deixados em contato com solução detergente de Extran 2% (v/v), por no mínimo 24

horas, e lavados com água ultra-pura em abundância, para garantir uma superfície livre contaminação orgânica.

A contaminação do ar foi evitada utilizando-se uma câmara de fluxo laminar classe 100 para o preparo das soluções e amostras.

4.4. Avaliação da metodologia para a quantificação de selênio e análise de especiação

4.4.1. Avaliação do nível de selênio em aves

4.4.1.1. Amostras

As amostras utilizadas para investigação das condições de determinação do selênio total foram frango (músculo e pele), obtidas do mercado local.

O músculo e a pele foram separados antes do tratamento. As amostras foram processadas e homogeneizadas em processador de alimentos. Uma parte foi diretamente submetida ao procedimento de digestão ácida, conforme será descrito em detalhes posteriormente. Porções de 0,5 g foram pesadas, transferidas para um frasco de vidro e cobertas com pedaço de tecido, para evitar deposição de partículas, e levadas à estufa por 24 horas à 65°C.

4.4.1.2. Procedimentos de digestão de amostras

Digestão ácida direta: para aproximadamente 0,5 g de músculo ou pele adicionou-se 5 mL de HNO₃. Após 24 horas, aqueceu-se em banho-maria por 3 horas e 5 mL de HClO₄, cuidadosamente, pelo risco de explosão, foi adicionado e novamente aqueceu-se por mais 4 horas. Completou-se o volume a 20 mL com água. O Se foi determinado por GF AAS. Estas

amostras posteriormente foram pré-reduzidas para Se IV para determinação por HG AAS, como será descrito abaixo.

Digestão ácida após secagem das amostras: transferiram-se 0,5 g de amostra de músculo e pele para tubos de vidro e levou-se à estufa. Após, adicionaram-se 3 mL de HNO₃ concentrado, deixando a mistura repousar por 12 horas. 2 mL de HClO₄ foram então adicionados e aqueceu-se em banho-maria por 4 horas. O volume foi completado a 20 mL com água, o Se determinado diretamente por GF AAS e, após a pré-redução, por HG AAS.

Digestão ácida das amostras secas após a extração da gordura: 0,5 g de amostra de músculo e pele foram secas na estufa como descrito acima. Após este procedimento, 4 mL da mistura de solventes metanol/diclorometano, na proporção 2:3, foram adicionados, agitando-se vigorosamente e deixando em repouso por uma noite. Após, o resíduo sólido restante foi filtrado, seco e digerido conforme descrito para digestão das amostras secas, com 2 mL de HNO₃ e 1 mL HClO₄. A fração orgânica foi evaporada e o resíduo restante foi dissolvido com uma mistura de solvente metanol/diclorometano, na proporção 4:1. O Se presente nesta fração foi determinado por GF AAS usando padrões de Se preparados no mesmo meio metanol/diclorometano. A fração digerida teve seu volume completado a 20 mL com água e, após etapa de pré-redução, o Se determinado por HG AAS.

4.4.2. Espectrometria de Absorção atômica

4.4.2.1. Forno de grafite

Para a determinação de Se por GF AAS, é necessário utilizar modificador químico. Soluções de nitrato de níquel, cobre, paládio e magnésio foram testadas como modificadores químicos para este estudo, nas concentrações de 1 e 2,5 g/L [50], tanto em solução aquosa como em meio orgânico, quanto na presença dos constituintes da matriz após a digestão da amostra. Soluções padrões de selenometionina, selenocistina e selenito de sódio foram preparadas em

água e na mistura dos solventes metanol/diclorometano na proporção 4:1, na concentração de 20 µg/L de cada espécie de Se.

Programas de temperatura foram avaliados para a determinação do selênio inorgânico e orgânico por GF AAS, construindo-se as curvas de pirólise e atomização. O Se foi determinado em ambos os solventes e nas amostras fortificadas com cada espécie de Se. As temperaturas avaliadas ficavam entre 900 e 1500°C para as curvas de pirólise e entre 2400 e 2700°C para as curvas de atomização. Todas as determinações foram feitas utilizando solução de Ni 2,5 g/L, como modificador. Os parâmetros do espectrômetro de absorção atômica são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Programa de temperatura para determinação de Se por GF AAS e parâmetros do espectrômetro de absorção atômica

<i>Parâmetros do espectrômetro</i>			
Comprimento de onda	196,0 nm		
Fenda	1,0 nm		
Corrente da lâmpada	10 mA		
<i>Geração de Hidretos</i>			
Célula de quartzo	15 cm comprimento x 8 mm d.i.		
Tipo de aquecimento	Eletrotérmico		
Temperatura	850 ⁰ C		
Fluxo de N ₂	1,5 L/min		
Fluxo da amostra	8 mL/min		
Concentração do redutor	1% (m/v) em 0,1 mol/L NaOH		
Fluxo do redutor	1,0 mL/min		
Concentração do ácido	6,0 mol/L HCl		
Fluxo do ácido	1,0 mL/min		
<i>Atomização Eletrotérmica:</i>			
	Tubo de grafite com plataforma pirolítica		
Fluxo gás	3,0 L/min		
Volume de amostra	10 µL		
Volume do modificador	5 µL		
Programa de temperatura:			
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo (L/min)
1	85	5,0	3,0
2	95	30,0	3,0
3	120	10,0	3,0
4	1100	20,0	3,0
5	1100	15,0	3,0
6	1100	17,6	0,5
7	1100	1,0	0,0
8	2600	0,8	0,0
9	2600	2,0	0,0
10	2600	2,0	3,0

4.4.2.2. Geração de hidretos

A determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos requer que este elemento esteja na forma de Se (IV) para sua utilização. A vista disso, foram realizados ensaios, após os procedimentos de digestão, para redução do Se e a sua determinação por HG AAS.

Irradiação UV: 1 mL da amostra digerida foi diluída com 8 mL de água, o pH ajustado a 8,0 com NaOH 1 mol/L e a amostra submetida a irradiação UV em intervalos de tempo de 1 a 5 horas. Para cada hora de irradiação, adicionou-se à amostra 50 µL de solução de H₂O₂ 30% (m/v). Após o término da etapa de pré-redução, o volume foi completado a 10 mL e a amostra analisada por HG AAS.

Redução com HCl: adicionou-se 2 mL de HCl concentrado à 2 mL de amostra digerida, aquecendo-se em banho-maria por 15 minutos. O volume foi completado a 10 mL e o Se determinado por HG AAS.

Redução com HCl + ácido sulfâmico: para 2 mL de amostra digerida, adicionou-se 2 mL de HCl concentrado e 2 mL de ácido sulfâmico 10% (m/v). A amostra foi então aquecida em banho-maria por 15 minutos, o volume completado à 10 mL e o Se determinado por HG AAS.

Redução com NaBr + ácido sulfâmico: adicionou-se 0,32 g de NaBr e 2 mL de ácido sulfâmico 10% (m/v) à 2 mL de amostra. Esta mistura foi aquecida em banho-maria até a amostra se tornar sem cor. Completou-se o volume a 10 mL e determinou-se o Se por HG AAS.

4.4.2.3. Ensaios de recuperação para avaliação da determinação de Se total por GF AAS e HG AAS

A recuperação das espécies de selênio foi realizada com o objetivo de avaliar a interferência da matriz na determinação das espécies presentes e o estudo da reprodutibilidade do método proposto.

Foram realizados dois experimentos diferentes. Uma mistura das espécies selenito, selenato, selenometiona e selenocistina (10 mg/L) foram preparadas e 100 µL desta solução adicionada às amostras antes do procedimento de digestão para avaliação da medida de Se por HG AAS, após a etapa de pré-redução, e por GF AAS para verificar a performance instrumental. Um segundo procedimento consistiu da adição da mistura destas espécies as amostras após cada tratamento para checar a performance de todos os procedimentos.

Adicionalmente, foram realizados experimentos de recuperação de Se na presença de cobre, ferro, cromo e zinco, sendo as medidas feitas por HG AAS. Uma solução 10 µg/L de Se (IV) contendo Zn e Fe (10 mg/L) e Cu e Cr (1 mg/L) foi preparada e analisada por HG AAS nas condições descritas acima, onde foram tomados 5 mL desta solução e os ácidos para o procedimento de digestão adicionados. O mesmo procedimento foi realizado com as espécies de Se (VI), SeM e SeC. Após, foi realizada a etapa de pré-redução com NaBr/ác. sulfâmico e a determinação de Se feita por HG AAS.

4.4.3. Cromatografia iônica

O-ftaldeído (OPA-SH) é um reagente amplamente utilizado para derivação de aminoácidos e detecção por fluorescência, para uso na cromatografia líquida de alta eficiência, tanto pré como pós-coluna. No presente estudo, investigou-se o uso deste reagente para identificação dos selenoaminoácidos SeM e SeC, utilizando a cromatografia iônica e detecção fluorescente pós-coluna.

O sistema constituiu-se de uma coluna aniônica, específica para aminoácidos, AminoPac PA1 (250 x 4,6 mm de d.i.; 5,0 µm; Dionex), com sistema de eluição por gradiente, detector de fluorescência ajustado em 330 nm para excitação e 455 nm para emissão [115].

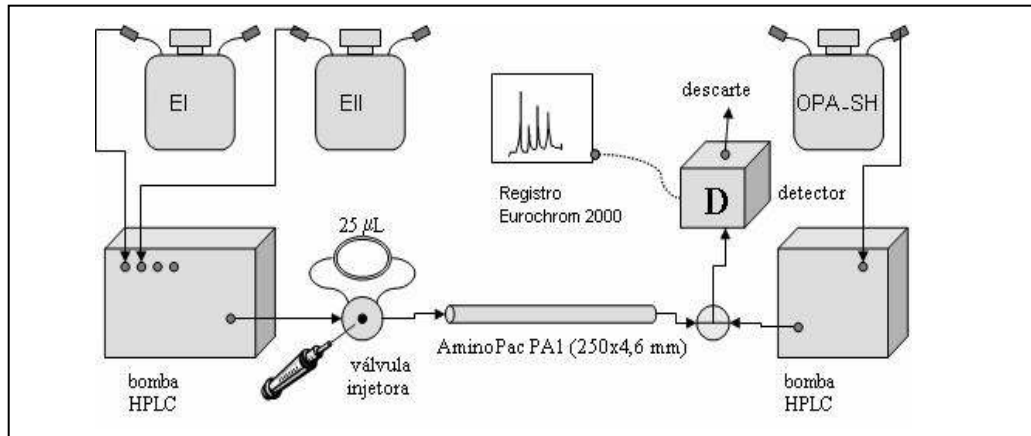


Figura 4 – Sistema de HPLC com derivação pós-coluna com OPA-SH e detecção fluorescente usado para a determinação dos aminoácidos, onde EI: 200 mmol/L NaOH e EII: 700 mmol/L NaAc

Como mostra a Figura 4, uma alíquota de 25 µL da amostra é injetada no sistema e após a separação dos analitos na coluna, estes são carregados, a vazão de 0,6 mL/min, até a célula misturadora. Na célula misturadora, entram em contato com a solução de derivação (OPA-SH), a vazão de 0,2 mL/min. O composto fluorescente formado é, então, carregado até o detector e o sinal cromatográfico é registrado através do acoplamento da interface ao computador, utilizando o programa Eurochrom 2000 para aquisição, integração e registro dos dados.

O gradiente de eluição começa com NaOH 60 mmol/L, após oito minutos se converte em 90 mmol/L, permanecendo por quatro minutos. Em dezoito minutos um gradiente de 56 mmol/L de NaOH e de zero a 400 mmol/L do eluente acetato de sódio é realizado, permanecendo por sete minutos. Após, o gradiente se transforma em 30 mmol/L de NaOH e 600 mmol/L de acetato, mantido por quatro minutos e, então, NaOH 200 mmol/L é introduzido. Após três minutos a FM volta à composição inicial de 60 mmol/L, sendo a linha base estabilizada após aproximadamente sete minutos. O tempo total de corrida é de quarenta minutos para cada injeção.

4.4.3.1. Medidas espectrofotométricas dos selenoaminoácidos com o *o*-ftaldeído

Primeiramente, fizeram-se as medidas espectrofotométricas dos aminoácidos selenometionina e selenocistina, na concentração de 400 mg/L, adicionando-se 0,1 mL de solução do aminoácido e 0,5 mL do reagente de derivação à 2 mL de água.

4.4.3.2. Estudo da concentração do ácido iodo acético na determinação das espécies de selenoaminoácidos

Avaliou-se a influência da concentração do ácido iodo-acético (AIA), no sinal analítico da SeC e SeM, preparando-se soluções deste reagente nas concentrações de 4, 8, 16 e 32 mg/L, misturando-se 250 µL de solução padrão à 100 µL de solução de AIA e 250 µL de solução tampão borato 0,1 mol/L, pH 11,5. Após trinta segundos de reação, avaliou-se a variação da área do pico para a selenometionina e selenocistina, nas concentrações de 0,8, 1,6 e 8 mg/L, injetando-se no sistema sem coluna. Após, o mesmo procedimento de reação foi efetuado, onde soluções padrão 0,8, 1,6 e 3,2 mg/L de SeC foram injetados no sistema de HPLC utilizando a coluna analítica Aminopac PA1, para verificação do tempo de retenção do analito.

4.4.3.3. Determinação simultânea da SeM e SeC

Avaliou-se a possibilidade fazer a determinação simultânea da SeM e SeC montando-se um sistema similar ao da Figura 3. Após as espécies serem separadas na coluna analítica em um fluxo de 0,6 ml/min, fez-se a inclusão de uma célula misturadora preliminarmente à célula de reação com OPA, carreando-se a solução de AIA 0,2 mol/L, em um fluxo de 0,14 mL/min, somente após 20 minutos de corrida cromatográfica.

4.4.4. Cromatografia por fase reversa

Para verificar a possibilidade de determinar as espécies orgânicas de selênio, os selenoaminoácidos, com derivatizantes utilizados para reação com aminoácidos, investigou-se também o reagente 9-metilfluorenil clorofórmio (FMOC). Deste modo, a cromatografia de fase reversa com derivação pré-coluna e detecção ultravioleta foi estudada.

O sistema cromatográfico (Figura 5) constitui-se de uma coluna C18 (150 x 4,6 mm de d.i.; 5 μ m), com sistema de eluição por gradiente, equipado com detector espectrofotométrico UV-Visível (Shimadzu), ajustado em 307 nm. O volume da alça de injeção foi 25 μ L. O registro do sinal foi feito através do acoplamento da interface ao computador, utilizando o programa Eurochrom 2000 para aquisição dos dados, integração e registro.

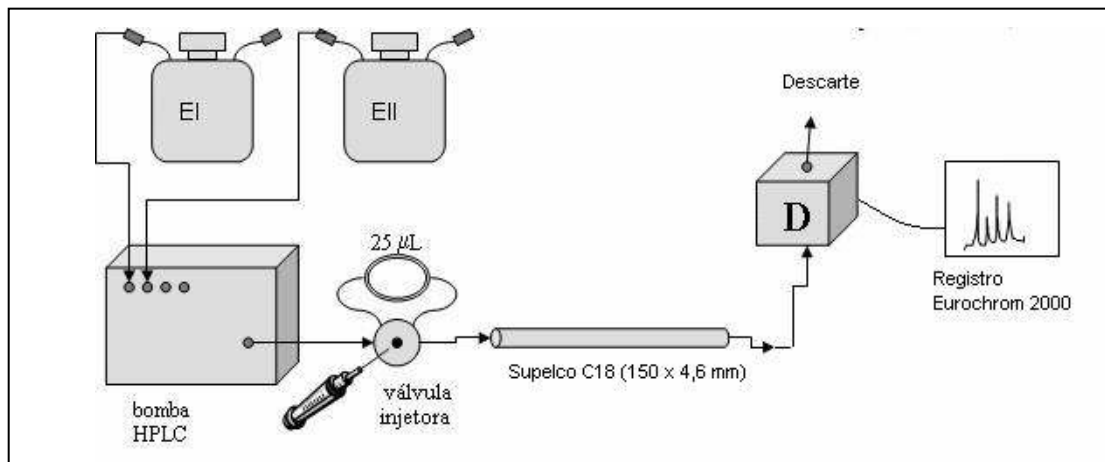


Figura 5 – Sistema de HPLC-UV e derivação pré-coluna com FMOC para determinação dos selenoaminoácidos

O sistema de gradiente foi 100 % do eluente I por vinte e dois minutos, fazendo um gradiente linear do eluente I à eluente II, e após 24 minutos 100% do eluente II. O tempo total de análise foi de quarenta minutos, sendo que a linha base leva em torno de cinco minutos para estabilizar.

4.4.4.1. Reação de derivação com o FMOC

A reação de derivação consistiu da mistura de 800 μL de amostra à 200 μL de solução tampão borato 0,4 mol/L, pH 7,9, e 500 μL de solução derivatizante, agitando-se vigorosamente em vórtex por 30 segundos. Após repouso de 60 segundos, o excesso de FMOC foi extraído com 2 mL de hexano. Este procedimento foi repetido três vezes, sendo que para melhor separar a fase orgânica da aquosa, centrifugou-se a solução por 5 minutos entre as extrações, a 3000 rpm.

4.4.4.2. Medidas espectrofotométricas dos selenoaminoácidos e FMOC

Após a reação de derivatização, foram feitas medidas espectrofotométricas das soluções padrões de SeM e SeC, bem como dos aminoácidos arginina e metionina, todos na concentração de 400 mg/L. Posterior a este procedimento, injetou-se os mesmos no sistema HPLC-UV nos comprimentos de onda de 254 e 307 nm para verificar a resposta dos aminoácidos nos diferentes comprimentos de onda.

4.4.4.3. Escolha da fase móvel e a vazão do sistema HPLC-UV

Foram testados os modos de eluição isocrática e por gradiente. Para a escolha da composição da fase móvel para a separação cromatográfica testaram-se as seguintes composições de acetonitrila:metanol:tampão acetato: 10:40:50, 15:35:50, 20:30:50, 40:10:50 e 50:0:50 (v/v), nas vazões de 0,6; 0,7; 0,8 e 1,0 mL/min.

Foram preparadas soluções nas concentrações de 4, 8 e 16 mg/L para arginina metionina, SeM e SeC. Estas soluções foram injetadas para avaliação do tempo de retenção e sensibilidade do método.

4.4.4.4. Estudo do tempo de reação e concentração do derivatizante

Para avaliar se o tempo de reação e concentração do derivatizante poderia interferir na sensibilidade do método, testou-se a reação em diferentes tempos: imediatamente, dez e trinta minutos após mistura dos reagentes (T0, T10 e T30, respectivamente), com agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos, porém antes da extração do excesso de FMOC por hexano. Após este estudo, avaliou-se a influência da concentração do reagente derivatizante nas concentrações de 3, 7,5, 15 e 30 mmol/L, injetando-se após um minuto de reação. Em ambos os casos avaliaram-se a variação da área do pico para os aminoácidos metionina, selenometionina e selenocistina, nas concentrações de 0,8 mg/L.

4.4.4.5. Estudo de estabilidade após a reação de derivação

O estudo de estabilidade dos compostos derivatizados foi realizado avaliando-se a variação da área do pico para os aminoácidos selenometionina e selenocistina, na concentração de 0,8 mg/L após obtenção da fase aquosa nos tempos de 30, 120 e 960 minutos.

4.4.5. Validação dos métodos cromatográficos

Definidas as melhores condições para a separação dos selenoaminoácidos estudados, foi feita a validação da metodologia tanto a determinação com derivação pré-coluna pelo FMOC e detecção espectrofotométrica ultravioleta, como com derivação pós-coluna com OPA-SH, com detecção fluorimétrica seguindo os parâmetros descritos a seguir.

A curva analítica para os selenoaminoácidos foi construída na faixa de concentração de 0,016 a 1,6 mg/L para a SeM e de 0,032 a 4 mg/L para SeC, para avaliação dos parâmetros do método de HPLC-OPA. Já para o método de HPLC-FMOC a curva analítica foi construída na faixa de concentração de 1,6 a 8 mg/L para a SeM e 0,8 a 8 mg/L para a SeC.

A precisão do método em termos de repetitividade (RSD) foi efetuada procedendo-se a hidrólise e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi injetado três vezes.

A recuperação dos analitos SeM e SeC foi realizada com as amostras de soro e levedura fortificadas. Para a determinação por HPLC-OPA-SH, as amostras do soro foram fortificadas com e as amostras de levedura 0,16, 0,32 e 0,64 mg/L com cada uma das espécies de SeM e SeC. Para a determinação por HPLC-UV, as amostras foram fortificadas com 16, 32 e 64 mg/L de cada uma das espécies de SeM e SeC.

4.5. Caracterização da levedura presente na ração animal – Experimento 1

4.5.1. Determinação de Se total nas amostras de levedura

As amostras de levedura foram obtidas de fornecedores diferentes, que fornecem suplementos para indústrias produtoras de aves.

Primeiramente, foi realizado o procedimento de digestão ácida da levedura, a qual faz parte da constituição da ração animal, para determinação de Se total. Para isso efetuou-se o procedimento descrito na seção 4.4.1.2, através da digestão direta da amostra.

4.5.2. Procedimentos de extração

O estudo da caracterização da levedura através da extração das proteínas e outras espécies de Se, como selenoaminoácidos, SeM e SeC, e Se inorgânico foi realizado nas amostras. Porções de 100 mg de amostra de levedura foram pesadas e 20 mL de água Milli-Q adicionados, sob agitação no vórtex por 1 minuto, para completa homogeneização. A mistura foi levada a um banho de ultra-som à 85°C por 60 minutos. O mesmo procedimento foi realizado, adicionando-se a solução 5 mL de solução Tris 10 mmol/L, pH 7,5 e 1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), sendo mantido o volume final de 20 mL. Após este procedimento, foi determinado o teor de Se total, pela técnica de GF AAS, Se IV e Se VI por HG AAS, a

concentração de proteínas totais pelo método espectrofotométrico do Azul Brilhante de Comassie.

4.5.3. Determinação das proteínas – teste do Azul Brilhante de Comassie

O método do Azul Brilhante de Comassie [95] foi utilizado para quantificação de baixas quantidades de proteínas totais e consiste na mistura de 2,5 mL de reagente de Comassie com 100 µL da amostra. A medida da absorvância é feita em 595 nm após um tempo de espera de 10 minutos, necessários a formação do complexo. O complexo formado é estável por 1 hora e 30 minutos.

4.5.4. Estudo da separação das proteínas extraídas da levedura em colunas de polietileno e teflon

O estudo da retenção e separação das proteínas, após a extração, foi realizado utilizando-se colunas de polietileno e politetrafluoretileno, teflon. Cada coluna dos d

Diferentes polímeros foi confeccionada com a união de duas ponteiros descartáveis de micropipetas com capacidade de 1 mL. Colocou-se uma pequena quantidade de lã de vidro nas extremidades das ponteiros a fim de sustentar o polímero em pó e adicionou-se cerca de 1 g do polímero previamente descontaminado com solução de HNO₃ 10% (v/v) em etanol.

Primeiramente, fez-se um teste para verificar a retenção das proteínas no polímero, montando um sistema (Fig. 6) em que a bomba peristáltica conduz 1 mL da amostra através de uma mangueira de tygon (d.i. 1,02 mm). A vazão deste sistema é 0,3 mL/min. Após recolhimento da alíquota (efluente), passou-se pela coluna 1 mL de água (eluato), repetindo-se o procedimento cinco vezes, e registrando-se o espectro de absorção na região do visível. Para saber se as proteínas ficaram retidas na coluna, realizou-se um espectro de referencia repetindo-se o teste anterior sem passagem da amostra pelas colunas de polietileno e teflon.

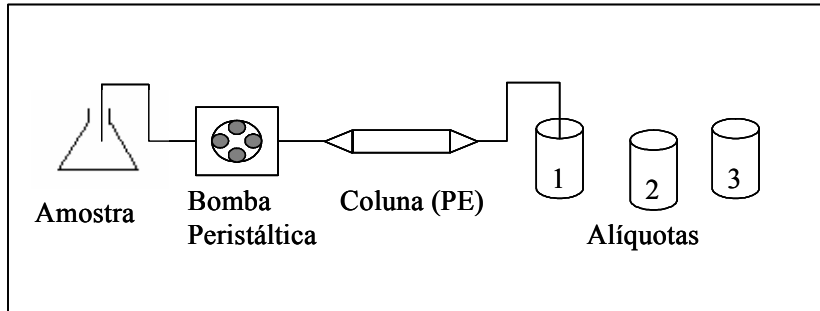


Figura 6 – Sistema empregado no estudo da retenção das proteínas na coluna de polietileno (PE) em pó

A eluição das proteínas retidas foi promovida carreando-se 5 mL de metanol pela coluna do polímero, à uma vazão de 0,5 mL/minuto.

Na separação das proteínas na coluna de polietileno (PE), foi recolhido o eluato contendo o Se não ligado às proteínas, e, após a eluição das mesmas com metanol, obteve-se a fração de Se ligado às proteínas. O Se total foi determinado nas frações por GF AAS. O referido procedimento foi realizado com a coluna de teflon.

O mesmo estudo foi realizado em amostras de levedura fortificadas com Se inorgânico, na forma de Se IV, e com a selenometionina, na concentração de 100 µg/L.

4.5.5. Hidrólise

Uma vez que o procedimento de extração não possui eficiência máxima na extração do Se, estudou-se a hidrólise como técnica de pré-tratamento da amostra para a quantificação das espécies de selenoaminoácidos por HPLC, tanto para as amostras levedura como também para o soro sanguíneo. Fez-se um comparativo entre as técnicas de hidrólise ácida e enzimática.

4.5.5.1.Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada nas amostras de levedura e soro. Para alíquotas de 200 μ l de soro, foram adicionados 100 μ l água e 400 μ L HCl 6 ml/L. O tubo de vidro de 1,5 mL de capacidade foi fechado com a tampa e o septo, injetando para dentro N₂ por 30 segundos. Abriu-se levemente a tampa do recipiente, para equilibrar a pressão e repetiu-se a injeção de N₂. Levou-se à estufa por 24 horas a 110°C. Após o resfriamento, o conteúdo do frasco foi transferido para um recipiente de plástico de 10 mL de capacidade e o volume completado à 4 mL, ajustando-se o valor do pH em torno de 5 com NaOH. Na hidrólise das amostras de levedura, para cada 100 mg da amostra, adicionaram-se 700 μ L de HCl 6 mol/L.

As amostras foram centrifugadas por 20 minutos e filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 μ m.

Para verificar a eficiência da hidrólise, fez-se o espectro de absorção após o procedimento, pelo método Azul Brilhante de Comassie.

4.5.5.2.Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi testada com as amostras de soro e levedura utilizando as enzimas proteolíticas papaína, pancreatina, bromelâina e pepsina. Para este estudo, utilizou-se solução da enzima no pH adequado para a atividade de cada enzima, segundo a Farmacopéia Americana [96].

A solução de pancreatina pH 7,5 foi preparada adicionando-se a 0,7 g da enzima, 0,3 g de KOH e 0,34 g de KH₂PO₄, completando-se o volume a 50 mL com água ultra pura.

Para o preparo da solução da papaína pH 4,5, pesou-se 0,7 g da enzima e adicionou-se 0,7 g de EDTA, 0,35 g de NaHPO₄, 0,30 g de cisteína, completando o volume a 50 mL.

A solução de pepsina pH 2,0 foi preparada adicionando-se 0,7 g da enzima com 0,51 g de NaCl e completando-se o volume a 50 mL com água ultra pura.

Para o preparo da solução enzimática de bromelâina, pH 6,0 adicionou-se 50 mL da solução do tampão a 0,7 g da enzima. A solução utilizada foi obtida pela mistura dos sais NaH_2PO_4 (0,35 g), EDTA (0,70 g) com cisteína (0,30 g).

Primeiramente, fizeram-se ensaios preliminares observando-se a efetividade da degradação enzimática pelo método espectrofotométrico de Lowry [97], onde deverá ocorrer diminuição da concentração de proteína pela ação da enzima. Adicionalmente a determinação das proteínas nas amostras de soro, verificou-se também o aumento da concentração de aminoácidos presentes no meio pelo método espectrofotométrico com a ninidrina [98]. As curvas de calibração para os métodos de Lowry e da ninidrina foram realizadas com soluções padrão de ovoalbumina e glicina, nas concentrações de 0,3; 0,5; 1 g/L e 0,01 0,1; 0,5; e 1% (m/v), respectivamente. Estes ensaios foram realizados utilizando 200, 500, 800 e 1000 μL de amostra de soro na presença de 4 mL da solução enzimática, sendo o volume final completado a 5 mL com água, quando necessário. As amostras foram encubadas em banho-maria, a 37°C , e as medidas espectrofotométricas realizadas nos tempos 0, 30, 60, 120 e 1440 minutos.

O método de Lowry para determinação de proteínas consistiu da mistura 20 μL de amostra ou padrão a 180 μL de água, 2,5 mL do reativo A e, após dez minutos, a 0,25 mL do reativo B. Após um tempo de reação de 20 minutos, as leituras foram realizadas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm. O reativo A foi feito pela adição de 25 mL de solução de Na_2CO_3 2% (m/v) em NaOH 0,1 mol/L a 0,25 mL de solução de CuSO_4 1% (m/v) e 0,25 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 2% (m/v).

Para determinação dos aminoácidos com a ninidrina, misturou-se uma alíquota de 1 mL de amostra, ou padrão, a 0,5 mL de ninidrina 0,2% (m/v) em acetona. Aqueceu-se em banho-maria por um tempo de aproximadamente 15 minutos, até a observação da formação de complexo de cor azul. Fizeram-se as leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 570 nm.

Posteriormente, fez-se o ensaio da degradação das proteínas da levedura pela enzima papaína. O procedimento efetuado consistiu da adição de 2 mL de tampão Tris (30 mmol/L, pH 7,5) a 0,1 g de amostra. Agitou-se por 20 segundos, com auxílio de vórtex, repetindo-se este procedimento 4 vezes. Centrifugou-se a 3000 rpm por 90 minutos, retirando-se o sobrenadante e adicionando 5 mL da solução de cada enzima, levando-se ao banho-maria à 37°C . Recolheram-

se alíquotas nos tempos 0, 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a incubação. Após este procedimento, a concentração de proteínas e aminoácidos foi determinada espectrofotometricamente.

Após estes ensaios preliminares, testou-se novamente a efetividade da hidrólise enzimática, com as enzimas papaína e pancreatina, utilizando o método Azul Brilhante de Comassie, conforme descrito na seção 3.5.3. Para cada 4 mL de solução enzimática, adicionaram-se incrementos de 100, 200 e 500 µL da amostra de soro, completando-se o volume a 5 mL com água ultra pura. A degradação das proteínas da amostra de levedura foi testada utilizando-se 100 e 200 mg de levedura. A solução de referência para verificação da efetividade do procedimento de hidrólise foi realizada adicionando-se apenas água às amostras. O espectro de absorção para avaliação da degradação das proteínas foi realizado pelo método Azul Brilhante de Comassie, imediatamente e 24 horas após a adição da enzima as amostras.

4.6. Avaliação do selênio em aves tratadas oralmente com Se inorgânico e orgânico – Experimento 2

As aves, fornecidas pela indústria produtora de aves, foram oralmente tratadas com selênio inorgânico e orgânico para avaliar a influência da forma de selênio na sua disponibilidade em aves, como fonte de selênio na dieta.

As aves foram divididas em três grupos. O grupo controle, T1, foi obtido do mercado local (n=4). O grupo T2 (n=24) recebeu uma dieta com suplementada com selenito de sódio e o grupo T3 (n=24) foi tratado com Se orgânico na forma de levedura. As informações da dosagem e da duração do tratamento não podem ser fornecidas por serem protocolos industriais.

Primeiramente, as amostras foram processadas e homogeneizadas em processador de alimentos. Posteriormente, as amostras foram secas na estufa à 65°C por 24 horas.

A extração da gordura foi realizada utilizando a mistura dos solventes, diclorometano e metanol. O Se foi determinado nesta fração por GF AAS. Para avaliação da distribuição do Se entre gordura e resíduo, realizou-se este experimento para um conjunto de 4 amostras de cada tratamento. Após, fez-se a digestão ácida ao resíduo restante e as demais amostras de cada

tratamento, conforme descrito na seção 4.4.1.2. A redução do Se foi efetuada com a mistura NaBr/ácido sulfâmico e então, o Se determinado por HG AAS.

Após foi realizada a dosagem de Se total nas amostras, utilizando a técnica de HG AAS, para comparação do teor de Se entre os grupos de aves tratados com Se inorgânico e Se orgânico.

4.7. Análise de soro sanguíneo – Experimento 3

As amostras de soro sanguíneo utilizadas para o estudo da hidrólise e desproteíntização com ácido tricloroacético (TCA) foram doadas de experimentos realizados com animais de laboratório e que estavam congeladas.

4.7.1. Desproteíntização com ácido tricloro-acético (TCA)

A desproteíntização com TCA foi investigada como técnica de pré-tratamento das amostras de soro, para posterior quantificação do Se não ligado as proteínas, através da determinação de Se total e dos selenoaminoácidos, SeM e SeC.

Testaram-se dois procedimentos diferentes. O primeiro procedimento consistiu da adição de 300 µL de TCA 10% (m/v) à 725 µL de soro, com agitação vigorosa em vórtex por 60 segundos, seguidos de repouso de 30 minutos. No segundo procedimento, utilizou-se 1 mL de solução de TCA 1 % (m/v) e 1 mL de amostra de soro, com aquecimento em microondas (MO), utilizando um programa de temperatura.

O programa foi desenvolvido para promover uma ação gradual das MO sobre a amostra, evitando aquecimento e pressão interna exagerados, que acarretaria em perdas de amostra. As etapas do programa testado estão descritas na tabela 3. Entre cada etapa do programa, a amostra foi resfriada num banho de gelo.

Tabela 3 – Programa de MO para abertura das amostras.[99]

Etapa	Repetições	% Potência	Potência (W)	Tempo (s)
1	5	10	174	10
2	5	20	244	5
3	5	30	296	5
4	5	40	348	5
5	5	50	383	5
6	5	60	453	5
7	5	70	522	5
8	5	80	557	5
9	5	90	610	5
10	5	100	749	5

As amostras foram submetidas individualmente à irradiação de MO. Após ambos os procedimentos, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos.

A concentração de Se total após os procedimentos foi determinada por GF AAS, utilizando como referência a própria amostra, a qual foi diluída 1:2 para determinação da concentração de Se. Após, utilizou-se o sistema de HPLC-UV, com derivação pré-coluna com FMOC, para avaliar o efeito do TCA na determinação das espécies de SeM e SeC, utilizando com referência a amostra fortificada pela adição do padrão, na concentração de 32 mg/L.

4.8. Selênio na nutrição parenteral

4.8.1. Animais

Utilizaram-se quinze coelhos machos (New Zealand), com 200 dias de vida e média de peso de 3 kg, provenientes do Biotério Central da UFSM. Os animais foram divididos em três grupos, previamente pesados e marcados. A escolha por coelhos se deve ao volume de sangue necessário para obtenção dos resultados.

4.8.2. Tratamentos

4.8.2.1. Administração aguda de Se (IV) e SeM – Experimento 4

O primeiro grupo foi o controle (G1), com três animais, que recebeu apenas soro fisiológico. O segundo e o terceiro grupo (G2 e G3) receberam respectivamente Se inorgânico, na forma de selenito de sódio, e orgânico, como selenometionina, tendo seis animais em cada grupo. A concentração foi 0,2 mg de Se por kg de peso corpóreo.

A administração foi realizada parenteralmente, utilizando a veia da orelha. Os respectivos sais foram pesados e dissolvidos em soro fisiológico estéril, na concentração de 1000 mg/L de Se, levando-se em consideração o peso de cada animal para a diluição da dose. A dose, preparada no dia do experimento, foi administrada em injeções com volume de 1,5 mL para cada animal. Todo o procedimento de preparo das doses foi realizado em câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação microbiológica, mantida sob refrigeração até a injeção.

A coleta do sangue foi realizada nos tempos de 15, 30, 60 e 120 (± 2) minutos após a administração em cada animal, por punção cardíaca ou da veia jugular, uma vez que o tempo é fator limitante na coleta. As amostras coletadas foram mantidas sob refrigeração em banho de gelo até o processamento no laboratório.

As amostras de sangue (± 2 mL) foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos. Após a separação do soro, estes foram congelados (-20°C) até a determinação do Se total e determinação dos selenoaminoácidos, SeM e SeC. Uma semana anterior ao tratamento, foi coletado o sangue dos animais de todos os grupos, para obter os valores basais para determinação de Se total.

A concentração de Se total foi determinada nas amostras de soro por GF AAS. As amostras foram diluídas 1:1 anteriormente à determinação.

A análise de especiação dos selenoaminoácidos no soro, SeM e SeC, foi realizada por HPLC, com detecção por fluorescência, utilizando derivação pré-coluna com OPA, após o procedimento da hidrólise com HCl 6 mol/L, como descrito nas seções 4.5.5 e 4.4.3.3, respectivamente.

4.8.2.2. Administração sub-crônica de Se (IV) e SeM – Experimento 4

Este experimento iniciou-se 15 dias após a administração de selênio na avaliação cinética, utilizando os mesmos animais, visando à recuperação dos mesmos devido ao estresse que a coleta de sangue causa.

O tratamento procedeu como no estudo anterior. As doses utilizadas, porém, foram menores, na concentração de 0,1 mg de Se por kg de peso corpóreo. O grupo controle, G1 e os grupos G2 e G3 receberam soro fisiológico, selenito de sódio e selenometionina, respectivamente, por um período total de seis semanas. Os animais foram pesados semanalmente para corrigir a dose semanal, como também para avaliação do peso corporal, um indicador de toxicidade sistêmica.

A concentração utilizada de selênio neste estudo foi calculada a não exceder a dose letal D.L. 50 de coelhos, que varia entre 1 e 3 mg/kg de massa corpórea [100].

A administração das injeções foi por meio intravenoso, através da veia da orelha. Os respectivos sais foram pesados e dissolvidos em soro fisiológico estéril, na concentração de 1000 mg/L de Se. A dose foi preparada no dia da injeção em volume de 1,5 mL. Todo o procedimento de preparo das doses foi realizado em câmara de fluxo laminar para evitar a

contaminação microbiológica. A administração foi realizada três vezes por semana, em dias intercalados. Após quatro dias da última administração, os animais sofreram eutanásia.

No estudo foram administrados como anestésicos a xilasina (Rompum) 2%, na dosagem de 5 mg/kg em associação com Ketamina 10%, na dosagem de 30 mg/kg. A administração da mistura dos anestésicos foi intramuscular.

A coleta dos tecidos foi realizada com material cirúrgico. Os tecidos ensaiados foram: rim, fígado, cérebro, coração e músculo, bem como os fluídos biológicos sangue e urina, sendo mantidos em banho de gelo até o processamento no laboratório.

Os tecidos fígado, rim, cérebro, coração, baço e tireóide foram imediatamente pesados após a coleta e separados em porções, para avaliação dos parâmetros toxicológicos. Além destes, o músculo também foi ensaiado para determinação de selênio total.

As amostras de sangue (\pm 5 mL) foram coletadas por punção cardíaca. No laboratório, foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos. Após a separação do soro, estes foram congelados (- 20°C) até a determinação do Se total, dos selenoaminoácidos, SeM e SeC e parâmetros toxicológicos.

As amostras de urina (em torno de 10 mL) foram obtidas por punção na bexiga. Estas foram acidificadas, com ácido acético 1:10 (v/v), e armazenadas no freezer (-20°C) até a análise.

Os tecidos foram lavados com água ultra-pura, para remoção de sangue remanescente no tecido, secos com uma gaze limpa, e, então, triturados. Uma porção de 0,5 g do tecido foi pesada em balança analítica de precisão. Após secagem das amostras na estufa, em tubos de vidro previamente descontaminados, e mineralização com HNO₃ e HClO₄, conforme descrito na seção 4.4.1.2., as amostras sofreram etapa de pré-redução com ácido sulfâmico e NaBr. A concentração de Se total foi realizada por HG AAS. As amostras de urina sofreram o mesmo tratamento para determinação de Se total, sendo tomado volumes de 0,5 mL para o procedimento.

A determinação de Se total nas amostras de soro foi realizada por GF AAS. Para isso foi necessário fazer diluição prévia da amostra, na proporção 1:2 com água ultra-pura.

4.8.2.3. Avaliação dos parâmetros toxicológicos

As amostras de plasma sanguíneo foram obtidas por centrifugação a 2000 x g por 10 minutos, sendo o plasma hemolisado descartado. Os tecidos fígado, rim, cérebro e baço foram homogeneizados em 10 volumes de solução de Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 x g à 4°C por 10 minutos e a fração de sobrenadante (S₁) foi utilizada para os ensaios *ex vivo*.

Foram utilizadas as enzimas do plasma AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) como marcadores bioquímicos para avaliação de danos hepáticos. Os ensaios foram realizados com kits comerciais. LDH (lactato desidrogenase) foi utilizada como marcador bioquímico de dano tecidual.

A função renal foi investigada usando um kit comercial pela determinação da uréia e a creatinina plasmática.

A concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol foram também avaliados de acordo com Fossati e Príncipe [101].

O índice de peroxidação lipídica foi determinado pelas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) Na fração sobrenadante (S₁) de fígado, rim, cérebro e baço, conforme Ohkawa [102]. As amostras foram incubadas por 120 minutos à 95°C. A quantidade de TBARS produzida foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 532 nm, usando MDA como padrão externo.

A atividade de δ -ALA-D do fígado, rim, cérebro, e baço foi testada conforme o método de Sassa pela medida da razão da formação do produto porfobilinogênio (PGB) [103]. A reação foi iniciada pela adição do substrato (ALA) e mantida à 37°C por 60 minutos. O produto de reação foi determinado espectrofotometricamente utilizando comprimento de onda de 555 nm, usando o reagente de Erlich modificado.

A atividade Na⁺, K⁺-ATPase foi investigada como parâmetro de estresse oxidativo. Imediatamente após a eutanásia, o cérebro foi removido e o homogeneizado preparado com tampão Tris-HCl 0,05 mol/L (pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado, sendo o sobrenadante utilizado para o ensaio. A mistura de reação para a atividade Na⁺, K⁺-ATPase continha 3 mmol/L de solução de MgCl₂, 125 mmol/L de NaCl, 20 mmol/L de KCl e Tris-HCl 50 mmol/L

(pH 7,4), em um volume final de 500 μ L. A reação foi iniciada pela adição de ATP na concentração final de 3 mmol/L. O grupo controle foi investigado nas mesmas condições com a adição de 0,1 mmol/L de ouabaina. A atividade Na^+ , K^+ -ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios. O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi determinado pelo método de Fiske & Subbarow.

A determinação de ácido ascórbico no fígado, rim, cérebro e baço foi realizada como descrito por Jacques-Silva. [104]. As proteínas (tecidos) foram precipitadas em 10 volumes de uma solução ácido tricloroacético 4%, em banho de gelo. Uma alíquota de 300 μ L de amostra em um volume final de 1 mL de solução foi incubada à 38°C por 3 horas, sendo então 1 mL de H_2SO_4 65% (v/v) adicionado ao meio. O produto de reação foi determinado utilizando o reagente de cor contendo dinitrofenil hidrazina 4,5 mg/mL e CuSO_4 0,075 mg/mL.

4.8.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a ferramenta “ANOVA”, seguindo o teste de “multiple-range” de Duncan quando apropriado. As diferenças entre os grupos são consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da metodologia para a quantificação de selênio e análise de especiação

5.1.1. Espectrometria de absorção atômica

5.1.1.1. Forno de grafite

As medidas de Se tanto no meio aquoso como no meio orgânico foram testadas, uma vez que o objetivo deste trabalho é, além de determinar a concentração de Se total nos tecidos (músculo e pele) após a digestão (meio aquoso), verificar se o Se está acumulado na gordura, extraída pelo extrato orgânico (ver Figuras 8 e 9).

Níquel, cobre, paládio e magnésio foram investigados como modificadores químicos para determinação de Se tanto em solução aquosa como no meio orgânico por GF AAS. Todas as espécies de Se incluídas nesta investigação foram testadas, isto é, Se (IV), SeM e SeC. Estes resultados preliminares mostraram que solução de nitrato de níquel, na concentração de 2,5 g/L, promoveu a melhor resposta para determinação de Se, tanto no meio aquoso como no meio orgânico. Contudo, para as medidas feitas na presença dos ácidos usados para a digestão das amostras (resíduo dos tecidos e pele) o modificador não foi capaz de minimizar as interferências. Embora todos os tratamentos produzissem soluções límpidas, não foi possível a determinação direta de Se por GF AAS nestas amostras, uma vez que valores muito elevados de background.

As curvas de pirólise a atomização são mostradas na Figura 7. Não houve diferença significativa nas medidas tanto para a solução aquosa como para a mistura dos solventes (4:1 metanol:diclorometano), e também para as diferentes espécies de Se, uma vez que as curvas são

similares, para o mesmo programa de temperatura. O programa utilizado para as medidas por GF AAS está listado na Tabela 2.

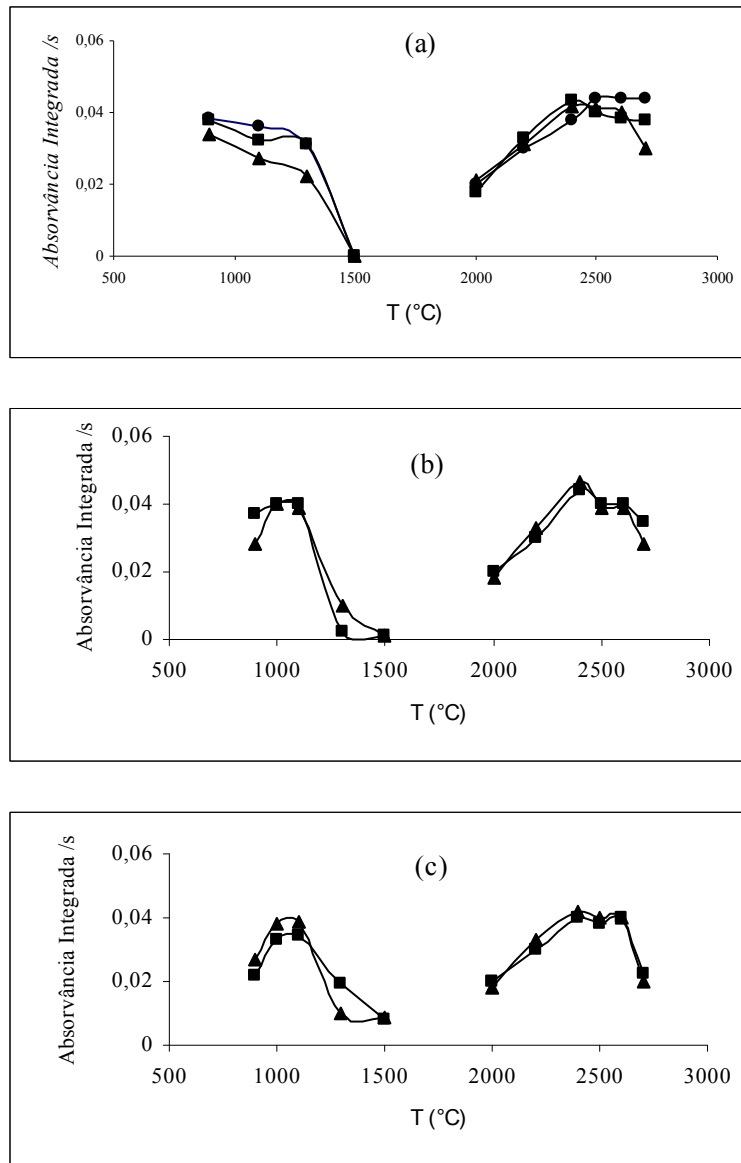


Figura 7 – Curvas de pirólise e atomização de Se IV (●), SeM (■) e SeC (▲) (1 ng de Se) em água (a) e no extrato orgânico do músculo (b) e pele (c). Temperatura de atomização para curvas de pirólise: 2600 °C; Temperatura de pirólise para curvas de atomização: 1100 °C. Modificador: NiNO₃ 2,5 g/L

Para testar a precisão da medida de Se na extração da gordura um experimento de recuperação foi realizado pela fortificação com as espécies de Se inorgânico e orgânico, separadamente, no extrato orgânico. Os resultados mostram que é possível determinar ambas as espécies por GF AAS, uma vez que foram obtidas recuperações entre 94 e 99%.

5.1.1.2. Geração de hidretos

Como o objetivo deste trabalho é a determinação de Se em tecido animal, um dos primeiros parâmetros investigados na determinação de Se por geração de hidretos foi a avaliação da possível interferência causada por íons Cu, Zn, Fe e Cr eventualmente presentes em amostras de tecido animal. Sabe-se que estes elementos são potenciais interferentes na geração de H_2Se [47].

Os níveis de concentração destes interferentes foram selecionados de maneira a representar o esperado em tecido animal. Os experimentos de recuperação feitos na presença de Zn, Fe (10 mg/L), Cu, Cr (1 mg/L) mostraram que estes metais não interferem nas medidas de Se por HG AAS, nos níveis de concentração do experimento.

A otimização da determinação de Se por geração de hidretos está associada às etapas preliminares de conversão das diferentes espécies de Se existentes na amostra a Se (IV), e à interferência causada pela matriz na geração do hidreto. Desta forma, a otimização da determinação do Se por geração de hidretos está diretamente vinculada aos tratamentos empregados na digestão da matriz orgânica da amostra. Todos os testes foram executados utilizando o músculo e a pele de frango. Foram testados vários procedimentos de digestão incluindo a separação prévia da fração de gordura do tecido e a desidratação do tecido previamente à digestão ácida.

Todas as etapas de cada procedimento de digestão estão resumidas na Figura 8 e os procedimentos de pré-redução na Figura 9.

Como pode ser observado na figura 8, enquanto 10 mL da mistura dos ácidos ($HNO_3/HClO_4$) foram necessários para decomposição de 0,5 g de amostra (músculo ou pele)

sem a etapa de secagem, 5 mL foram utilizados após secagem das mesmas, e apenas 3 mL após a extração da gordura.

Uma observação importante sobre a periculosidade do ácido perclórico (HClO_4) se deve ao fato do reagente ser considerado explosivo. Embora a mistura de 70% ácido/ água não seja explosiva, o uso do ácido perclórico leva freqüentemente á formação de percloratos, que são altamente explosivos.

Considerando a determinação por HG AAS, a Tabela 6 mostra que resultados satisfatórios são obtidos tanto com irradiação UV quanto com tratamento com NaBr na presença de ácido sulfâmico como procedimentos de pré-redução. Apesar do papel do ácido sulfâmico nesta etapa estar muito mais relacionado à eliminação de óxidos de nitrogênio gerados pela decomposição do ácido nítrico que a redução do Se VI, é provável que ele tenha alguma influência neste processo [48]. A recuperação de 64-65% das amostras fortificadas após o procedimento de digestão corresponde somente à forma inorgânica, uma vez que a mistura NaBr/ác. Sulfâmico não é capaz de converter compostos orgânicos de Se em inorgânicos.

5.1.1.3. Avaliação do teor de Se em aves

Com relação à distribuição de Se, a Tabela 4 mostra a quantidade de Se no músculo e na pele de três amostras diferentes de peito de frango. A tabela também mostra o selênio encontrado na gordura extraída e no resíduo sólido. Os resultados mostram que mais de 80% do Se está presente no resíduo sólido do tecido (músculo ou pele) e menos de 20% na fração de gordura destes tecidos.

Tabela 4 – Teor de selênio encontrado na gordura e no resíduo das amostras após a extração da gordura e digestão ácida (pré-redução com ác. sulfâmico/NaBr)

Amostra	Tecido	Extração da gordura				Resíduo			
		Massa (g)	µg Se	RSD%	%**	Massa (g)	µg Se	RSD%	%
*									
1	Músculo	0,0147	0,01	0,5	7	0,5431	0,13	8,5	93
2	Músculo	0,0154	0,04	0,4	19	0,4909	0,17	3,4	81
3	Músculo	0,0152	0,05	0,9	14	0,5106	0,32	7,6	86
1	Pele	0,0899	0,01	1,3	9	0,4923	0,10	9,3	91
2	Pele	0,0849	0,01	0,8	5	0,4565	0,21	6,5	95
3	Pele	0,0965	0,02	1,0	14	0,4416	0,12	3,3	86

*RSD=Desvio padrão relativo para n=3; **Percentual de Se na amostra

O balanço da distribuição do Se nas três amostras de peito de frango, é demonstrado na Tabela 5. Considerando que a pele representa 10% do total de massa da amostra (sem ossos), a quantidade de Se encontrada neste tecido é significativa. Calculando-se a quantidade relativa de Se em cada parte, após o balanço das frações de massa, aproximadamente 59% do total de Se foi encontrado no músculo, enquanto que 41% foram encontrados na pele.

Tabela 5 – Distribuição do Se entre pele e músculo em três amostras diferentes

Amostra	Pele			Músculo		
	Massa (g)	µg Se	%	Massa (g)	µg Se	%
1	0,5822	0,11	44	0,5571	0,14	56
2	0,5414	0,22	51	0,5063	0,21	49
3	0,5381	0,14	28	0,5258	0,37	72
Média = 41			Média = 59			

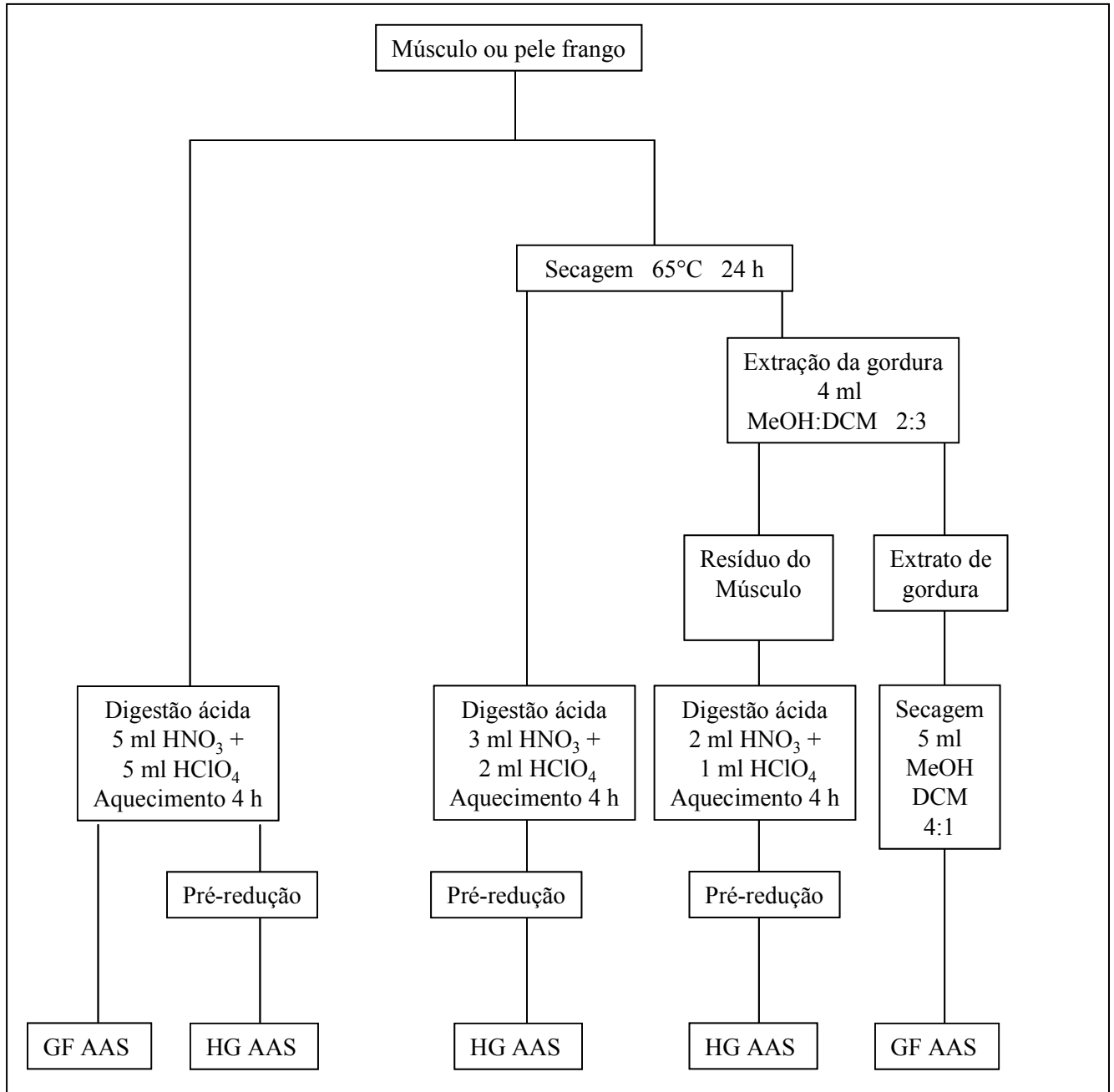


Figura 8 – Etapas dos procedimentos de digestão ácida para determinação de Se total por GF AAS e HG AAS

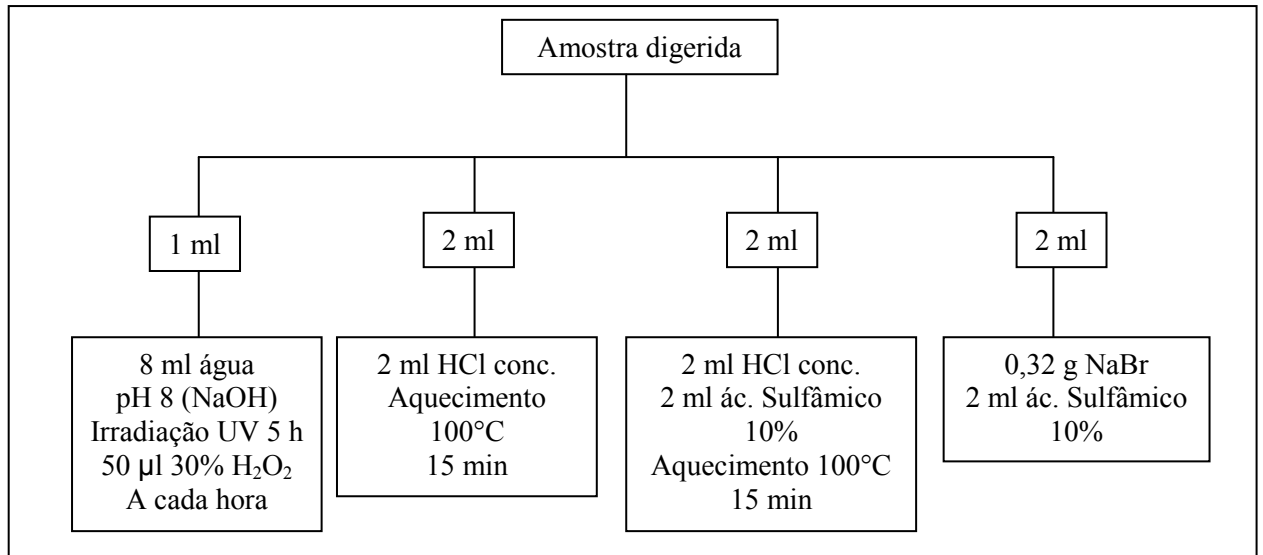


Figura 9 – Procedimentos de pré-redução do Se VI para determinação de Se total por HG AAS

A Tabela 6 mostra que os resultados das etapas de pré-redução com HCl, mesmo na presença de ácido sulfâmico, não foram satisfatórios. As baixas recuperações das amostras fortificadas após a digestão podem estar associadas à não-mineralização dos compostos orgânicos de Se, enquanto que para as amostras fortificadas previamente ao procedimento de digestão, os baixos valores de recuperação se devem à incompleta redução.

A fortificação das amostras apenas com espécies inorgânicas de Se (antes e após a digestão) também leva a valores baixos de recuperação. Estes resultados confirmam a incompleta redução de Se IV para Se IV para as amostras fortificadas antes da digestão.

Tabela 6 – Comparação dos diferentes tratamentos para amostras fortificadas antes e após o procedimento de digestão. O procedimento de digestão foi realizado após a secagem e extração da gordura do músculo e pele. O resultado é expresso em percentual de recuperação

Tratamento	Tecido	HG AAS	
		Fortificação pré digestão* (%)	Fortificação pós digestão* (%)
Irradiação UV (4 h)	Músculo	96	97
	Pele	92	89
HCl	Músculo	62	35
	Pele	62	39
Ácido Sulfâmico + HCl	Músculo	82	47
	Pele	70	55
Ácido Sulfâmico + NaBr	Músculo	96	64
	Pele	99	65

* corresponde à soma: Se tecido + Se gordura

Os melhores resultados para a etapa de pré-redução foram obtidos com irradiação UV e também NaBr/ác. sulfâmico. A irradiação UV, porém, requer irradiação da amostra por no mínimo 4 horas, mesmo na presença de H₂O₂. Tempos menores de irradiação (até 3h) não foram suficientes para recuperar todo o Se das amostras fortificadas, provavelmente devido à dificuldade de reduzir as espécies orgânicas de Se. Na Figura 10 é possível verificar que as baixas recuperações podem estar associadas com a baixa razão de conversão das espécies na ausência de H₂O₂ e insuficiente tempo de irradiação.

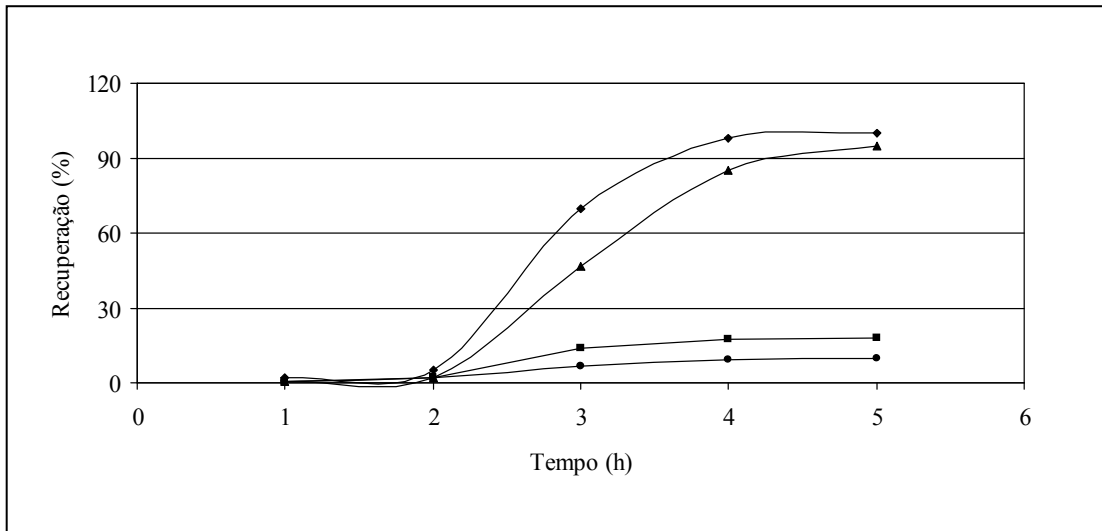


Figura 10 – Recuperação do Se das amostras do músculo após etapa de pré-redução de Se VI com irradiação UV com e sem adição de H₂O₂. Fortificação pré-digestão com H₂O₂ (◇), fortificação pré-digestão (■), fortificação pré-irradiação UV com H₂O₂ (▲), fortificação pré-irradiação UV (●). Determinação feita por HG AAS

Devido aos resultados satisfatórios com a irradiação UV e com a mistura NaBr/ác. sulfâmico, outro experimento foi realizado: o procedimento total de digestão sem o uso de ácido perclórico. Os resultados, contudo, mostraram que este reagente é importante para a decomposição total da amostra. Os baixos valores de recuperação podem estar associados não apenas a mineralização incompleta da amostra, como também dos compostos orgânicos de Se [58, 105 - 106]. O tratamento com ácido perclórico seguido de ácido sulfâmico, contudo, não melhorou a resposta para as medidas por GF AAS, uma vez que ainda foram observados valores elevados de background.

5.1.1.4. Ensaio de recuperação para avaliação da determinação de Se total por GF AAS e HG AAS

A investigação da extração da gordura teve dois objetivos: verificar se o Se não é acumulado nesta parte do tecido e, se não, a possibilidade de fazer a digestão utilizando um volume menor de ácidos. A determinação de Se por GF AAS na fração orgânica foi realizada sem interferências. Uma vez que nesta fração deverão estar presentes compostos orgânicos de Se, não foi necessário determinar Se nesta fração por HG AAS. Como pode ser observado na Figura 11, o Se foi parcialmente recuperado nesta fração. Isso se deve ao fato de SeM e SeC serem solúveis em solventes orgânicos e então serem recuperadas parcialmente nesta fração quando as amostras são fortificadas antes do procedimento de digestão. Do mesmo modo, para as amostras fortificadas apenas com Se inorgânico, este não foi determinado no extrato orgânico.

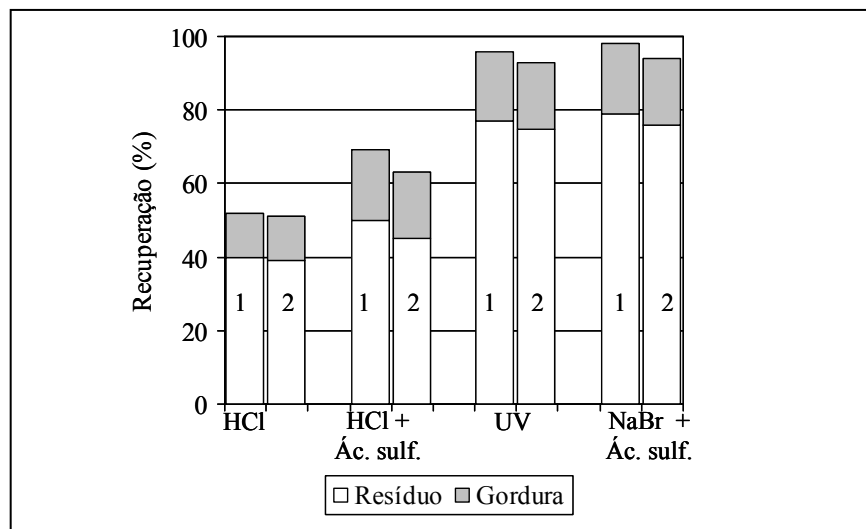


Figura 11 – Recuperação de Se das amostras fortificadas antes da digestão e antes da extração da gordura. O Se no extrato de gordura foi determinado por GF AAS e no resíduo por HG AAS após pré-tratamentos de redução: músculo (1) e pele (2)

Após as investigações preliminares, conclui-se que o tratamento da amostra mais adequado para determinação de Se em amostras biológicas incluiu a decomposição com a mistura $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, eliminação dos óxidos de nitrogênio com ácido sulfâmico e etapa de pré-redução com NaBr. Resultados satisfatórios da etapa de pré-redução foram obtidos tanto com irradiação UV como com a mistura NaBr e ácido sulfâmico, optou-se, então, por utilizar no

presente estudo o segundo procedimento, uma vez que a irradiação UV requer um consumo maior de tempo e necessidade de ajuste do pH.

5.1.1.5. Figuras de mérito da espectrometria de absorção atômica

As equações de regressão linear e coeficientes de correlação para soluções aquosas e metanólicas, sob as condições analíticas para determinação de Se por GF AAS e HG AAS, foram $y = 6,0 \cdot 10^{-3} x - 8,0 \cdot 10^{-4}$ e $y = 2,0 \cdot 10^{-2} x - 7,3 \cdot 10^{-3}$, onde “y” corresponde à absorvância e “x” à concentração em $\mu\text{g/L}$, e 0,9922 e 0,9990, respectivamente.

Os limites de detecção das medidas por ambas as técnicas foram calculados a partir do branco das amostras, usando o critério de três vezes o desvio padrão. O Se foi determinado na extração da gordura, digestão com $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, e pré-redução com NaBr/ácido sulfâmico na fração de solvente orgânico e após a digestão por GF AAS e HG AAS, respectivamente. Limites de detecção encontrados foram 5 ng em um volume de amostra de 5 mL ou 1 $\mu\text{g/L}$ para determinação por GF AAS e 6 ng em um volume final de 20 mL de amostra digerida ou 0,6 $\mu\text{g/L}$ para determinação por HG AAS.

O desvio padrão relativo para 6 replicatas realizadas com a mesma solução padrão (20 $\mu\text{g/L}$) foi 8,7% para as medidas por GF AAS. Os valores de recuperação ficaram entre 89 e 99%. Estes resultados mostraram a repetibilidade do desempenho do método proposto. A precisão obtida na análise de três diferentes amostras é demonstrada em termos do desvio padrão na Tabela 4. A média do desvio padrão relativo foi aproximadamente 6,5% na fração orgânica (GF AAS) e 0,8% na fração do resíduo digerido (HG AAS).

5.1.2. Cromatografia iônica

Dentre as técnicas disponíveis para a determinação simultânea dos aminoácidos, como a cromatografia e a eletroforese capilar, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a que

oferece o maior número de opções instrumentais [107]. Diferentes fases estacionárias como fase reversa e troca iônica podem ser empregadas e misturas complexas de aminoácidos podem ser separadas, satisfatoriamente, em torno de uma hora.

A HPLC permite também o uso de diferentes sistemas de detecção. Dependendo dos aminoácidos, detectores UV e eletroquímicos podem ser usados diretamente. Praticamente todos os aminoácidos podem ser determinados simultaneamente, empregando reagentes de derivação como a ninidrina e FMOC, com detecção fotométrica, ou os reagentes OPA e dansil, com detecção fluorimétrica [108].

Neste trabalho, fez-se um paralelo das técnicas de detecção espectrofotométrica, utilizando o reagente FMOC, com derivação pré-coluna, e fluorescente pela derivação pós-coluna como OPA, na aplicação para as espécies de selenoaminoácidos SeM e SeC.

Preliminarmente ao estudo da separação dos selenoaminoácidos por HPLC e derivação com o-ftaldeído (OPA-SH), fez-se as medidas espectrofotométricas dos mesmos. Como pode ser observado, na Figura 12, a reação dos selenoaminoácidos SeM e SeC ocorre e tem comprimento de absorção máximo em 335 nm.

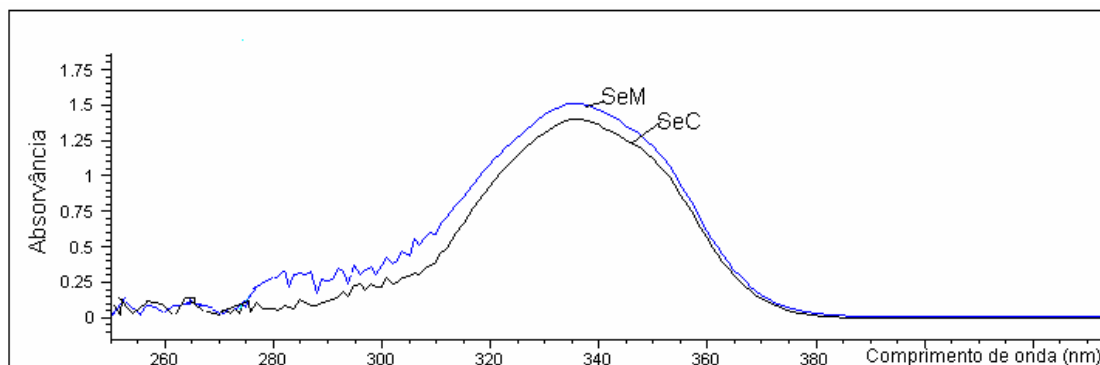


Figura 12 – Espectro de absorção dos selenoaminoácidos SeM e SeC (400 mg/L) com OPA-SH

Para a otimização da separação dos selenoaminoácidos foram preparadas soluções analíticas, as quais foram injetadas separadamente e observado o tempo de retenção de cada composto. Desse modo, estabeleceram-se as melhores condições cromatográficas para a separação e detecção dos analitos, as quais estão demonstradas na Tabela 7.

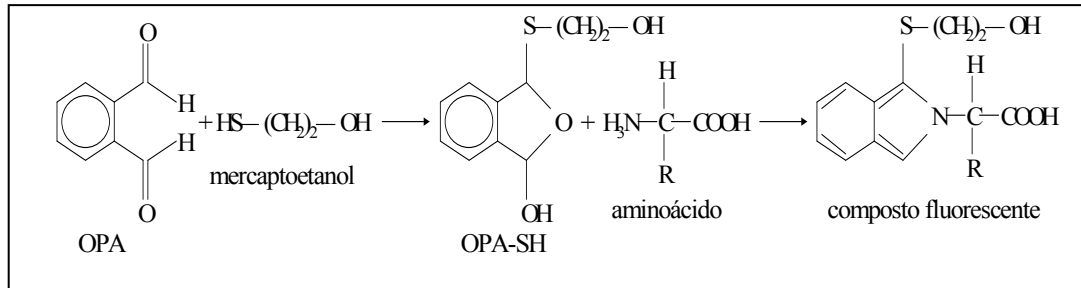
Tabela 7 – Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação das espécies de selenoaminoácidos, utilizando OPA como derivatizante

Coluna analítica	AminoPac PA1 Dionex (250 x 4 mm de d.i.; 9 µm)
Fase móvel	I: NaOH 200 mmol/L II: Acetato de sódio 700 mmol/L
Vazão da fase móvel	0,6 mL/min
Detector	Fluorescência
Comprimento de onda	330 nm (Excitação) e 455 nm (Emissão)
Alça de injeção	25 µL

Os sinais analíticos dos respectivos aminoácidos foram identificados de duas maneiras: primeiro injetando, separadamente, um a um cada aminoácido no sistema sob as mesmas condições e observando o tempo de retenção, e segundo, fazendo uma adição de padrão em uma mistura dos compostos metionina, selenometionina e selenocistina, sendo que a injeção do aminoácido Met foi somente para verificar a existência de interferência no composto análogo de Se, e observando o aumento de sinal do respectivo analito.

Embora os aminoácido SeC tenha apresentado absorção no comprimento de onda de 335 nm como demonstra o espectro da Figura 9, somente os sinais da Met e da SeM foram observados e tiveram suas áreas aumentadas com a concentração. Para a SeC, observou-se o sinal luminescente, porém este não foi reprodutível em relação ao aumento da concentração. Para contornar a não-reprodutibilidade da determinação de SeC, investigou-se a reação com ácido iodo-acético, que será descrita posteriormente.

A formação da solução de derivação OPA-SH e a reação de derivação que resulta no composto fluorescente podem ser observadas na Figura 13.



Figur 13 – Reações da derivação dos aminoácidos com o reagente de derivação OPA-SH (*o*-ftaldeído)

A derivação pós-coluna com OPA-SH pode ser considerada uma das melhores opções para a determinação dos aminoácidos [83] porque o reagente *o*-ftaldeído é estável à temperatura ambiente e a reação com os aminoácidos ocorre rapidamente, dispensando aquecimento. A reação é aproximadamente 10 vezes mais rápida se comparada com outros reagentes de derivação como por exemplo a ninidrina. Porém, estudos mostram que os aminoácidos sulfidrílicos como a homocisteína, cisteína e cistina produzem um sinal luminescente fraco. Para aumentar o sinal fluorescente destes aminoácidos é necessário proceder um primeira reação com o ácido iodo-acético (AIA), antes de reagir os mesmos com o *o*-ftaldeído [92].

Uma vez que o objetivo da investigação cromatográfica era determinar os aminoácidos de selênio, compostos análogos aos aminoácidos com enxofre na estrutura, procedeu-se a reação dos mesmos com AIA previamente a reação com OPA-SH.

5.1.2.1. Estudo da influência da concentração do ácido iodo-acético (AIA) na determinação da SeC e SeM

Foram realizados dois procedimentos para verificação da influência do AIA na determinação da SeC e SeM e posterior derivação com OPA-SH. O primeiro consistiu da

injeção da SeM e SeC, separadamente, sem coluna cromatográfica, afim de verificar apenas a resposta do detector no sinal luminescente, nas concentrações de 0,8, 1,6 e 8 mg/L.

Os resultados mostraram que ocorreu aumento da área do pico da SeC, com aumento da concentração do AIA, como pode ser observado na Figura 14. A concentração do ácido iodo-acético escolhida para determinação da SeC foi 0,2 mol/L, uma vez que concentrações inferiores poderiam acarretar na diminuição do sinal da SeC, com conseqüente perda de sensibilidade.

O AIA não pode ser utilizado para determinação da SeM, uma vez que o sinal da SeM diminuiu com o aumento da concentração do reagente, nos comprimentos de onda investigados. A determinação simultânea utilizando AIA acarretaria em perda de sensibilidade de ambos os analitos (SeM e SeC) porque seria necessário concentrações inferiores a 0,05 mol/L do reagente. Realizou-se, então, a injeção para determinar cada aminoácido de Se separadamente.

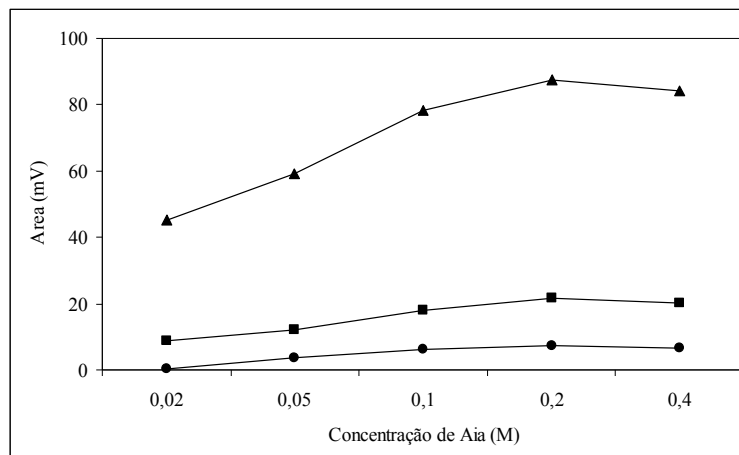


Figura 14 – Variação da área do pico da SeC 0,8 mg/L (●), SeC 1,6 mg/L (■) e SeC 8 mg/L (▲) em função da concentração do ácido iodo-acético (AIA), em mol/L

Uma vez que ocorre aumento de sinal da SeC somente com a presença de ácido iodo-acético, fez-se um segundo experimento, com a injeção de SeC no sistema, nas concentrações de 0,8, 1,6 e 4,0 mg/L, utilizando coluna aniônica Aminopac PA1 para verificação do tempo de retenção deste analito. Este resultado se mostrou satisfatório, uma vez que se obtiveram como

fator de correlação e equação da reta para a SeC, o valor de 0,9980 e $y = 19,8x - 83,64$, respectivamente.

Os tempos de retenção dos analitos SeM e SeC obtidos pela injeção separada dos selenoaminoácidos, SeM e SeC estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Tempo de retenção dos aminoácidos SeM e SeC com sistema HPLC e detecção fluorescente com derivação pós-coluna com OPA-SH

Analito	Tempo de retenção (minutos)
Selenometionina	15,0
Selenocistina	23,7

A reação do aminoácido com o ácido iodo-acético (AIA) pode ser observada na Figura 15:

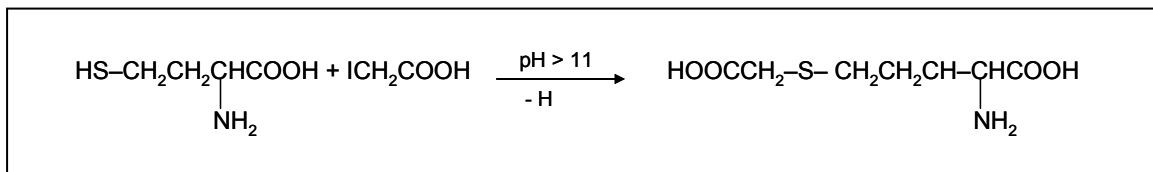


Figura 15 – Reação geral de reação de aminoácidos com ácido iodo-acético (AIA)

5.1.2.2. Determinação simultânea do SeM e SeC

Uma vez que o AIA é utilizado apenas para proteger o grupos tióis do aminoácido SeC, investigou-se a possibilidade de determinar simultaneamente os selenoaminoácidos, com reação *online* após a saída da coluna analítica. Isto foi realizado colocando-se um segundo reator antes da reação de derivação, sendo o reagente AIA carregado somente após a detecção da SeM, ou seja em 20 minutos.

Aminoácidos sulfidrílicos como a homocisteína e cisteína podem reagir com OPA pelo mesmo mecanismo que o grupamento tiol do reagente mercapetanol reage. Estudos têm demonstrado que cisteína produz um composto fluorescente fraco com OPA-2-ME, comparado às outras amins primárias, uma vez que, embora não totalmente entendido, a reação depende da presença do grupo sulfidril na molécula de cisteína. O bloqueamento dos grupos tióis, pela reação de alquilação com o AIA, vai produzir produto fortemente fluorescente [92].

A seleção do gradiente de eluição depende dos analitos a serem separados. O programa de eluição por gradiente empregado resultou uma boa relação entre resolução e tempo de corrida para os aminoácidos SeM e SeC estudados.

O sistema cromatográfico mostrou-se eficiente na separação e determinação simultânea dos aminoácidos que compõe a amostra do soro sanguíneo, após o procedimento de hidrólise ácida, sendo o gradiente de eluição necessário para que ocorresse boa resolução dos componentes da matriz e os selenoaminoácidos de interesse.

Uma coluna aniônica (Dionex) foi usada para a separação dos aminoácidos que estão como espécies aniônicas devido ao pH alcalino dos eluentes (pH 10). Assim, a separação é efetuada pelas diferenças relativas nas constantes de dissociação dos grupos amino, carboxílico e grupos substituintes (R) da cadeia de cada aminoácido. Alguns aminoácidos são separados principalmente como ânions monovalentes e outros como ânions divalentes.

Outro modo de separação é baseado na natureza hidrofílica ou hidrofóbica relativa aos grupos R associados aos aminoácidos. Os aminoácidos mais básicos, como a histidina, geralmente eluem antes de aminoácidos mais ácidos, tais como ácido glutâmico e aspártico. Os aminoácidos hidrofílicos, como a serina, eluem antes da fenilalanina, que é mais hidrofóbica.

O sistema cromatográfico permitiu a detecção selenoaminoácidos SeM e SeC em aproximadamente 40 minutos. Em vista de suas naturezas diferentes a combinação de dois eluentes num gradiente de eluição promoveu a formação de sinais bem resolvidos.

5.1.2.3.Figuras de mérito

A calibração é um dos estágios mais importantes na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, a precisão e a exatidão podem ser comprometidas [109]. Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear é observada entre a resposta do detector e a concentração do composto em estudo.

A equação de regressão linear (equação 1) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0

A regressão linear deve também ter alto coeficiente de determinação ($r^2 > 0,999$) [110].

A linearidade de um método é a habilidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do soluto [110].

O LOD é a menor concentração da substância em análise que produz uma resposta detectável acima do nível de ruído do sistema e que o procedimento analítico pode identificar, com confiança [111]. O LOQ é a menor concentração da substância em análise que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração.

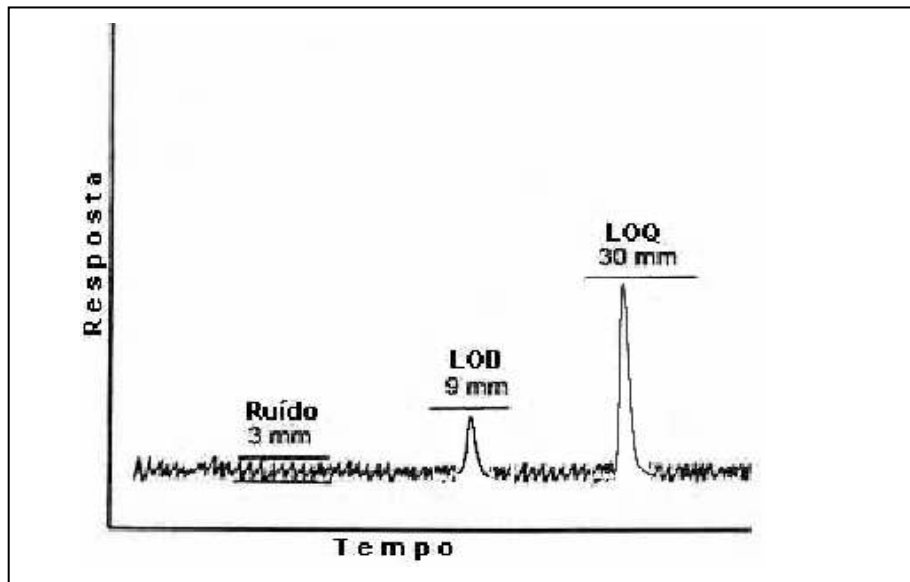


Figura 16 – Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de ruído da linha base e sinal do analito, onde: h_s = altura do pico do analito; h_n = maior desvio da linha base medido no tempo de retenção do analito; w_h = largura do pico a meia altura [112]

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e podem ser expressas por meio da repetitividade e da precisão intermediária

A repetitividade é o grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuando sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, como: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. A repetitividade é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou pela estimativa do desvio padrão absoluto (s) e pode ser representada pelo RSD.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser adicionadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está

necessariamente na mesma forma que presente na amostra. A recuperação (R) geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra. Neste trabalho, ela foi calculada pela equação (3) e é expressa em porcentagem [112]:

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C_3 = concentração adicionada.

A Tabela 9 apresenta as equações da curva analítica para os selenoaminoácidos. Analisando-se as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado uma vez que os coeficientes de correlação (r) foram todos maiores que 0,999.

Tabela 9 – Resultados obtidos para calibração e LOD e LOQ dos selenoaminoácidos com OPA

Aminoácido	Equação da reta	r	Instrumento		Método	
			LOD (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	
Selenometionina	$y = 14,86x + 3,49$	0,9995	0,002	0,005	0,02	
Selenocistina	$y = 5,24x - 4,19$	0,9983	0,005	0,009	0,03	

Os valores obtidos para a curva analítica, onde y = resposta medida (área do pico) e x = concentração, evidenciaram linearidade satisfatória na faixa entre 0,02 a 2 mg/L para a SeM e de 0,03 a 5 mg/L para SeC.

Os valores de recuperação para amostra de soro e levedura estão listados na Tabela 10, onde recuperações médias de 90 e 101% foram obtidos para as amostras de soro e 103 e 96% para as amostras de levedura para SeM e SeC, respectivamente.

Tabela 10 – Recuperação dos analitos (RSD) para os analitos SeM e SeC por HPLC-OPA-SH

Selenoaminoácido	Nível de fortificação (mg/L)	Soro		Levedura	
		Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
SeM	0,16	72,4	9,9	96,8	10,8
	0,32	92,7	2,6	95,5	2,9
	0,64	105,1	5,1	116,8	3,1
Sec	0,16	77,2	12,5	89,2	9,5
	0,32	119,4	3,7	94,5	2,8
	0,64	104,4	3,5	105,3	3,2

5.1.3. Cromatografia de fase reversa

Objetivando a aplicação de um método clássico de determinação de aminoácidos para as espécies de selenoaminoácidos, fez-se a investigação da cromatografia em fase reversa, utilizando reação de derivação pré-coluna com o 9-metilfluorenil clorofórmio, FMOC, e detecção ultravioleta.

Para a otimização da separação dos selenoaminoácidos foram preparadas soluções analíticas, as quais foram injetadas separadamente e observado o tempo de retenção de cada composto. Desse modo, estabeleceram-se as melhores condições cromatográficas para a separação e detecção dos analitos, as quais estão demonstradas na Tabela 11.

O comprimento de onda utilizado foi 307 nm devido ser aquele em que se observa, pelos espectros de absorção molecular apresentados na Figura 17, o comprimento de onda mais próximo do máximo de cada aminoácido.

Tabela 11 – Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação das espécies de selenoaminoácidos, utilizando FMOc como derivatizante

Coluna analítica	C18 Supelco (150 x 4,6 mm de d.i.; 5µm)
Fase móvel	I: 20:30:50 (v/v) – Acetonitrila:metanol:tampão acetato II: 40:10:50 (v/v) – Acetonitrila:metanol:tampão acetato
Vazão da fase móvel	1 mL/min
Detector	Espectrofotométrico – UV
Comprimento de onda	307 nm
Alça de injeção	25 µL

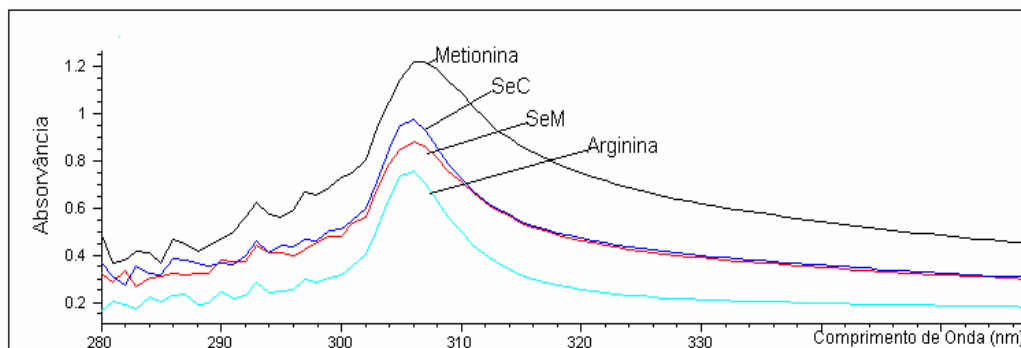


Figura 17 – Espectros de absorção molecular dos aminoácidos arginina, metionina, selenometionina e selenocistina 400 mg/L com o reagente de derivação FMOc ^(nm)

No desenvolvimento do método proposto foram testadas diferentes vazões: 0,6; 0,7; 0,8 e 1,0 mL/min. Concluiu-se que a melhor vazão a ser utilizada é de 1,0 mL/min pois permite separações com tempo de análise de cerca de 40 minutos.

Para a escolha da fase móvel, dentre as composições apresentadas no item 4.4.4, a que apresentou melhor separação dos analitos, na vazão escolhida de 1,0 mL/min, foi a de acetonitrila:metanol:tampão acetato na composição de 20:30:50 (v/v). Porém, é necessário

utilizar o modo de eluição por gradiente para aumentar a força da fase móvel e diminuir o tempo total de corrida.

Com estas condições, o perfil de um cromatograma de separação dos aminoácidos pode ser observado na Figura 18, obtido com a injeção de 25 μ L de uma solução analítica contendo 8 mg/L de cada aminoácido. A Figura 18 também mostra a injeção do branco, uma vez que o excesso de reagente FMOc embora seja extraído com o hexano, uma parte deste permanece em solução e produz um sinal no cromatograma. Este sinal pode ser identificado com a corrida do branco de derivação.

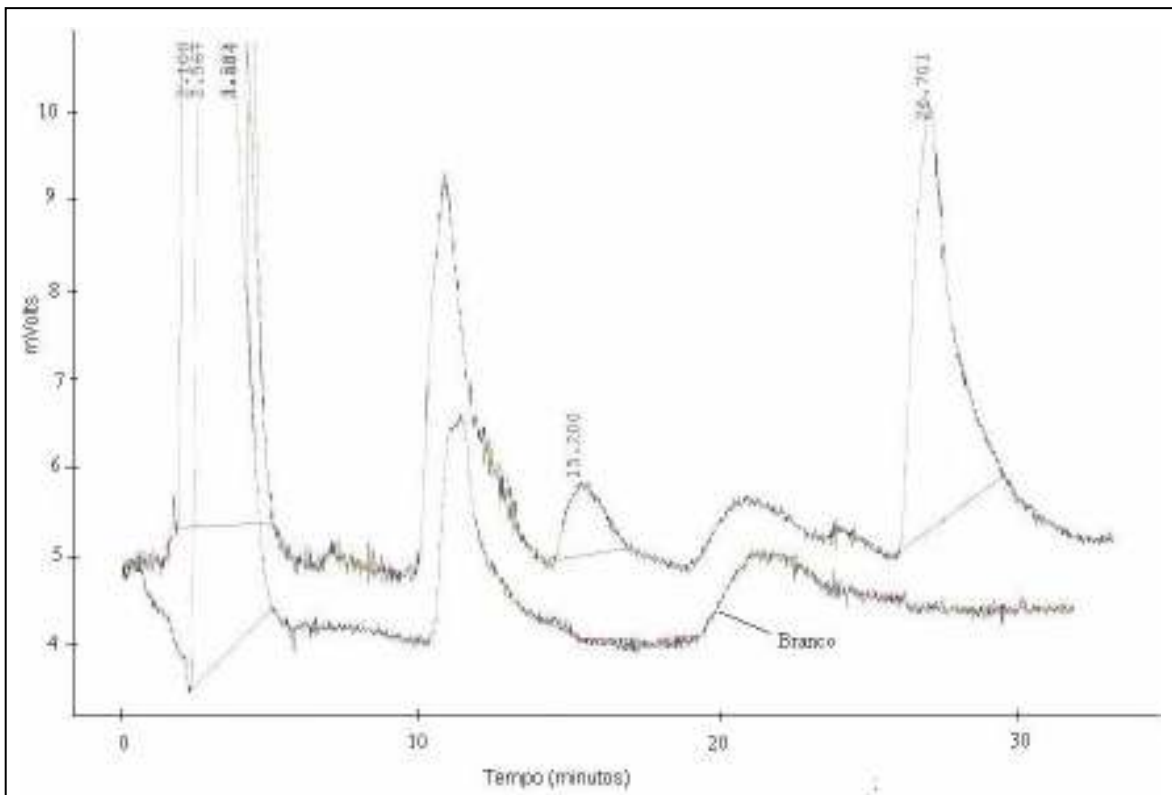


Figura 18 – Cromatograma típico da solução padrão contendo 8 mg/L dos aminoácidos selenometionina (tR 15,2 min), e selenocistina (tR 26,7 min) com derivação pré-coluna com FMOc e detecção UV (307 nm)

Os picos foram identificados com os respectivos aminoácidos de duas maneiras: primeiro injetando, separadamente, um a um cada aminoácido no sistema sob as mesmas condições e

observando o tempo de retenção, e segundo, fazendo uma adição de padrão em uma mistura dos quatro compostos e observando o aumento de sinal do respectivo analito.

Diferentes tempos de reação foram avaliados no sentido de obter maior sensibilidade, bem como diferentes concentrações do derivatizante. Testou-se a reação imediatamente, dez e trinta minutos após mistura dos reagentes (T0, T10 e T30, respectivamente), com agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos, porém antes da extração do excesso de FMOC por hexano. O resultado para os aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L) pode ser observado na Figura 19. É possível verificar, pelos resultados obtidos, que não houve diferença significativa de aumento de área com o aumento do tempo de reação com o reagente de derivação, FMOC. Deste modo, optou-se por utilizar o tempo de 1 minuto antes que fosse realizado o procedimento de extração do excesso de reagente com hexano.

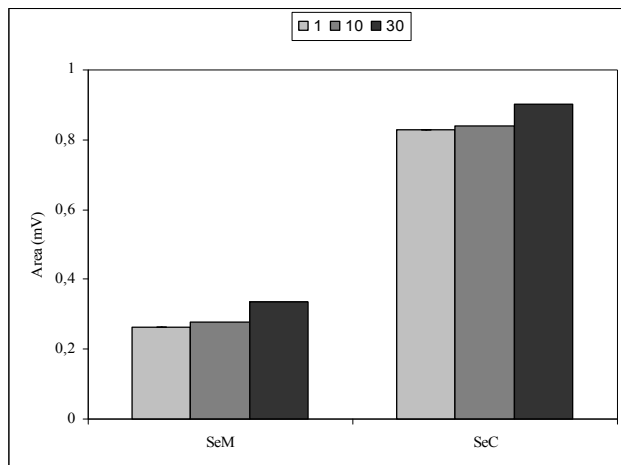


Figura 19 – Variação da área dos picos dos aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L), pelo método de HPLC-UV, em função do tempo de reação (1, 10, 30 minutos) com o derivatizante FMOC antes da extração

Após este estudo, avaliou-se a influência da concentração do reagente derivatizante nas concentrações de 3, 7,5, 15 e 30 mmol/L, injetando-se após um minuto de reação. Em todos os casos, avaliaram-se a variação da área do pico para os aminoácidos selenometionina e selenocistina, na concentração de 0,8 mg/L. Os resultados mostraram que ocorre aumento da

área do pico para os analitos investigados com o aumento da concentração do reagente de derivação, como pode ser observado na Figura 20.

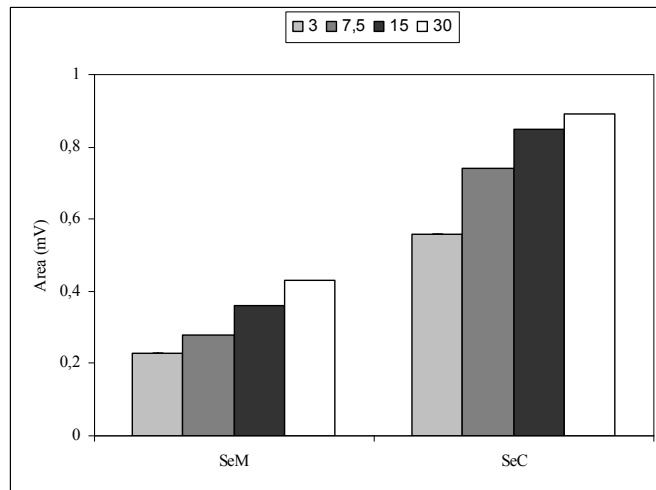


Figura 20 – Variação da área dos picos dos aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L), pelo método de HPLC-UV, em função da concentração do reagente de derivação FMOc (3, 7,5, 15 e 30 mmol/L)

A estabilidade do complexo entre os selenoaminoácidos e o FMOc foi avaliada após extração do excesso de reagente nos tempos de 1, 30 e 120 minutos. Os resultados mostraram que não ocorre diminuição significativa da área até 120 minutos após a derivação, como pode ser observado na Figura 21.

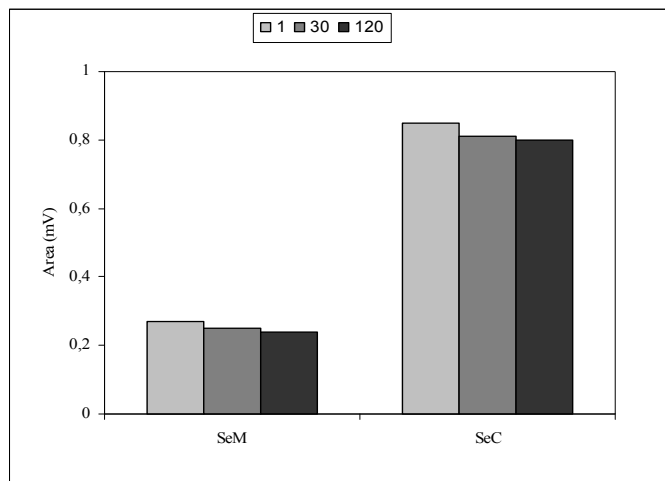


Figura 21 – Variação da área dos picos dos aminoácidos SeM e SeC (0,8 mg/L), pelo método de HPLC-UV, em função do tempo após reação de derivação com FMOC (1, 30 e 120 minutos)

O estudo de estabilidade dos compostos derivatizados foi também realizado avaliando-se a variação da área do pico para os aminoácidos selenometionina e selenocistina, na concentração de 0,8 mg/L após obtenção da fase aquosa nos tempos de 30, 120 e 960 minutos. Os resultados mostraram que, nos tempos investigados, não houve variação significativa da área dos analitos. A reação entre FMOC e os aminoácidos pode ser observada na Figura 22

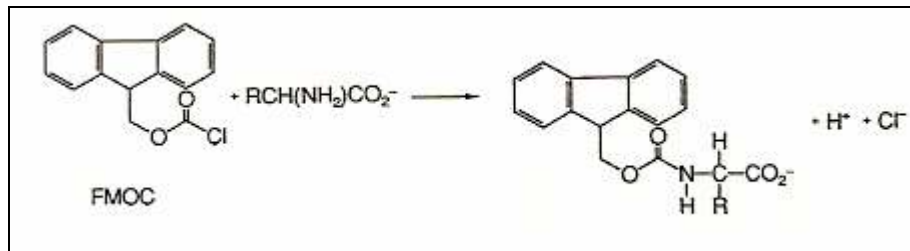


Figura 22 – Reação entre os aminoácidos e o reagente de derivação FMOC [113]

A Tabela 12 apresenta as equações da curva analítica para os selenoaminoácidos. Analisando-se as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado uma vez que os coeficientes de correlação (r) foram todos maiores que 0,999.

Tabela 12 – Resultados obtidos para calibração e LOD e LOQ dos selenoaminoácidos com FMOC

Aminoácido	Equação da reta	r	Instrumento		Método
			LOD (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Selenometionina	$y = 0,01x + 0,04$	0,9987	0,24	0,50	1,6
Selenocistina	$y = 0,06x - 0,18$	0,9996	0,08	0,20	0,8

Os valores obtidos para a curva analítica onde y = resposta medida (área do pico) e x = concentração, evidenciaram linearidade satisfatória na faixa entre 1,6 a 8 mg/L para a SeM e 0,8 a 8 mg/L para a SeC, para o método do FMOC.

Os valores de recuperação para amostra de soro e levedura e precisão intermediária estão listados na Tabela 13, onde recuperações variaram de 89 a 110% para SeM e entre 86 e 101% para SeC.

Tabela 13 – Recuperação dos analitos (RSD) para os analitos SeM e SeC por HPLC-FMOC-UV

Selenoaminoácido	Nível de fortificação (mg/L)	Soro		Levedura	
		Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
SeM	16	107	3,3	110	5,2
	32	93	2,6	94	2,9
	64	89	5,1	89	3,1
SeC	16	92	5,8	86	2,3
	32	92	3,7	95	2,8
	64	101	3,5	98	3,2

5.2. Caracterização da levedura presente na ração – Experimento 1

Todas as etapas de cada procedimento referentes ao experimento 1 estão demonstradas na Figura 23.

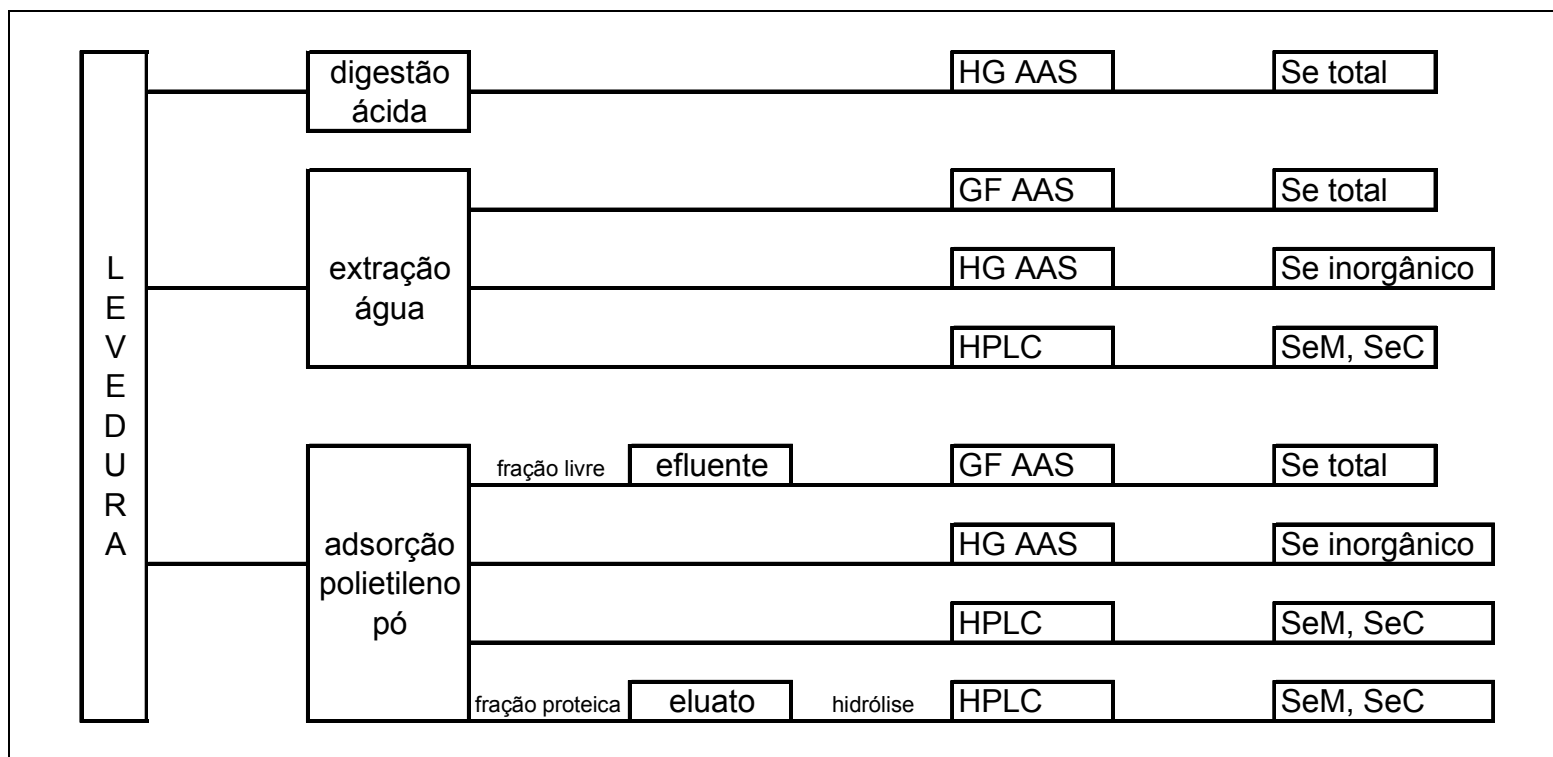


Figura 23 – Etapas dos procedimentos para a caracterização da levedura

5.2.1. Determinação de Se total

Os valores encontrados na determinação de Se total são mostrados na Tabela 14. A concentração variou entre as amostras de 1174 a 1343 $\mu\text{g/g}$ de Se.

Tabela 14 – Concentração de Se ($\mu\text{g/g}$) na levedura por HG AAS, após digestão ácida e etapa de pre-redução com NaBr/sulfâmico

Amostra	Se total $\mu\text{g/g}$ (Média \pm SD)*
1	1200 \pm 80
2	1174 \pm 30
3	1343 \pm 59

*n = 3

5.2.2. Estudo da extração das proteínas da amostra de levedura

Primeiramente, determinou-se a concentração de Se extraído no extrato aquoso e em solução de Tris/dodecilsulfato de sódio (SDS). A determinação de Se após este procedimento foi realizada por GF AAS, sendo a amostra diluída 100 vezes para quantificação. Estes resultados foram comparados com o Se total encontrado na levedura. O resultado pode ser visto na Tabela 15.

A amostra de levedura utilizada para o experimento das extrações continha 1200 \pm 80 $\mu\text{g/g}$ de Se (amostra 1, Tabela 14). A extração com água promoveu a extração de 20% do Se presente na levedura, sendo este valor aumentado para 32% com a adição de tampão Tri-HCl + SDS 1%.

A determinação das proteínas foi realizada espectrofotometricamente, pelo método Azul Brillhante de Comassie, encontrando-se um teor de proteínas de 30 e 114 mg/g de levedura nos extratos com água e com SDS, respectivamente. A concentração de proteína no extrato com água foi significativamente menor, perfazendo cerca de 30%, que no extrato com SDS.

Tabela 15 – Concentração de Se total na levedura (HG AAS) e o percentual extraído após o procedimento de extração com água e Tris/SDS (GF AAS)

Tratamento	Se total $\mu\text{g/g}$ (Média \pm SD)*	Se %
Digestão com HNO_3	1200 \pm 80	100
Extração H_2O	239 \pm 15	20
Extração $\text{H}_2\text{O}/\text{Tris}/\text{SDS}$	379 \pm 45	32

* n = 3

Embora moderada, a extração desenvolvida foi utilizada para avaliar as espécies de Se presentes nestes extratos. À vista disso, além de determinado o teor de Se total nos extratos, pela técnica de GF AAS, foram determinadas as concentrações das espécies inorgânicas (Se IV e Se VI) por HG AAS. O resultado em $\mu\text{g/g}$ pode ser observado na Tabela 16. O valor da concentração de Se orgânico foi obtido pela diferença entre o Se total e o Se inorgânico.

O resultado evidencia, pela diferença entre a concentração de Se total e o Se inorgânico, que aproximadamente 95% da concentração das espécies extraídas estão na forma de Se orgânico, podendo estar ainda associado aos peptídeos.

Tabela 16 – Distribuição do Se extraído da amostra de levedura entre Se total, Se inorgânico e Se orgânico

Tratamento	Se total ($\mu\text{g/g}$)	Se inorgânico ($\mu\text{g/g}$)	% Se inorgânico	% Se orgânico
Extração H_2O	239	12	5	95
Extração $\text{H}_2\text{O}/\text{Tris}/\text{SDS}$	379	11	3	97

Os compostos de Se determinados em cada extrato podem incluir selenoproteínas globulares, as quais são solúveis na água, e as espécies de Se fracamente ligadas às proteínas de baixo peso molecular, tais como selenito, selenato, selenoaminoácidos (SeM e SeC) e possivelmente a Se-glutationa [64].

Muitos estudos utilizam hidrólise enzimática como pré-tratamento para quantificação de SeM e SeC em amostras de levedura. Entretanto, poucos estudos relatam à avaliação da solubilidade e da conseqüente disponibilidade do micronutriente mineral em um alimento de suplementação, como a levedura [65]. Embora o percentual de Se seja menor em relação o teor de Se total, o procedimento de extração é importante para sustentar a integridade das espécies químicas presentes na levedura.

5.2.3. Estudo da separação das proteínas extraídas da levedura em colunas de polietileno e teflon

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que polímeros como polietileno (PE) e teflon são capazes de adsorver proteínas. Os trabalhos até agora realizados mostraram a eficácia destes polímeros em adsorver proteínas do soro e plasma sanguíneo [73-74]. Através do uso de colunas preenchidas com os polímeros em pó, as proteínas podem ser separadas de uma amostra sem que seja necessária a adição de ácidos ou alterações no pH. A eluição das proteínas adsorvidas na coluna é realizada com um solvente orgânico polar como etanol ou metanol. Desta forma, a integridade das proteínas é mantida.

Antes de realizar o experimento para a retenção das proteínas na coluna, verificou-se a interação das espécies de Se não ligadas às proteínas, Se (IV) e SeM com o PE em pó. Avaliou-se a adsorção das espécies inorgânica e orgânica pelo PE, carreando-se uma solução padrão de Se IV e SeM (100 µg/L) pela coluna. As recuperações encontradas foram 87 e 102%, respectivamente. Todo o Se foi determinado na amostra e, após a passagem pela coluna de PE, na fração aquosa efluente da coluna. O Se determinado na fração aquosa corresponde ao Se livre no meio, significando que estas espécies não tiveram interação pela coluna. O Se livre pode corresponder ao inorgânico e orgânico, uma vez que a SeM também foi determinada nesta fração. Este resultado é mostrado na Tabela 17. A determinação de Se foi feita por GF AAS.

Tabela 17 – Avaliação da adsorção das espécies de Se IV e SeM (100 µg/L) na coluna de PE

Amostra	Se IV		SeM	
	(µg/L)	Recuperação (%)	(µg/L)	Recuperação (%)
Solução padrão	100	100	92	100
Efluente	n.d.	0	n.d.	0
Eluição com H ₂ O	87	87	93	102
Eluição com MeOH	n.d.	0	n.d.	0

n.d.: não-detectado

Uma vez que o procedimento de extração é capaz de solubilizar algumas proteínas como também extrair uma porção do Se presente na amostra, fez-se um estudo para verificar se o Se orgânico extraído da levedura estava totalmente associado às proteínas. Realizou-se, então, um ensaio de separação das proteínas utilizando colunas de polietileno (PE) e teflon. Primeiramente o ensaio foi feito apenas com o PE, avaliando-se a concentração de Se bem como de proteínas retidas no polímero e no efluente da coluna. O resultado pode ser observado na Tabela 18. O Se foi determinado por GF AAS e as proteínas pelo método do Azul Brilhante de Comassie.

A separação das proteínas nos extratos ocorreu carregando-se a amostra pela coluna de PE em pó. Não foram encontrados Se e proteínas no efluente, após a coluna PE. Nesta separação, os eluatos recolhidos com água contêm o Se não ligado às proteínas, ou Se livre, e após a eluição das mesmas com metanol, obteve-se a fração de Se ligado às proteínas. O resultado obtido mostrou que o percentual de Se na fração livre foi 37 % e na fração combinada com a proteína perfaz cerca de 60%, calculados em relação ao teor de Se extraído.

Tabela 18 – Distribuição das espécies de Se livre e ligado à proteína no extrato aquoso da levedura (0,1 g levedura + 20 mL H₂O) utilizando coluna de PE

Amostra	Fração de selênio	Se (µg/L)	%
Extrato de levedura	Se total	1197	100
Efluente da coluna	Se livre	n.d.	0
Eluato aquoso	Se livre	439	37
Eluato metanólico	Se-proteína	698	58
Total das frações		1137	95

n.d.: não-detectado

A determinação da proteína se fez por diferença nos mesmos extratos, ou seja, determinou-se a absorvância na amostra antes de passar pela coluna de PE, e após, nas frações eluídas com água e metanol, sendo que 92% das proteínas foram determinadas na fração metanólica, evidenciando que as proteínas ficam retidas no polímero.

Um estudo com amostras de leveduras fortificadas com soluções padrões de Se IV e SeM (100 µg/L) e com posterior procedimento de extração com água, foi também realizado. Os resultados mostraram que o Se adicionado, tanto inorgânico como orgânico, foram recuperados na fração livre, ou seja, após a eluição com água. Estes resultados foram calculados descontando-se o valor obtido na amostra fortificada dos valores obtidos na mesma fração da amostra sem fortificação.

A partir destes testes prévios, comparou-se o percentual e a distribuição de Se livre e Se ligado às proteínas no extrato da levedura com H₂O, como também no extrato de Tris/SDS, após o procedimento de separação na coluna de PE. O objetivo foi avaliar se o teor de Se livre e combinado às proteínas mantinha a mesma proporção que o extrato aquoso, uma vez que o teor de Se total, bem como o total de proteína extraída, é maior pela adição de SDS. A Figura 24 mostra a concentração de Se total, o qual foi determinado nas frações por GF AAS.

A concentração de Se no extrato com H₂O e com Tris/SDS foi arbitrariamente representada como sendo 100% e os eluatos de água (fração livre) e de metanol, para desorção das proteínas (fração combinada), calculados em relação ao valor determinado nestes extratos. É possível perceber pelos resultados, que após a coluna de polietileno, a soma do Se das frações livre e combinada perfaz cerca de 100% em relação ao total de Se no extrato aquoso. Para o extrato com SDS, a soma do Se encontrado nas frações livre e combinada correspondeu a 35% do Se total deste extrato.

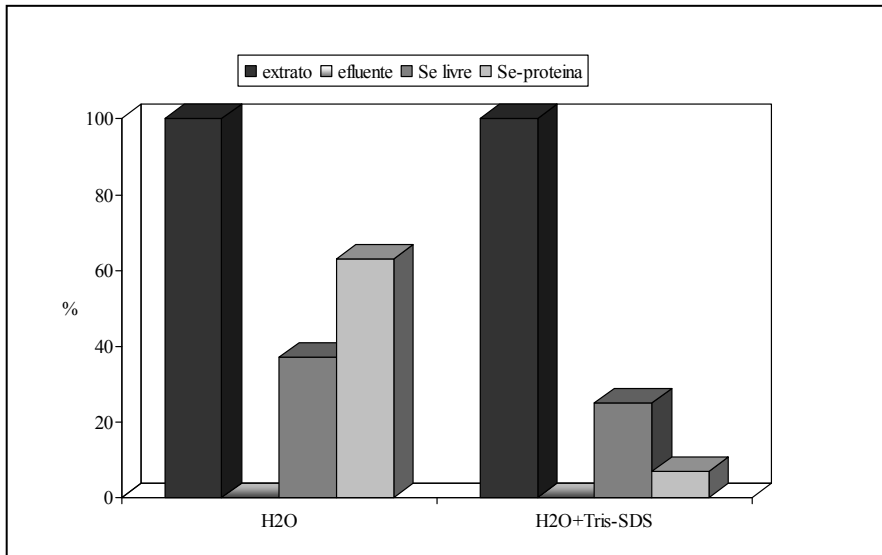


Figura 24 – Percentual de Se livre e Se ligado às proteínas nos extratos de H₂O e de H₂O +Tris/SDS da amostra de levedura após separação na coluna de PE, sendo 100% a concentração de Se na amostra

Para o extrato de H₂O +Tris/SDS da amostra de levedura após a separação das mesmas na coluna de PE, as proteínas ficaram retidas na coluna de PE, sendo que o metanol não foi capaz de eluí-las do polímero. Isto se deve ao fato de, provavelmente, o SDS promover uma interação maior das espécies de Se no polímero.

Adicionalmente, a determinação de Se total, na presença do SDS por GF AAS, nas alíquotas apresentou sinais de background muito elevados.

Para avaliar a eficiência da separação das frações livre e combinada pelo polietileno, realizou-se ensaio similar com coluna de teflon, carreando-se o extrato aquoso da amostra de levedura pelo polímero.

Alíquotas de água e metanol, usadas para lavagem e dessorção das proteínas da coluna, foram recolhidas, tendo a concentração de Se total mostrados na Tabela 19. A concentração de Se e de proteína foi arbitrariamente representada como 100%, sendo este o valor de referência para avaliação e quantificação das frações livre e combinada após passagem da amostra pelo polímero. Os resultados mostram que 13% do Se contido no extrato foi recuperado como fração livre e apenas 1% como Se ligado a proteínas, mostrando que a soma das frações possui recuperação muito menor que o teor do extrato.

Tabela 19 – Distribuição de Se livre e ligado à proteína no extrato da levedura (0,1 g amostra + 20 mL de água) utilizando coluna de teflon

Amostra	Fração de selênio	Se ($\mu\text{g/L}$)	%
Extrato de levedura	Se total	1197	100
Efluente da coluna	Se livre	n.d.	0
Eluato aquoso	Se livre	152	13
Eluato metanólico	Se-proteína	10	1

n.d.: não-detectado

O estudo da interação do Se inorgânico e orgânico (Se IV e SeM, 100 $\mu\text{g/L}$) foi também realizado com a coluna de teflon. Os resultados obtidos mostraram que o Se IV não tem interação pela coluna, sendo totalmente eluído com água, mostrando recuperação de 93%. Porém a SeM fica adsorvida no polímero, apresenta baixa recuperação, 59% com água, também não sendo eluída com metanol, como pode ser observado na Tabela 20.

Tabela 20: Comportamento das espécies de Se IV e SeM (100 $\mu\text{g/L}$) na coluna de teflon

Amostra	Se IV		SeM	
	$\mu\text{g/L}$	%	$\mu\text{g/L}$	%
Solução padrão	107	100	98	100
Efluente	n.d.	0	n.d.	0
Eluição com H ₂ O	99	93	59	60
Eluição com MeOH	n.d.	0	n.d.	0

n.d.: não-detectado

Um ensaio similar foi realizado com amostras fortificadas com soluções padrões de Se IV e SeM (100 $\mu\text{g/L}$). Os resultados mostram que apenas o Se inorgânico da amostra fortificada foi recuperado, com valor de recuperação de 99%. O mesmo não aconteceu nas frações do extrato fortificado com SeM, onde as recuperações foram de 60%, mostrando que na presença da matriz também não ocorre a recuperação da SeM. Na determinação da proteína o valor de

recuperação foi inferior a 1% nas frações, evidenciando a forte retenção das proteínas da levedura pela coluna de teflon. Não foi possível determinar a distribuição entre fração livre e fração combinada de Se utilizando o teflon como coluna de separação.

Conclui-se, portanto, que a coluna de PE se mostrou mais eficiente no estudo da separação das frações de Se livre e combinada à proteína, sendo o teflon inadequado para esta finalidade nas amostras de levedura. Embora a extração na presença de tampão Tris e SDS tenha proporcionado um aumento da concentração de Se total e de proteínas, o método da extração com água foi utilizado por proporcionar valores satisfatórios de recuperação (soma) das frações livre e combinada.

Após este estudo, fez-se novamente o balanço da distribuição das espécies de Se na amostra de levedura. Determinou-se, primeiramente, o Se total, no extrato aquoso, como também na fração livre e na ligada à proteína, por GF AAS. Após, o Se inorgânico, Se IV e Se VI, foi determinado no extrato e na fração livre, por HG AAS. O Se VI determinado por diferença após a pré-redução com NaBr. A distribuição das espécies de Se pode ser observada na Tabela 21.

Tabela 21: Distribuição das espécies de Se total (GF AAS) e Se inorgânico (Se IV e Se VI, por HG AAS) no extrato da amostra de levedura em %, utilizando coluna de polietileno

Amostra	Se total	Se IV	Se VI	Se orgânico	Se-proteína
Extrato H ₂ O	100	3	3	94	-
Fração livre	37	4	4	92	-
Fração Se-proteína	58	-	-	100	100

Como visto anteriormente, apenas 6% é inorgânico, sendo 94% orgânico, no extrato aquoso. Do total de Se orgânico, 58% está ligado à proteína e 37% na forma livre. Apenas 8% da fração livre foram quantificados como sendo Se inorgânico.

Estudos feitos [65] utilizando vários procedimentos seqüenciais de extração em amostra de levedura, entre eles extração de Se utilizando água, demonstraram que este procedimento produziu recuperações de entre 15 e 25% do Se, o qual cerca de 30%, nestes extratos, está ligado

às proteínas solúveis presentes no meio. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os reportados na literatura, o que mostra que o procedimento para separação das frações de selênio inorgânico livre, orgânico livre e da fração de selênio ligado às proteínas é satisfatório. Porém, a distribuição das espécies de Se entre inorgânico ou orgânico ligado às proteínas somente pode ser determinada após a hidrólise das mesmas para que sejam liberadas as espécies de Se.

5.2.4. Hidrólise de proteínas de amostras de levedura e soro

Muitos procedimentos de hidrólise têm sido descritos na literatura para análise de amostras de soro sanguíneo e peptídeos, entre eles os mais usados são a hidrólise enzimática [66, 114] e hidrólise química [69, 115].

Os resultados da hidrólise ácida foram satisfatórios com relação à degradação de proteínas, não sendo estas determinadas após o procedimento.

Primeiramente foi feita a degradação das proteínas do soro. Cada enzima possui um pH ótimo para sua atividade máxima. Deste modo foram preparadas soluções das enzimas, as quais foram colocadas em contato com as amostras.

Os resultados preliminares foram realizados com diferentes proporções entre solução enzimática e volume da amostra de soro. O espectro de referência é a solução da enzima na presença de amostra no tempo inicial (zero). A equação de regressão linear para o método foi $y = 0,86x + 0,52$, onde “y” corresponde à absorvância e “x” à concentração em g/L, e o coeficiente de correlação $r = 0,9982$.

Os resultados obtidos mostraram que as enzimas papaína e pancreatina mostraram-se mais eficientes na diminuição da concentração das proteínas do meio, sendo a proporção 0,1 mL de amostra para 5 mL de solução enzimática, a que gerou diferença significativa de degradação, em relação a mistura de referência obtida no tempo zero. A degradação ocorreu com o aumento do tempo de reação, onde apenas após 1440 minutos (24 horas) as enzimas papaína e pancreatina diminuíram a concentração das proteínas do soro em 72 e 60%, como pode ser observado na Figura 25.

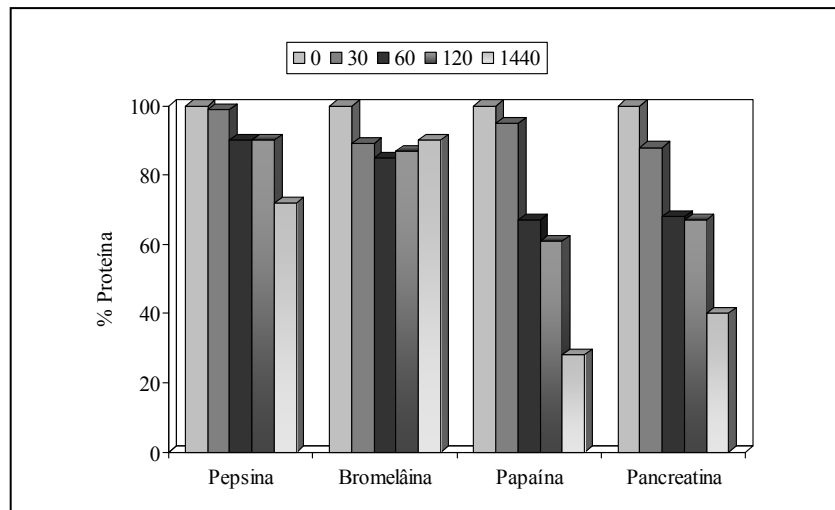


Figura 25 – Hidrólise enzimática de 100 µL de soro após os tempos 0, 30, 60, 120 e 1440 minutos de incubação à 37°C, em um volume final de 5 mL da solução enzimática das enzimas pepsina, bromelâina, papaína e pancreatina. Considerou-se 100% de proteína o valor no tempo inicial

Foi verificada também a eficiência de degradação das proteínas com o aumento da concentração de aminoácidos no meio de reação, como produto da hidrólise enzimática nos tempos investigados (0, 30, 60, 120 e 1440 minutos). Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu aumento de 35 e 30% da concentração dos aminoácidos, após 24 horas de reação, com as enzimas papaína e pancreatina, respectivamente.

Além disso, diferença entre a concentração de proteína e aminoácidos antes e após a hidrólise apenas foi percebida para o volume de amostra de 100 µL.

As curvas de calibração foram feitas com solução padrão da glicina, sendo que o espectro de referência é a solução do aminoácido na presença de amostra no tempo inicial (zero). A equação de regressão linear para o método foi $y = 1,52x - 0,03$, onde “y” corresponde à absorvância e “x” à concentração em %, e o coeficiente de correlação $r = 0,9978$.

Os resultados obtidos concordam com a literatura, uma vez que a reação com a ninidrina é uma reação sujeita a interferência [98], além de requerer aquecimento para que a reação ocorra, sendo apenas utilizada como uma ferramenta qualitativa da hidrólise enzimática das proteínas.

A hidrólise das proteínas da amostra de levedura com enzima papaína foi realizada para avaliar o tempo necessário para que a reação ocorresse, bem como se o método de extração e solubilização era adequado. Os resultados, verificados pelo método de Lowry, mostraram que 59 % das proteínas foram hidrolisadas e que houve um aumento de 34% da concentração de aminoácido no meio após 24 horas de reação, observada pela reação com a ninidrina. Assim como a amostra de soro, é necessário um tempo de 24 horas para efetividade da reação. A figura 26 mostra o aumento da concentração dos aminoácidos com o aumento do tempo de reação para a amostra de levedura bem como a diminuição da concentração das proteínas.

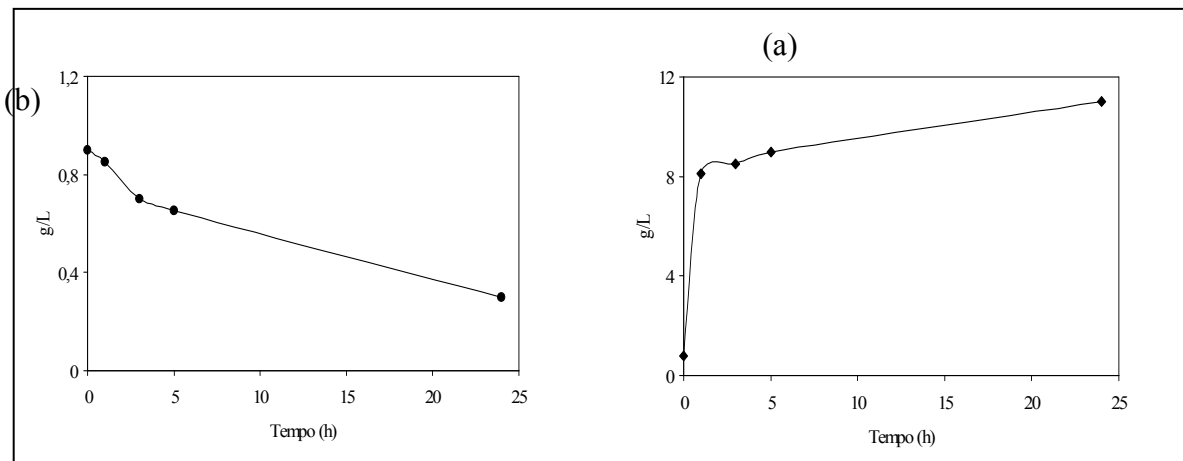


Figura 26 - (a) Concentração de proteína (●) e (b) de aminoácido (◆) na amostra de 100 µg de levedura após a hidrólise enzimática com a papaína, nos tempos 0, 1, 3, 5 e 24 horas de incubação à 37°C

Os resultados obtidos com o método Azul de Comassie foram similares aos ensaios anteriores comparando-se aos resultados obtidos com o método de Lowry, onde utilizando as enzimas pancreatina e papaína ocorreu diminuição da concentração das proteínas para amostras, sendo que com este método obtiveram-se reduções de em torno de 90 e 100% para as amostras com as enzimas pancreatina e papaína, respectivamente. O espectro foi realizado por diferença, onde se fez as leituras nos tempos 0 e após 24 horas da reação. A absorvância da enzima foi

descontada fazendo-se um branco com cada solução de enzima antes da leitura das amostras. Os resultados podem observados na Tabela 22.

Tabela 22 – Degradação enzimática de proteínas em % para as amostras de soro e levedura com as enzimas papaína e pancreatina após 24 horas de incubação à 37°C pelo método Azul Brilhante de Comassie

Amostra	Papaína				Pancreatina			
	T0		T24		T0		T24	
	Absorv.	%	Absorv.	%	Absorv.	%	Absorv.	%
Levedura (100 µg)	0,0189	100	n.d.	0	0,1225	100	0,0098	8
Soro (100 µL)	0,0479	100	n.d.	0	0,3890	100	0,0395	10

n.d.: não-detectado

A pancreatina é uma substância que contém enzimas como amilase, lipase e protease, extraídas do pâncreas do porco, *Sus scrofa*, Família Sudeae. A papaína é uma enzima proteolítica derivada do mamão *Carica papaya* Linné, Família Caricaceae.

Poucos estudos são realizados com proteases específicas para procedimentos de hidrólise em amostras de levedura. Muitos deles utilizam a pronase [66] para ensaios de especificação de SeM e SeC, que é uma enzima proteolítica não específica.

Embora a degradação das proteínas pela enzima tenha sido satisfatória, a própria enzima por si mesma, é uma proteína e, portanto, constitui matriz complexa, requerendo separação ou eliminação prévia à injeção no sistema cromatográfico. Deste modo, optou-se pela hidrólise ácida para determinação dos aminoácidos SeM e SeC nas amostras de soro, bem para determinação total destes nas amostras de levedura.

5.2.5. Determinação de SeM e SeC na amostra de levedura

A determinação das espécies selenometionina e selenocistina foi determinada por HPLC-OPA-SH na amostra de levedura, e foi investigada sob dois aspectos. Primeiramente, as espécies SeM e SeC foram quantificadas na fração livre do extrato aquoso, após separação das proteínas retidas na coluna de PE, e posteriormente, após o procedimento de hidrólise ácida.

Os resultados mostraram que somente SeM foi determinada na fração livre, ou seja, o Se orgânico presente nesta fração, está na forma de SeM e a concentração obtida foi 0,39 mg/L. Os resultados encontrados após o procedimento de hidrólise apontam a presença de ambas as espécies: SeM e SeC, como pode ser observado na Tabela 23. Os resultados estão expressos em mg/L, como também o valor percentual de cada espécie, calculado em relação ao Se orgânico total.

Tabela 23 – Determinação das espécies de SeM e SeC na amostra de levedura e na fração não ligada as proteínas em mg/L (%)

Amostra	Se orgânico total		SeM		SeC	
	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
Levedura	1,13		0,77	69	0,36	28
Fração livre	0,40		0,39	98	n.d.	0
Fração Se-proteína	0,73		0,38	52	0,35	48

n.d.: não-detectado

Os resultados concordam com o reportado na literatura, uma vez que cerca de 70 % do Se encontrado na amostra foi SeM, sendo então esta a espécie predominante [63-64]. Embora o procedimento de extração corresponda a apenas 37 % do Se presente na amostra, ele é capaz de liberar a espécie de SeM, a qual pode estar associada, também, a proteínas solúveis de baixo peso molecular e ser extraída por este procedimento [65].

5.3. Avaliação do selênio em aves tratadas oralmente com Se inorgânico e levedura – Experimento 2

Para avaliar o grau de distribuição de selênio em função da forma de selênio existente na ração, três tipos de amostras foram comparados. O primeiro grupo (T1) corresponde a amostras adquiridas no mercado, sendo este o grupo controle. O segundo grupo (T2) recebeu selenito de sódio e um terceiro grupo (T3) recebeu a levedura enriquecida com selênio. Para estas amostras, o tecido e a gordura foram analisados separadamente. Os resultados estão apresentados na Tabela 24. Pode-se observar que a suplementação com Se promoveu um aumento da concentração de Se tanto na fração de gordura como no resíduo sólido.

Tabela 24 – Selênio na gordura e no resíduo do músculo de aves tratadas com e sem suplemento de Se, após a extração da fração solúvel e digestão ácida (pré-redução com ác. Sulfâmico/NaBr)

Amostra*	Gordura		Resíduo	
	µg	%	µg	%
Frango adquirido no comércio	0,01	7	0,13	93
Ave tratada com selenito de sódio	0,02	12	0,15	88
Ave tratada com levedura	0,05	14	0,32	86

* n = 4

A Figura 27 mostra os níveis de selênio encontrados nas amostras individuais das aves tratadas com selenito de sódio e levedura. Pode-se observar que há um aumento da concentração no grupo que recebeu selênio orgânico.

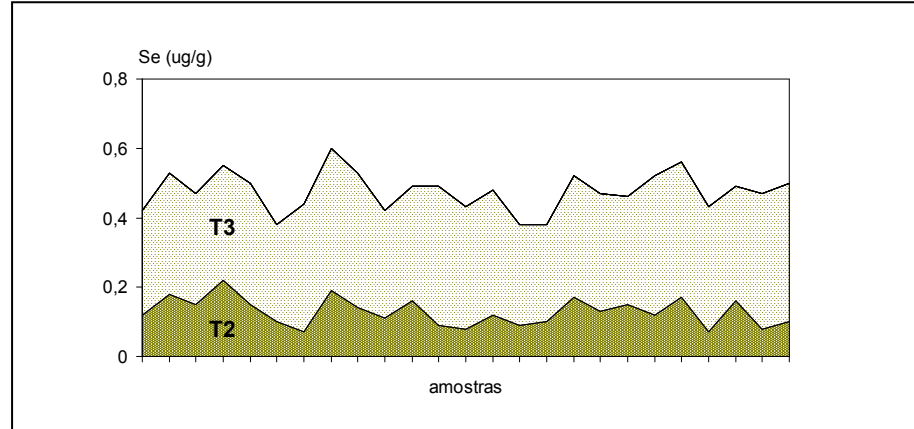


Figura 27 – Se ($\mu\text{g/g}$) nas amostras de aves suplementadas com T2: Se (IV), T3: levedura (n = 24)

Estudos mostram que o uso de suplementos de Se em aves domésticas aumenta os níveis deste elemento no músculo, fígado, rim e ovos destes animais [28]. Outros estudos demonstraram que aves tratadas com Se, inorgânico e orgânico, tiveram o selênio orgânico melhor distribuído que o inorgânico, resultando em teores maiores, e que sua disponibilidade nos tecidos foi diretamente relacionada à forma química de selênio ingerido [116]. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com o encontrado na literatura, uma vez que a ingestão de selênio orgânico, através da suplementação da ração com levedura rica em SeM, aumenta os níveis de Se nos tecidos do animal.

5.4. Análise de soro sanguíneo – Experimento 3

5.4.1. Desproteinização com TCA

O procedimento de desproteinização com ácido tricloro acético (TCA) é amplamente utilizado como etapa de pré-tratamento para determinação de metais por GF AAS, bem como

para análise de amostras de soro por cromatografia líquida [99, 117] para determinação de outros componentes do sangue.

Preliminarmente, investigou-se determinação de Se livre na amostra de através da concentração de Se total após os procedimentos, por GF AAS, utilizando como referência a amostra diluída 1:2.

Após, utilizou-se o sistema de HPLC-UV, com derivação pré-coluna com FMOC, para avaliar se o tratamento com TCA causaria interferência na determinação das espécies de SeM e SeC. Para este estudo utilizou-se com referência a amostra de soro fortificada com adição do padrão na concentração de 33 mg/L de SeM e 33 mg/L de SeC. A Tabela 25 mostra os resultados obtidos.

Tabela 25 – Efeito do TCA na determinação do Se livre total (GF AAS) nas amostras de soro sanguíneo

Amostra	Se ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)
Soro	256	100
Soro TCA 10%	18	7
Soro TCA 1% + Microondas	n.d.	0

Como pode ser observado, o método de desproteinização com TCA 10% poderia ser utilizada para avaliação do Se livre, uma vez que 7% do Se total foi determinado. O tratamento com TCA e aquecimento com microondas levou a efeitos de perda dos analitos, uma vez que não foi determinado Se após este procedimento.

O ácido tricloro-acético também não se mostrou adequado para determinação das espécies SeM e SeC por HPLC-UV, uma vez que as espécies mencionadas não são recuperadas após os procedimentos, conforme demonstrado na Tabela 26.

Tabela 26 – Efeito do TCA na determinação das espécies de SeM e SeC por HPLC-UV após a fortificação de 32 mg/L de cada espécie, em amostras de soro sanguíneo

Amostra	SeM		SeC	
	mg/L	%	mg/L	%
Soro fortificado	33	100	32	100
Soro TCA 10%	8,2	25	14	43
Soro TCA 1% + Microondas	6,2	19	1,6	5

5.4.2. Hidrólise

Para a determinação de SeM e SeC no soro sanguíneo, fez-se o procedimento de hidrólise ácida. Os resultados mostraram que é possível fazer a determinação simultânea de SeM e SeC nos hidrolisados, utilizando a técnica de HPLC-OPA-SH, com detecção fluorescente.

As amostras de soro analisadas foram as obtidas após a administração de Se em coelhos, para avaliação cinética da distribuição e transformação das espécies de Se (IV) e SeM nestas amostras, conforme discutido posteriormente na seção 5.5.

5.5.Selênio na nutrição parenteral

Preparações orais e parenterais de selênio têm sido muito utilizadas para prevenir e tratar distrofias musculares nutricionais, bem como outras síndromes de deficiência de Se. Existem formulações parenterais que disponibilizam selênio para os pacientes através da nutrição parenteral. Sabe-se que o selênio orgânico é mais absorvido do que o selênio inorgânico em animais como aves (como ficou demonstrado no presente estudo) e em suínos e caprinos [28]. Apesar das evidências de uma melhor absorção do selênio orgânico, as formulações parenterais disponibilizadas pelas indústrias farmacêuticas, contêm apenas selênio inorgânico na forma de selenito de sódio.

Os experimentos 4 (agudo) e 5 (sub-crônico) do tratamento parenteral em coelhos estão resumidos na Figura 28.

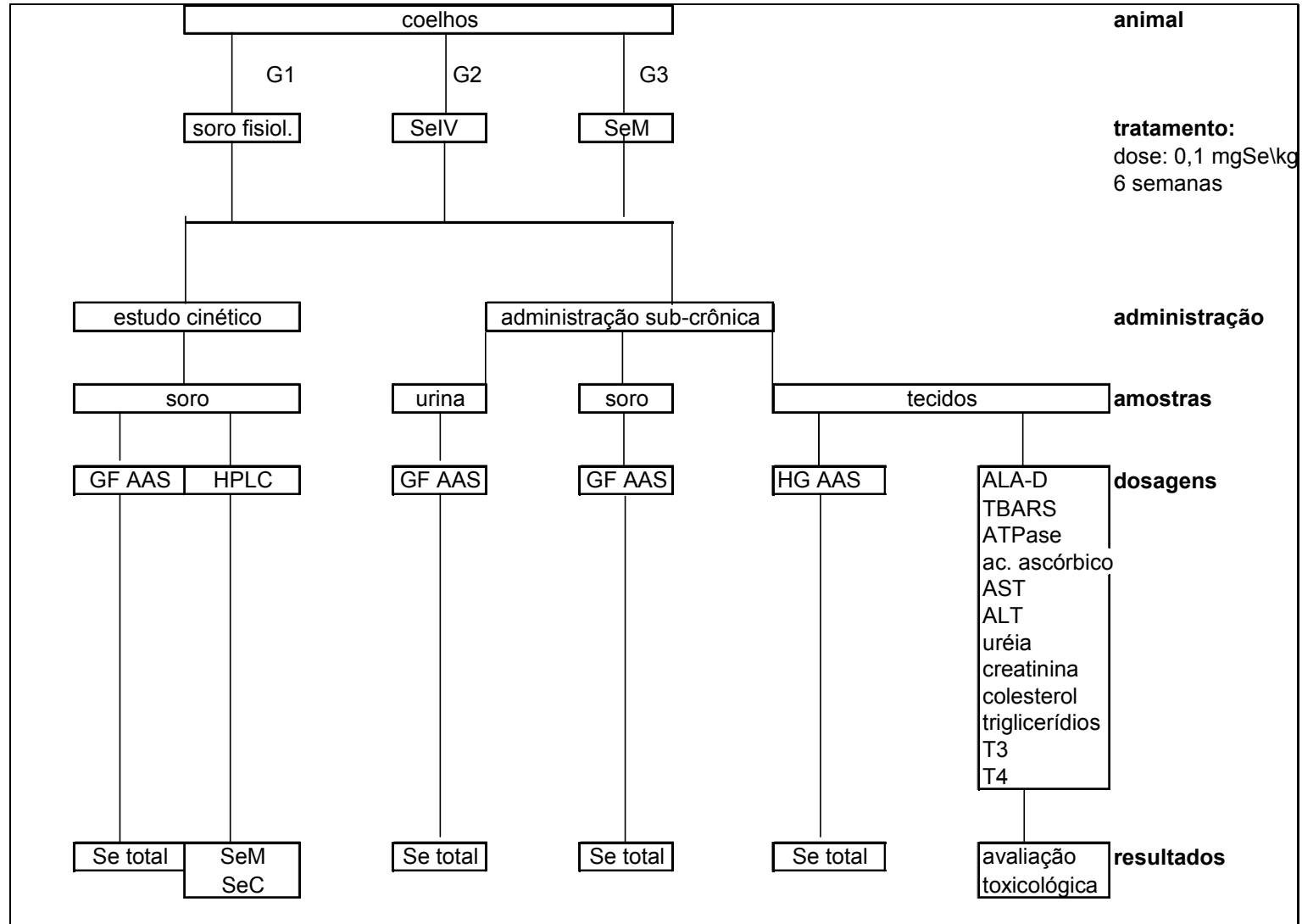


Figura 28 – Etapas da administração parenteral de Se inorgânico e orgânico em coelhos

5.5.1. Avaliação cinética de distribuição e transformação das espécies Se (IV) e SeM no soro – Experimento 4

Para este estudo a administração das doses do Se foi parenteral na tentativa de mimetizar a via pela qual os pacientes que recebem suplementação deste elemento. Para este estudo, coelhos foram usados como modelo animal.

5.5.1.1. Quantificação do selênio total

É possível perceber pelos resultados obtidos, e demonstrados na Figura 29, que o Se total tem um máximo de concentração após 15 minutos da administração de selênio inorgânico, na forma de selenito de sódio. O grupo que recebeu selênio orgânico, como selenometionina, também possui elevados valores de Se após 15 minutos da administração, porém não tão pronunciado, podendo evidenciar mais rápida distribuição do que a forma inorgânica.

A diferença da concentração de Se entre os grupos que receberam Se e o controle são significativamente diferentes ($p < 0,05$). A diferença se mantém significativa até 60 minutos após a administração das doses entre o grupo que recebeu SeM e o grupo do Se inorgânico, onde a distribuição ocorre após 30 minutos.

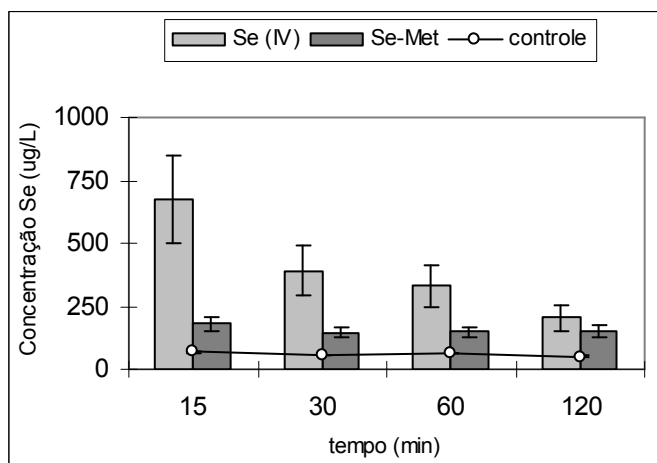


Figura 29 – Distribuição do Se total no soro de coelhos após 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção parenteral do controle (n = 3), Se inorgânico (Se IV) e Se orgânico (SeM) (n = 6). Determinação de Se por GF AAS

5.5.1.2. Determinação dos selenoaminoácidos no soro após a hidrólise com HCl 6 mol/L

Os resultados mostram que após a administração de Se inorgânico não houve aumento da concentração de SeM e SeC no soro, como pode ser observado na Figura 30 (A e B). As variações das concentrações de SeM e SeC não se mostraram similares para todas as amostras do grupo. Os desvios padrão observados nas medidas dos valores do mesmo grupo oscilaram entre 13 e 60%.

A concentração de SeC após a administração de SeM mostrou variação não uniforme no grupo. Em alguns animais houve aumento da concentração após 30 minutos da administração, outros, porém diminuem a concentração após este período. O desvio padrão observado entre as medidas após a administração de SeM ficou em torno de 50%.

A única alteração observada foi na concentração da SeM após a administração da própria SeM, como seria de se esperar. Há um pico em 15 minutos com posterior redução gradual da concentração de SeM. Este resultado parece não estar de acordo com o encontrado para o Se total determinado por GF AAS. Enquanto o resultado da espectrometria atômica sugere que a SeM injetada é prontamente metabolizada restando apenas um valor residual no sangue que praticamente não se altera nos 120 minutos da medida (Figura 30), o resultado da cromatografia sugere uma possível conversão desta espécie em outras, considerando que o total não decai mas apenas a concentração da própria SeM.

Estudos demonstram que o selenoaminoácido SeC foi a única forma de Se encontrada nas proteínas de ratos que receberam uma dieta contendo Se como selenito de sódio [118]. O RNA transportador é onipresente no reino animal e usa o códon UGA para incorporar SeC na glutathione peroxidase, formato desidrogenase, glicina redutase e na Se-proteína P plasmática.

A espécie SeC é um metabólito importante no caminho regular do Se pois é necessário na síntese de selenoproteína envolvidas na síntese de enzimas, com funções antioxidante, bem como controle do metabolismo da tiorredoxina redutase e proteção contra várias doenças cardiovasculares [119].

A determinação de SeM após a administração da dose aguda de selênio na forma orgânica, com o próprio aminoácido, demonstrou que há uma diminuição da concentração com o tempo, como pode ser observado na Figura 30 C. A concentração da SeC também varia em

função do tempo após a administração de Se orgânico, diminuindo sua disponibilidade no soro consideravelmente após 60 minutos (Figura 30 D).

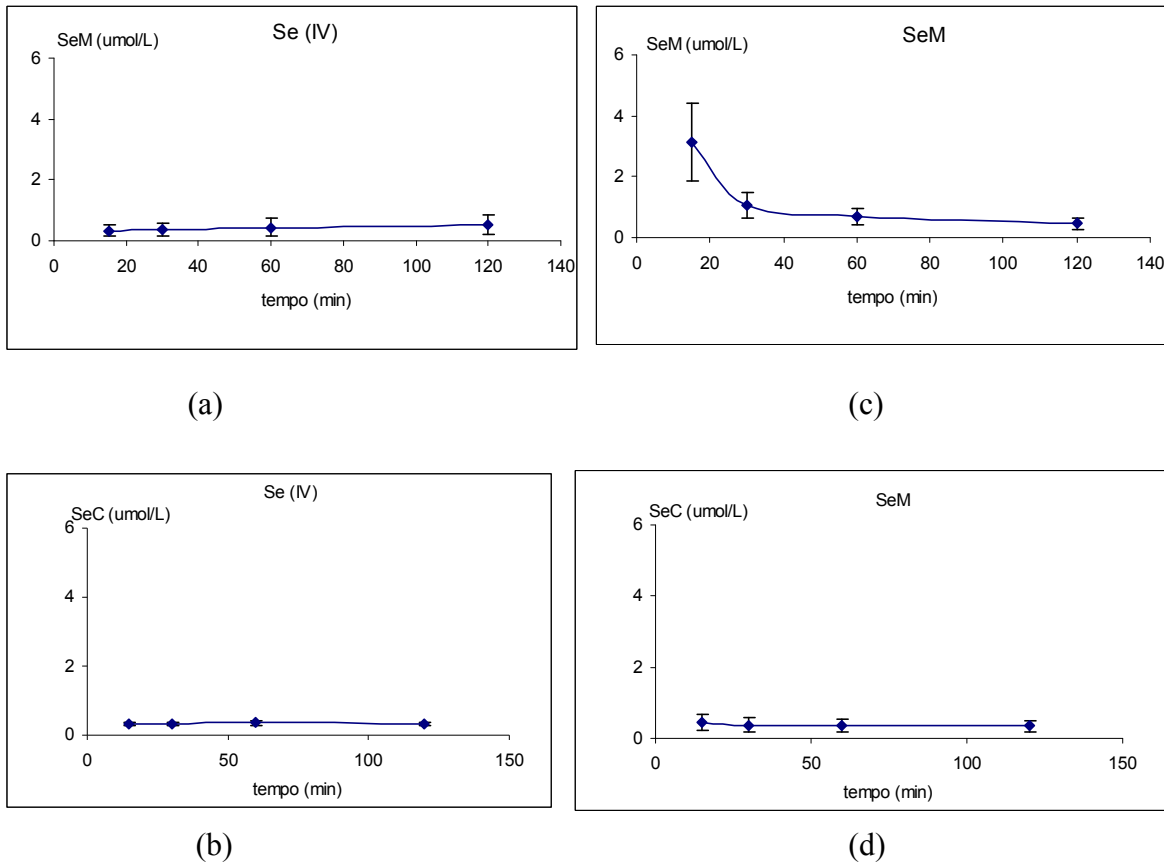


Figura 30 – Estudo da variação de concentração de SeM (a) e SeC (b) após a administração parenteral de Se (IV) e SeM (c) e SeC (d) após Se orgânico

Os resultados não uniformes entre as amostras de cada grupo se devem ao fato de, provavelmente, o Se estar participando de rotas metabólicas constantemente. A SeM, uma vez presente no organismo, pode ser a espécie precursora da SeC, uma vez que pode ser transformada em Se-homocisteína e, convertida posteriormente, em SeC. Um esquema simplificado do metabolismo humano do Se é demonstrado na Figura 31 [119].

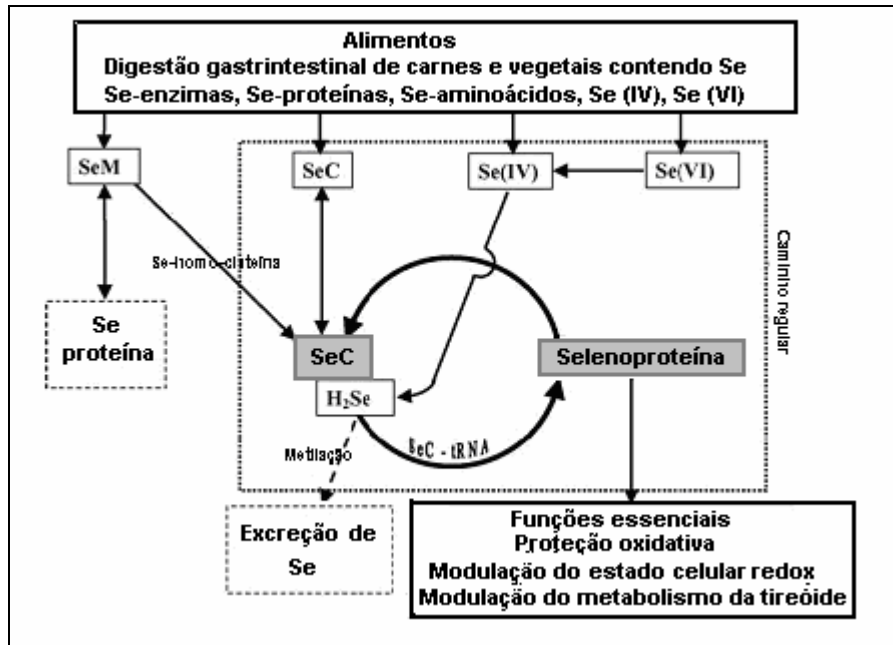


Figura 31 – Esquema do metabolismo humano de espécies de Se [119]

5.5.2. Avaliação do estudo da administração sub-crônica das espécies de Se – Experimento 5

Estudos dos efeitos de suplementos de selênio oral e parenteral têm sido realizados em resíduos produtos de origem animal. Preparações oral e parenteral de Se têm sido bastante utilizadas para prevenir e tratar distrofia muscular e outras síndromes de deficiência do Se. Existem poucos dados publicados com relação à administração parenteral de espécies de Se [102].

5.5.2.1. Quantificação de selênio total

A concentração de Se total nas amostras de soro sanguíneo nos três grupos do tratamento, no início (basal) e no final da suplementação, são mostrados na Figura 32 em $\mu\text{g/L}$. Nenhuma diferença significativa na concentração inicial e final foi observada no grupo controle, G1. A

concentração de Se aumentou no grupo G2, o qual recebeu Se inorgânico, de $87,2 \pm 19$ para 103 ± 16 $\mu\text{g/L}$ e no terceiro grupo G3, o qual recebeu SeM como fonte de Se orgânico, de $64,7 \pm 15$ para 193 ± 29 $\mu\text{g/L}$. Os aumentos foram significativamente maiores em ambos os grupos ($p < 0,05$).

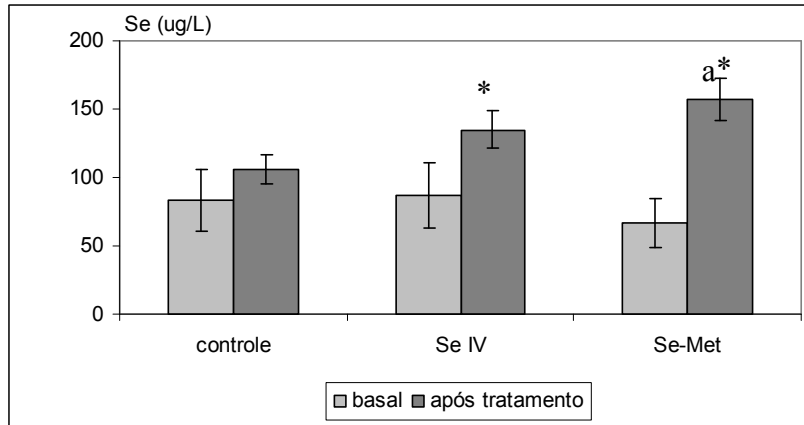


Figura 32 – Concentração de Se no soro dos grupos de coelhos tratados com Se antes (basal) e após o tratamento sub-crônico. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento de Se (IV) e SeM e o basal. a = Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento com Se nos grupos e o controle

A administração de selênio orgânico e inorgânico nos coelhos aumentou significativamente a concentração de Se no soro sanguíneo após o tratamento ($p < 0,05$). Em termos de valores absolutos, a concentração no soro foi notadamente maior no grupo que recebeu SeM. Os valores médios da concentração de Se total foram 106 ± 4 $\mu\text{g/L}$, 135 ± 11 $\mu\text{g/L}$ e 157 ± 19 $\mu\text{g/L}$ para os grupos controle e com suplementação de selênio (IV) e SeM, respectivamente.

Pode-se concluir que a administração parenteral com Se orgânico, na forma de SeM, promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) no soro sanguíneo em comparação ao selênio inorgânico.

Estudos com animais tratados com suplementação oral de Se orgânico, na forma de levedura, tem demonstrado que a concentração de Se total tanto no plasma como no sangue total maiores do que os grupos que receberam selênio inorgânico [120].

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os encontrados por outros autores, apesar das espécies de selênio e a forma de administração não serem exatamente as mesmas. Após a administração intravenosa de selenito de sódio e a suplementação oral com levedura enriquecida com selênio, a concentração de Se total no soro foi significativamente maior no grupo que recebeu a forma orgânica [27].

Os resultados da análise da urina mostraram significativa diferença entre o grupo tratado com SeM e o controle, porém esta diferença não foi acentuada no grupo que recebeu Se na forma inorgânica, como pode ser observado na Tabela 26.

Tabela 26 – Determinação da concentração de Se em $\mu\text{g/L}$ na urina dos coelhos após o tratamento sub-crônico com Se (IV) e SeM. Determinação realizada por HGAAS

Grupo	Se	SD
Controle*	102	12
Selenito de sódio**	194	83
Selenometionina***	270	69

*n = 3, **n = 6, ***n = 5

Os resultados das análises das amostras dos tecidos após o tratamento sub-crônico em coelhos são mostrados na Tabela 27 e são expressos em $\mu\text{g/g}$. A administração de selênio inorgânico e orgânico em coelhos resultou um aumento significativo da concentração de Se nos tecidos ($p < 0,05$). As mais altas concentrações de Se foram observadas no fígado e nos rins, seguido da tireóide, coração, baço, músculo, cérebro e gordura nos grupos que receberam tanto Se inorgânico como os que receberam Se orgânico.

Tabela 27 – Concentração de Se ($\mu\text{g/g}$) nos tecidos de coelhos após tratamento sub-crônico:

Tecido	Controle*		Se (IV)**		SeM***	
	Se ($\mu\text{g/g}$)	SD	Se ($\mu\text{g/g}$)	SD	Se ($\mu\text{g/g}$)	SD
Rim	1,12	0,13	2,13	0,56	2,37	0,50
Fígado	0,93	0,11	4,61	1,10	3,28	0,73
Coração	0,03	0,03	0,41	0,20	0,82	0,11
Cérebro	0,02	0,01	0,11	0,04	0,48	0,06
Músculo	0,02	0,01	0,11	0,06	0,61	0,14
Baço	0,03	0,02	0,19	0,19	0,79	0,79
Tireóide	0,24	0,21	0,47	0,07	0,54	0,11
Gordura	0,05	0,04	0,12	0,02	0,15	0,03

*n = 3; **n = 6; ***n = 5

Em relação ao fígado, a concentração de Se foi maior no grupo que recebeu Se inorgânico ($4,6 \mu\text{g/g}$), seguido do grupo tratado com Se orgânico ($3,3 \mu\text{g/g}$), sendo a diferença significativa entre os grupos controle e tratados com Se.

Fígado e rim são utilizados freqüentemente para avaliação do status de Se em vários estudos com espécies animais as quais receberam dietas com diferentes doses de Se [27-28]. Estudos comparativos em animais tratados com diseleneto de difenila mostram que a deposição, após o tratamento crônico, é maior no fígado e no rim de ratos [121].

A concentração de Se no rim aumentou significativamente tanto para o grupo que recebeu selênio inorgânico (G2) como para o grupo que recebeu selenometionina (G3) em relação ao controle (G1), porém sem diferença entre os grupos (G2 e G3). As doses chegaram a $2,13$ e $2,37 \mu\text{g/g}$ para os grupos G2 e G3 respectivamente.

Os níveis de Se no coração e no cérebro dos animais tratados com Se também foram diferentes do controle. Além disso, são significativamente diferentes entre si, uma vez que o grupo o qual recebeu SeM produziu uma disponibilidade maior de Se nestes tecidos em relação ao grupo G2 ($p < 0,05$).

O músculo apresentou diferença significativa apenas nos animais suplementados com Se orgânico, sendo encontrados valores médios de $0,61 \mu\text{g/g}$. A diferença foi significativa também

entre os grupos que receberam Se. O Se inorgânico não produziu diferença em relação ao controle.

O tratamento com Se produziu aumento da concentração de Se na glândula tireóide de 0,24 para 0,46 e 0,54 $\mu\text{g/g}$ para os grupos G1, G2 e G3, respectivamente. Porém não foi observada diferença significativa entre o grupo de Se (IV) e SeM. A investigação de Se nestes tecidos foi realizada uma vez que há relatos da relação de Se e os níveis dos hormônios produzidos pela glândula tireóide.

O presente estudo demonstrou que a administração parenteral tanto de selênio inorgânico como de selênio orgânico, na forma de SeM, em coelhos, tem similaridade com os resultados da administração oral das diferentes formas de Se, em aves. A suplementação com Se orgânico no estudo parenteral sub-crônico provocou um aumento do status de Se, não somente no músculo como também nos demais tecidos. Os níveis de Se no cérebro, coração e músculo de animais que receberam SeM foram maiores daqueles que receberam selenito de sódio.

O selênio na forma de selenometionina pode ser incorporado diretamente no lugar da metionina. A maior parte do Se nos tecidos está presente como selenocisteína e selenometionina. A SeM não pode ser sintetizada no organismo de animais não-ruminantes e deve ser fornecida pela dieta. Esta espécie pode substituir a metionina em uma variedade de proteínas é considerada como uma forma de estoque de Se; quando o suporte de Se é interrompido este suporte é liberado e repõe o Se no organismo [6, 7].

Estudos recentes têm proposto que selenoaminoácidos são transformados diretamente em metilselenol através da clivagem da ligação C-Se da SeM e da metilselenocisteína, sendo então transformados no seleneto (H_2Se) que será utilizado biologicamente na síntese de selenoenzimas ou excretado como metabólitos metilados como seleno-açúcar e trimetil seleneto [122].

5.5.2.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Não foram observadas diferenças significativas na atividade desta enzima após o tratamento com Se inorgânico e Se na forma orgânica em relação ao controle, como pode ser observado na Tabela 28.

Tabela 28 – Efeito do tratamento com Se (IV) e SeM sobre a atividade da enzima δ -ALA-D em nmol PGB/g proteína

	Fígado	Rim	Baço	Cérebro
Controle	10,6 \pm 0,5	6,7 \pm 1,1	2,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2
Se (IV)	9,6 \pm 1,9	7,2 \pm 0,9	2,5 \pm 0,5	1,9 \pm 0,3
Selenometionina	13,4 \pm 4,3	7,2 \pm 1,5	2,9 \pm 0,9	1,1 \pm 0,1

A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é uma metaloenzima a qual requer íons zinco para sua atividade. δ -ALA-D catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) ao porfobilinogênio na etapa inicial da biosíntese do heme. δ -ALA-D é uma enzima contendo um grupo sulfidrílico e numerosos metais como mercúrio, chumbo e outros compostos oxidantes de grupos tióis podem modificar sua atividade [123, 124, 125]. Além disso, a δ -ALA-D é inibida por substâncias que competem com zinco e/ou oxidam os grupos tióis bem como em situações de estresse oxidativo.

Os resultados da peroxidação lipídica podem ser visualizados na Tabela 29. Não foram encontradas diferenças significativas pela administração de Se, tanto como Se (IV) como selenometionina após o tratamento.

Tabela 29 – Efeito do tratamento com Se (IV) e SeM sobre os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nmol/mg proteína, em coelhos

	Fígado	Rim	Baço	Cérebro
Controle	136 \pm 95	98 \pm 31	192 \pm 27	32 \pm 5
Se (IV)	160 \pm 89	115 \pm 44	175 \pm 24	47 \pm 22
Selenometionina	200 \pm 71	102 \pm 28	214 \pm 59	41 \pm 10

A atividade Na^+ , K^+ -ATPase (Tabela 30) foi investigada como parâmetro de estresse oxidativo no cérebro. O tratamento com Se, tanto na forma inorgânica como orgânica, não

produziu efeitos tóxicos na atividade desta enzima, como pode ser observado pelos resultados encontrados.

Tabela 30 – Efeito do tratamento com selênio sobre a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase cerebral

Controle	585 ± 232
Se (IV)	597 ± 197
Selenometionina	413 ± 163

A Na⁺, K⁺-ATPase é uma enzima que contém grupos tióis, a qual pode ser sensível a agentes oxidantes. Ela está presente na membrana celular e é responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio no sistema nervoso [126]. Este processo regula as concentrações celulares de Na⁺/K⁺ e conseqüentemente seu gradiente através da membrana plasmática, o qual são necessários para funções vitais tais como co-transporte, regulação do volume celular e excitabilidade da membrana. A inativação desta enzima leva a despolarização parcial da membrana permitindo a entrada de excessiva quantidade de íons Ca²⁺ nos neurônios resultando eventos tóxicos como excitotoxicidade.

A determinação de ácido ascórbico, como parâmetro da atividade anti-oxidante, também foi avaliada no fígado, rim, cérebro e baço foi realizada nos grupos controle e tratados com Se. Embora os valores tenham sido maiores no grupo que recebeu selênio orgânico, como SeM, a diferença entre o grupo controle e o grupo que recebeu selênio inorgânico não é significativa. Os resultados estão demonstrados na Tabela 31.

Tabela 31 – Efeito do tratamento com Se inorgânico e orgânico sobre os níveis de ácido ascórbico (µg/g) em coelhos

	Fígado	Rim	Baço	Cérebro
Controle	159 ± 35	65 ± 10	380± 46	203± 27
Se (IV)	155 ± 39	72 ± 16	348 ± 61	213 ± 36
Selenometionina	214 ± 144	74± 16	358± 52	242 ± 82

O peso dos tecidos (Tabela 32) foi também avaliado para verificar a existência de alteração com o tratamento recebido. O fígado de alguns animais tratados com Se inorgânico teve seu peso aumentado, porém não foi significativo.

Tabela 32 – Peso (g) dos tecidos dos coelhos após o tratamento com Se

	Fígado	Rim	Baço	Cérebro
Controle	82 ± 2	18 ± 3	0,94 ± 0,02	8,3 ± 0,46
Se (IV)	94 ± 12	18 ± 2	0,94 ± 0,18	8,7 ± 0,74
Selenometionina	94 ± 13	18 ± 3	1,10 ± 0,47	8,8 ± 0,66

Os níveis de AST e ALT foram investigados para verificação de danos hepáticos proveniente da toxicidade do tratamento com Se. Nenhuma diferença foi observada em relação ao controle. Os possíveis danos renais que poderiam ser causados com o tratamento foram avaliados pela dosagem de uréia e creatinina. Nenhuma toxicidade foi também observada para os grupos tratados com Se. Os resultados estão expressos na Tabela 33.

Tabela 33 – Efeito do tratamento com Se (IV) e SeM sobre parâmetros toxicológicos

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	87 ± 47	51 ± 11	46 ± 5,1	1,1 ± 0,12
Se (IV)	117 ± 49	57 ± 20	43 ± 4,6	1,0 ± 0,15
Selenometionina	110 ± 54	49 ± 12	50 ± 6,1	1,1 ± 0,11

Os exames das funções hepáticas determinam o nível das enzimas hepáticas chamadas de transaminases que processam os aminoácidos no fígado; quando o fígado está lesionado estas enzimas aparecem em alto nível no sangue. A enzima TGO (transaminase glutâmica oxalacética), também chamada de aspartato aminotransferase (AST) e a TGP (transaminase glutâmica pirúvica) ou ALT (alanina amino transferase) são indicadoras de comprometimento hepatocelular agudo, tendo níveis elevados indicam algum dano hepático.

Para a avaliação da função renal destacam-se as dosagens de uréia e de creatinina. A uréia é sintetizada no fígado e seu ciclo incorpora duas moléculas de amônia cuja principal fonte provém do catabolismo protéico. A dosagem deve ser realizada sempre que houver suspeita de redução do funcionamento renal. A creatinina é uma substância nitrogenada não proteica. Tecidos musculares contêm fosfocreatina que sofre ciclização espontânea formando creatinina. A creatinina é excretada pela filtração glomerular e, qualquer anormalidade que diminua a velocidade do fluxo urinário irá resultar na elevação da concentração sérica. Não foi demonstrada nenhuma alteração significativa após o tratamento com selênio nos níveis de uréia e creatinina.

Outros ensaios foram também realizados para avaliação de alterações toxicológicas, tais como as dosagens de colesterol, triglicerídeos, LDH, bem como os níveis hormonais T3 e T4 livre. Os resultados são mostrados nas Tabelas 34 e 35, respectivamente. Estes parâmetros também não foram alterados pela administração de selênio nas formas inorgânica e orgânica.

Tabela 34 – Dosagens de colesterol, triglicerídeos e LDH em mg/dL após o tratamento com Se (IV) e SeM

	Colesterol	Triglicerídeos	LDH
Controle	16 ± 3,5	86 ± 9,0	307 ± 131
Se (IV)	14 ± 4,8	83 ± 37	344 ± 135
Selenometionina	16 ± 6,5	82 ± 41	246 ± 124

Tabela 35 - Avaliação dos níveis de T3 e T4 livre em ng/dL com o tratamento com selênio

	T3	T4 Livre
Controle	6,9 ± 0,52	0,60 ± 0,11
Se (IV)	7,3 ± 0,92	0,58 ± 0,09
Selenometionina	7,2 ± 1,79	0,52 ± 0,07

A dose administrada não causou danos toxicológicos significativos nos animais pelo tratamento com selênio nem na forma inorgânica nem forma orgânica. A toxicidade do selênio tem sido observada em animais onde a ingestão diária excede 0,44 mg/kg [7].

6. CONCLUSÕES

A primeira parte deste trabalho consistiu da avaliação de um procedimento para determinação de selênio total em amostras biológicas. As amostras investigadas foram carne, pele e gordura de frango e a amostra de levedura, que faz parte da dieta dos animais.

Considerando o procedimento de digestão da amostra, a avaliação do teor de selênio, investigado primeiramente na carne de frango e levedura, melhores resultados foram obtidos utilizando a técnica de HG AAS. As interferências causadas pela matriz ou ainda pelos reagentes de decomposição não puderam ser eliminadas, nem pelo uso do modificador, para que a determinação de Se fosse realizada por GF AAS nestas amostras.

A separação da gordura do tecido e da pele permitiu o uso de menor quantidade de reagentes para decomposição da amostra. Uma vez que o selênio foi determinado no extrato orgânico, o procedimento de extração da gordura pode ser incluído no procedimento total, e a determinação de Se neste extrato ser realizada com GF AAS sem interferências, utilizando o modificador NiNO_3 .

O estudo realizado para avaliar a influência da forma de selênio na sua distribuição em animais foi realizado em animais experimentais, aves e coelhos. As aves receberam suplementação oral através da dieta, devido à forma como são tratadas na indústria, e os coelhos foram tratados através da administração endovenosa, uma via alternativa ao tratamento oral.

O tratamento oral de aves com diferentes espécies de selênio, o selênio inorgânico, na forma de selenito de sódio, e o suporte orgânico deste elemento, na forma de levedura enriquecida, possibilitou verificar que o status de selênio no músculo foi maior nas aves tratadas na forma orgânica. Este estudo também possibilitou verificar que a concentração de selênio na gordura extraída para o grupo de aves tratadas com levedura enriquecida com selênio foi significativamente maior que o grupo que recebeu apenas selenito de sódio.

A caracterização da amostra de levedura possibilitou verificar que 92% do selênio presente estavam sob as formas orgânicas, sendo a selenometionina a espécie predominante. Esta caracterização tornou-se possível fazendo primeiramente a separação das proteínas da amostra com extração em fase sólida, utilizando colunas de polietileno em pó, e subsequente procedimento de extração com água. Verificou-se que apenas a espécie orgânica, selenometionina, foi determinada na fração não ligada às proteínas. Após o ensaio da hidrólise

ácida das proteínas foram determinadas tanto a espécie de selenometionina como selenocistina nesta amostra.

A investigação do selênio inorgânico, Se (IV), e orgânico, selenometionina, em outra via de administração que não oral foi realizado através da administração intravenosa utilizando neste caso coelhos como modelo animal. O estudo dividido em duas etapas, sendo a primeira a administração aguda, com o objetivo de avaliar a conversão do selênio inorgânico em orgânico após a administração de selenito de sódio. Os resultados mostraram que não foi possível esta avaliação, uma vez que após a administração de selênio inorgânico não houve aumento da concentração de selenometionina e selenocistina no soro dos animais, nos tempos avaliados no estudo.

Quanto à biodisponibilidade após a administração da selenometionina, a primeira parte do experimento também demonstrou que o selênio orgânico foi mais prontamente absorvido, uma vez que a concentração de selênio no grupo inorgânico, no mesmo período, se manteve maior nos tempos avaliados. Isto se deve ao fato da espécie selenometionina poder ser incorporada de maneira não específica nas proteínas no lugar da metionina. A única alteração observada foi a diminuição da concentração de selenometionina após a administração da própria selenometionina.

O tratamento sub-crônico de selênio, que foi a segunda parte do estudo da avaliação parenteral das duas diferentes formas de selênio em coelhos, mostrou que a administração de Se (IV) produziu apenas um aumento significativo da concentração de selênio no fígado, em relação ao grupo tratado com selenometionina dos tecidos investigados. Este resultado está de acordo com a literatura, demonstrando que o fígado pode ser o órgão alvo do acúmulo deste elemento. A análise dos demais tecidos, tais como cérebro, músculo, coração e baço, demonstrou que a administração da forma orgânica de selênio produziu um acúmulo maior deste elemento.

É relevante salientar que o tratamento com selenometionina aumentou significativamente a concentração de Se no soro após o tratamento sub-crônico em comparação ao selênio inorgânico. Este resultado foi o inverso da administração aguda, onde o selênio orgânico é incorporado mais rapidamente ao organismo. Isto parece estar associado ao fato do selênio no plasma sanguíneo estar na forma de selenoproteínas, podendo então a selenometionina ter sido mais prontamente incorporada às proteínas.

O estudo sub-crônico além de avaliar a distribuição nos tecidos, foi realizado para comparar a toxicidade das espécies de selênio inorgânico e orgânico após o tratamento parenteral. Uma vez que o selênio é administrado parenteralmente como elemento traço em pacientes através da forma inorgânica selenito de sódio, a proposta do presente estudo foi verificar se outra espécie de selênio, como a selenometionina, não teria toxicidade menor. Os resultados não mostraram efeitos tóxicos em nenhum dos tratamentos pela via endovenosa comparados ao controle, embora a dosagem aplicada aos animais estivesse na ordem de dez vezes ao comumente administrado parenteralmente aos pacientes.

Os resultados obtidos com o tratamento oral das aves se mostram similares ao tratamento parenteral, onde a forma orgânica produz uma disponibilidade maior de selênio em relação ao teor encontrado no músculo.

Sabe-se que mais de 50% do Se da dieta é absorvido no trato gastrointestinal, porém aparentemente a absorção não é regular. Deste modo a administração parenteral poderá ser uma alternativa eficaz, bem como o uso de uma espécie orgânica mais prontamente disponível. Para avaliar o suporte de selênio orgânico para suprir as necessidades nutricionais estudos posteriores deverão ser desenvolvidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 GUO, X., WU, L. **Distribution of Free Seleno-amino Acids in Plant Tissue of *Melilotus indica* L. Grown in Selenium-Laden Soils**, *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 39, 207-217, 1998.
 - 2 NYMAN, D. W., STRATTON, M. S., KOPLLIN, M. J. **Selenium and selenomethionine levels in prostate cancer patients**, *Cancer Detection and Prevention*, 28, 8-16, 2004.
 - 3 TAKASAGO, T., PETERS, E. E., GRAHAM, D. I., MASAYASU, H., MACRAE, I. M. **Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with antiinflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion**, *British Journal of Pharmacology*, 122, 1251-1256, 1997.
 - 4 ZHENG, Z., YASUYUKI, S., FURUTA, N. **Determination of selenoamino acids using two-dimensional ion-pair reversed phase chromatography with online detection by inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Talanta*, 59, 27-36, 2003.
 - 5 RAYMAN, M. P. **The importance of selenium to human health, review**, *The Lancet*, 356, 233-241, 2000.
 - 6 MERIAN, E. **In: Metals and Their compounds in the Environment. Occurrence, analysis and biological relevance**, VCH, Weinheim, 1991.
 - 7 BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. **In: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**, 5^o Ed. W. B. Company, USA, 2001.

-
- 8 HEYLAND, D. K., DHALIWAL, R. SUCHNER, U., BERGER, M. M. **Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient**, *Intensive Care Med.* 31, 327-337, 2005.
- 9 HATANATA, N., NAKADEN, H. YAMAMOTO, Y., MATSUO, S. FUJIKAVA, T., MATSUSUE, S. **Selenium kinetics and cHanges in glutathione peroxidases activities in patients receiving long-term parenteral nutrition and effects of supplementation with selenite**, *Nutrition*, 16, 22-26, 2000.
- 10 HILL, K., ZHOU, J., MCMAHAN, W. J., MOTLEY, A. K., ATKINS, J. F., GESTELAND, R. F., BURK, R. F. **Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse**, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 13640-13646, 2003.
- 11 ANGSTWURM, M. W. A., GAERTNER, R. **Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients**, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care*, 9, 233-238, 2006.
- 12 BURK, R. F., HILL, K. E., MOTLEY, A. K. **Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P**, *J. Nutr.*, 133, 1517S-1520S, 2003.
- 13 HOLBEN, D. H., SMITH, A. M. **The diverse role of selenium within selenoproteins: a review**, *J. Amer. Diet. Assoc.*, 99, 836-843, 1999.
- 14 KOK, F. J., HOFMAN, A., WITTERMAN, J. C. M., DE BRUIJN, A. M., KTUYSSSEN, D. H., DE BRUIJIN, M. **Decrease selenium levels in acute myocardial infarction**, *J.A.M.A.*, 261, 1161-1164, 1989.
- 15 LEUNG, F. Y. **Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition**, *Reviews*, *J. Nutr. Biochem.*, 9, 304-307, 1998.
- 16 HARRAKI, B., GUIRAUD, P., ROCHAT, M. H., ALARY, J., FAVIER, A. **Interactions related to trace elements in parenteral nutrition**, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70, 269-278, 1995.

-
- 17 BAUM, M. K., SHOR-POSNER, G., LAI, S., ZHANG, G., LAI, H., FLEATHER, M. A., SAUBELICH, H., PAGE, J. B. **High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency**, *J. Acquir. Immune Def. Syn. Hum. Retrovirus*, 15, 370-374, 1997.
- 18 NOGUEIRA, C. W., QUINHONES, E. B., JUNG, E. A. C., ZENI, G., ROCHA, J. B. T. **Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide**, *Inflammation Research*, 52, 56-63, 2003.
- 19 ROTRUCK, J. T., POPE, A. L., GANTHER, H. E., SWASON, A. B., HAFEMAN, D. G. HOEKSTRA, W. G. **Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase**, *Science*, 179, 588-590, 1973.
- 20 ZACHARA, B. A., ADAMOWICZ, A., TRAFIKOWSKA, U., TRAFIKOWSKA, A., MANITIUS, J., NARTOWICZ, E. **Selenium and glutathione levels, and glutathione peroxidase activities in blood components of uremic patients on hemodialysis supplemented with selenium and treated with erythropoietin**, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 15, 201-208, 2001.
- 21 FERREIRA, K. S., GOMES, J. C., BELLATO, C. R., JORDÃO, C. P. **Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil**, *Pan. Am. J. Public Health*, 11, 172-177, 2002.
- 22 LEVANDER, O. A., BURK R. F. **Report on the 1986 ASPEN research workshop on selenium in clinical nutrition**, *JPEN J. Parenter nter Nutr.* 10, 545-549, 1986.
- 23 XIA, Y., HILL, K. E.,BYRNE, D. W. **Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China**, *J. Clin. Nutr.*, 81, 829-834, 2005.
- 24 TERADA, A., YOSHIDA, M., SEKO, Y., KOBAYASHI, T., YOSHIDA, K., NAKADA, M., NAKADA, K., ECHIZEN H., OGATA, H. RIKIHISA, T. **Active oxygen species generation and cellular damage by additives of parenteral preparations: Selenium and sulfhydryl compounds**, *Nutrition*, 15, 651-655, 1999.

25 DE BEM, A. F., PORTELLA, R. L. PEROTTONI, J., BECKER, E., BOHRER, D., PAIXÃO, M. W., NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. T. **Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods**, *Chmico-Biological Interactions*, 162, 1-10, 2006.

26 YOUNG, V. R., NAHAPETIAN, A., JANGHORBANI, M. **Selenium bioavailability with reference to human nutrition**, *Am. J. Clin. Nutr.*, 35, 1076-1087, 1982.

27 ECHEVARRIA. M. G., HENRY, P. R., AMMERMAN, C. B., RAO, P. V. **Effects on time and dietary selenium concentration as sodium selenite on tissue selenium uptake by sheep**, *J. Anim. Sci.*, 66, 2299-2305, 1998.

28 PAVLATA, L., ILLEK, J., PECHOVÁ, A. **Blood in tissue selenium concentrations in calves treated with inorganic or organic selenium compounds – a comparison**, *Acta Vet. Brno*, 70, 19-26, 2001.

29 BEALE, A. M., FASULO, D. A., CRAIGMILL, A. L. **Effects of oral and parenteral selenium supplements on residues in meat, milk and eggs**, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 115, 126-150. 1990.

30 RASMUSSEN, O. K. **Selenium concentration and deposition, performance, and carcass quality in pigs fed different levels of sodium selenite**, *Acta Agr. Scand*, 24, 115-125, 1974.

31 KLAASSEN, C. D., AMDUR, M. O., DOUL, J. **In: Casarett and Doull's Toxicology, The basic science of Poisons**, 2^o Ed., New York, p. 409-467, 1980.

32 SUZUKI, K. T., DOI, S., SUZUKI, N. **Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite**, *Toxic. Appp. Pharmacology*, 217, 185-195, 2006.

-
- 33 REID, M. E., STRATTON, M. S., LILLICO, A. J. **A report of high dose selenium supplementation: response and toxicities**, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18, 69-74, 2004.
- 34 WELZ, B., SCHUBERTJACOBS, M., SCHLEMMER, G. **Determination of selenium in body-fluids using hydride-generation and graphite-furnace atomic absorption spectrometry**, *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 2 (2), 124-125, 1988.
- 35 WELZ, B. SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- 36 CUTTER, G. A. **Elimination of nitrite interference in the determination of selenium by hydride generation**, *Anal. Chim. Acta* 149, 391-394, 1983.
- 37 GUO, X. M., STURGEON, R. E., MESTER, Z., & GARDNER, G. J. **UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry**. *Analytical Chemistry*, 75, 2092-2099, 2003.
- 38 ALLER, A. J. **Remarks on the interference of sulfate in the determination of selenium by electrothermal atomic absorption**, *Anal. Sci.* 12, 977-980, 1996.
- 39 NI, Z., HE, B., HAN, H. **Minimization of sulfate interference in selenium determination by furnace atomic absorption spectroscopy**, *Spectrochim. Acta B* 49, 947-953, 1994.
- 40 WELZ, B, BOZSAI, G., SPERLING, M., RADZIUK, B. **Palladium nitrate-magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 4: Interference of sulfate in the determination of selenium**, *J. Anal. At. Spectrom.* 7, 505-509, 1992.
- 41, RADZIUK, B., THOMASEN, Y. **Chemical modification and spectral interferences in selenium determination using Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry**, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 397-403.

42 LEBIHLAN, A., CABON, J. Y., ELLEOUE, C. **Spectral interference related to the presence of nitrate and nitrogen monoxide in Zeeman-corrected atomic-absorption spectrometry with electrothermal atomization**, *Analisis* 20, 601-604, 1992.

43 FERNANDEZ, F. J., BEATY, M. M. **Elimination of spectral interference in the determination of selenium in nickel-base alloys using Zeeman background correction**, *Spectrochim. Acta B* 39, 519-523, 1984.

44 B. WELZ, B., SCHUBERT-JACOBS, M. **Evaluation of a flow-injection system and optimization of parameters for hydride generation atomic absorption spectrometry**, *At. Spectrosc.* 12, 91-104, 1991.

45 LAMBERT, D. F., TUROCZY, N. J. **Comparison of digestion methods for the determination of selenium in fish tissue by cathodic stripping voltammetry**, *Anal. Chim. Acta* 408, 97-102, 2000.

46 WALKER, H. H., RUNNELS, J.H., MERRYFIELD, R. **Determination of trace quantities of selenium in petroleum and petroleum products by atomic absorption spectrometry**, *Analytical Chemistry*, 48, 2056,2060, 1976.

47 WELZ, B., & MELCHER, M. **Mechanisms of transition metal interference in hydride generation atomic-absorption spectrometry. Part 1. Influence of cobalt, copper, iron and nickel on selenium determination**, *The Analyst*, 109, 569-572, 1984.

48 BROWN JR., R. M., FRY, R. C., MOYERS, J. L., NORTHWAY, S. J., DENTON, M. B., & WILSON, G. S. **Interference by volatile nitrogen oxides and transition-metal catalysis in the preconcentration of arsenic and selenium as hydrides**. *Analytical Chemistry*, 53, 1560-1566, 1981.

49 D'ULIVO, A., GIANFRANCESCHI, L., LAMPUGNANI, L., & ZAMBONI, R. **Masking agents in the determination of selenium by hydride generation technique**, *Spectrochimica Acta B*, 57, 2081-2094, 2002.

50 EDIGER, R. D., **Atomic absorption analysis with graphite furnace using matrix modification**, *Atomic Absorption Newsletter*, 14, 127-130, 1975.

51 GAYON, J. M. M., URIA, J. E. S., & SANZ-MEDEL, A. **Selenium determination in serum by eletrothermal atomic absorption espectrometry with deuterium background correction**, *Quimica Analitic*, 16, 131-139, 1997.

52 GUTZ, I. G. R., CAVICCHIOLI, A. **O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica**, *Química Nova*, 26, 913, 2003.

53 DUNEMANN, L., MEINERLING, M. **Comparison of different microwave-based digestion techniques in view of their application to fat-rich foods**, *Frezenius J Anal. Chem.*, v. 342, p. 714, 1992.

54 MAYER, D. L., FRITZ, J. S. **Semi-micro solid-phase extraction of organic compounds from aqueous and biological samples**. *J. Chromatogr. A*, 773, 189, 1997.

55 DIAZ-ALARCÓN, J., NAVARRO-ALARCÓN, M., LÓPES-MARTINEZ, M. C., DE LA SERRANA, H. L. **Determination of selenium in fresh fish from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake**, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 334-337, 1994.

56 PIWONSKA, J., KAISER, G., TÖLG, G. **Determination of selenium at ng/g and pg/g levels by hydride generation atomic absorption spectrometry in biotic materials**, *Frezenius Z. Anal. Chem.* 321, 225-234, 1985.

57 HE, Y., MOREDA-PIÑEIRO, J., CERVERA, M. L., DE LA GUARDIA, M. **Direct determination of dissolved selenium (IV) and selenium (VI) in sea-water by continuous flow**

hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, 289-293, 1998.

58 BRINDLE, I., LUGOWSKA, E. **Investigations into mild conditions for reduction of Se (VI) to Se (IV) and for hydride generation in determination of selenium by direct current plasma atomic spectrometry**, *Spectroc. Acta B*, 52, 163-176, 1997.

59 JOHANSSON, M., BORDIN, G., RODRIGUES, A. R. **Feasibility study of ion-chromatography microwave assisted online species conversion hydride generation atomic absorption spectrometry for selenium speciation analysis of biological material**, *Analyst*, 125, 273-279, 2000.

60 MÉNDEZ, H., LAVILLA, I., BENDICHO, C. **Mild sample pretreatment procedures based on photolysis and sonolysis-promoted redox reactions as a new approach for determination of Se(IV), Se(VI) and Se(-II) in model solutions by the hydride generation technique with atomic absorption and fluorescence detection**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 1379-1385, 2004.

61 VILANÓ, M., PADRÓ, A., RUBIO, R., RAURET, G. **Organic and inorganic selenium speciation using high-performance liquid chromatography with UV irradiation and hydride generation-quartz cell atomic absorption spectrometry detection**, *J. Chromatogr. A*, 819, 211-220, 1998.

62 CAPELO, J. L., FERNANDEZ, C., PEDRAS, B. SANTOS, P., GONZALEZ, P., VAZ, C. **Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS**, *Talanta*, 68, 1442-1447, 2006.

63 BIRD, S. M., UDEN, P. C., TYSON, J. F., BLOCK, E. DEYONER, E. **Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry**, *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 785-788, 1997.

64 CHASSAIGNE, H., CHERY, C. C., BORDIN, G. RODRIGUEZ. A. R. **Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material**, J. Chromatogr. A, 976, 409-422, 2002.

65 ENCINAR, J. R., 'SLIWKA-KASY'NSKA, M. POLATAJKO, A., VACCHINA, V., SPUNAR, J. **Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast**, Anal. Chim Acta, 500, 171-83, 2003.

66 CAPELO, J. L., XIMENEZ-EMBÚN, P., MADRID-ALBARRÁN, Y., CÁMARA, C., **Enzimatic probe sonication: enchancement of protease-catalysed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast**, Anal. Chem. 76, 233-237, 2004.

67 MORENO, P., QUIJANO. M. A., GUTIÉRREZ, A. M., PÉRES-CONDE, M. C., CÁMARA, C. **Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry**, Anal. Chim. Acta, 524, 315-327, 2004.

68 YANG, L. STURGEON, R. E., WOLF, W. R., GOLDSCHIMIDT, R. J., MESTER, Z. **Determination of selenomethionine in yeast using CNBr derivatization and species specific isotope dilution GC ICP-MS and GC-MS**, J. Anal. At. Spectrom., 19, 1448-1453, 2004.

69 CAVALLI, S., CARDELLICCHIO, N. **Direct determination of seleno-amino acids in biological tissues by anion-exchange separation and eletrochemical detection**, J. Chromatogr. A, 706, 429-436, 1995.

70 BLANCHARD, J. **Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid-chromatographic analysis**, J. Chromatogr., 226, 455-460, 1981.

71 ANDERSON, D. J., **High-performance liquid chromatography (direct injection techniques)**, Anal. Chem., 65, 434R, 1993.

-
- 72 TORRE, M., MARINA, M. L. **The state-of-the-art of ligand-loaded complexing resins-characteristics and applications**, Crit. Rev. Anal. Chem., 24 (5-6), 327, 1994.
- 73 MENDONÇA, J. K. A. **Desproteinização *online* em pré-coluna de polietileno em pó para a determinação de Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ em soro sanguíneo por HPLC**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2000.
- 74 RAMIREZ, A. **Clean up de amostras de fluidos biológicos através da adsorção dos componentes do soro sanguíneo e urina em polímeros sintéticos**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2003.
- 75 JANAK, J., BILLET, H. A. H., FRANK, J., LUYBEN, K., HUSEK, P. **Separation of selenium analogs of sulfur-containing amino-acids by high-performance liquid-chromatography and high-resolution gas chromatography**, J. Chromatogr. A, 677, 192-196, 1994.
- 76 VEZINA, D., BEAU, G. **High-performance liquid chromatography of selenium in biological samples**, J. Chromatogr. 426, 385-391, 1988.
- 77 GILON, N., ASTRUC, A., ASTRUC, M., POTIN-GAUTIER, M. **Selenoamino acid speciation using hplc-etas following an enzymatic-hydrolysis of selenoprotein**, Appl. Organomet. Chem., 9, 623-628, 1995.
- 78 KOTREBAI, M., BIRD, S. M., TYSON, J.F., BLOCK, E., UDEN. P.C. **Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry and by referenced electrospray ionization-mass spectrometry**, Spectrochim. Acta B, 54, 1573-1591, 1999.
- 79 QUIJANO. M. A., GUTIÉRREZ, A. M., PÉRES-CONDE, M. C., CÁMARA, C. **Determination of selenium species in human urine by high performance liquid**

chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, 50, 165-173, 1999.

80 DEYL, Z.; HORAKOVA, M. **Profiling of amino-acids in body-fluids and tissues by means of liquid-chromatography**, *J. Chromatogr.*, 379, 177-250, 1986.

81 BAFFI, F.; IANNI, M. C.; CARDINALE, A. M. **Study of reversed-phase c-18-silica in liquid-chromatography for the determination of free dissolved amino-acids and copper (II) amino- acid complexes at the picomole level in marine matrices** *Anal Chim. Acta.*, 260 (1), 99-106, 1992.

82 GEORGI, G., PIETSCH, C., SAWATZKI, G. **High-performance liquid-chromatographic determination of amino-acids in protein hydrolysates and in plasma using automated precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde 2-mercaptoethanol**, *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, 613 (1), 35-42, 1993.

83 FERMO, I., VECCHI, E., DIOMEDE, L. **Serum amino-acid-analysis with precolumn derivatization- comparison of the ortho-phthaldialdehyde and N,N- diethyl-2,4-dinitro-5-fluoroaniline methods**, *J. Chromatogr- Biomed. Applic.*, 534, 23-35, 1990.

84 JONES, B. N.; PAÄBO, S.; STEIN, S. **Amino-acid-analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved ortho-phthaldialdehyde pre-column labeling procedure**, *J. Liq. Chromatogr.*, 4 (4), 565-586, 1981.

85 HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. **Amino-acid-analysis by reverse-phase high-performance liquid-chromatography-precolumn derivatization with phenylisothiocyanate**, *Anal. Biochem.*, 136 (1), 65-74, 1984.

86 WIEDMEIJER, V. T., PORTERFIELD, S. P., HENDRICH, C. E. **Quantitation of DNS-amino acids from body-tissues and fluids using high-performance liquid-chromatography**, *J. Chromatogr.*, 231 (2), 410-417, 1982.

87 EINARSSON, S., JOSEFSSON, B., LAGERKVIST, S. **Determination of amino-acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid-chromatography**, J. Chromatogr., 282, 609-618, 1983.

88 MORTON, R. C., GERBER, G. E. **Amino-acid analysis by dinitrophenylation and reverse-phase high-pressure liquid-chromatography**, Anal. Biochem., 170 (1), 220-227, 1988.

89 KOCHBAR, S., CHRISTEN, P. **Amino-acid analysis by high-performance liquid-chromatography after derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide**, Anal. Biochem., 178 (1), 17-21, 1989.

90 FÜRST, P., POLLACK, L., GRASER, T. A. **Appraisal of 4 precolumn derivatization methods for the high-performance liquid-chromatographic determination of free amino-acids in biological-materials**, J. Chromatogr., 499, 557-569, 1990.

91 MCCLUNG, G., FRANKENBERGER, W. T. **Comparison of reverse-phase high-performance liquid-chromatographic methods for precolumn-derivatized amino-acids**, J. Liq. Chromatogr., 11 (3), 613-646, 1988.

92 TCHERKAS, Y. V. DENISENKO, A. D. **Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection**, J. Chromatogr. A, 913, 309-313, 2001.

93 COOPER, J. D. H., TURNEL, D. C., **Fluorescence detection of cystine by ortho-phthalaldehyde derivatization and its separation using high-performance liquid-chromatography**, J. Chromatogr., 227, 158, 1982.

-
- 94 HAWKES, W. C., KUTNIK, M. A. **High-performance liquid chromatography determination of selenocysteine with the fluorescent reagent, N-(iodoacetylaminoethyl)-5-naphthylamine-1-sulfonic acid**, *J. Chromatogr.*, 576, 263-270, 1992.
- 95 BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding**. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 96 FARMACOPÉIA AMERICANA, **United States of Pharmacopeia (USP)**, 23.
- 97 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR A. L., RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin-Phenol reagents**. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- 98 CISTERNAS, J. R., VARGA, J. MONTE, O. **In: Fundamentos da bioquímica experimental**, 2º Ed, E. Ateneu, São Paulo, 2001.
- 99 BOHRER, D., POMBLUM, S. G., NASCIMENTO, P. C., BASTIANELLO, J. S., RAMIREZ, A. **Determination of nickel, manganese, copper and zinc in blood serum by atomic absorption spectrometry after deproteinization by microwave irradiation**, *Anal Letters*, 33 (7), 1265-1279, 2000.
- 100 BERSCHNEIDER, F., HESS, M., NEUFFER, K. WILLER, S. **LD 50 values and selenium concentration in rabbit organs after parenteral administration of selenite and determination of toxicity of uroselevit pro inj**, *Ach. Exp. Veterinarmed.*, 30 (5), 627-632, 1976.
- 101 FOSSATI P, PRINCIPE L. **Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide**, *Clin Chem.* 28, 2077–2080, 1982.
- 102 OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction**, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358, 1979.

-
- 103 SASSA, S. **Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay**, *Enzime*, 28, 133-145, 1982.
- 104 JACQUES-SILVA, M. C., NOGUEIRA, C. W., BROCH, L. C. FLORES, E. M., ROCHA, J. B. T. **Diphenil diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice**, *Pharmacol. Toxicol.*, 88, 19-125, 2001.
- 105 NÈVE, J., HANOCQ, M., MOLLE, L., & LEFEBVRE, G. **Study of some systematic errors during the determination of total selenium and some of its ionic species in biological materials**, *The Analyst*, 107, 934-941, 1982.
- 106 JANGHORBANI, M., TING, B. G. T., NAHAPETIAN, A., & YOUNG, V. R. **Conversion of urinary selenium to selenium (IV) by wet oxidation**, *Analytical Chemistry*, 54, 1188-1190, 1982.
- 107 HOLME, D. J., PECK, H. **Analytical biochemistry**, 3^o Ed. Prentice Hall, England, 1998.
- 108 FEKKES, D. **State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples**, *J. Chromatogr B*, 682 (1), 3-22, 1996.
- 109 PIMENTEL, M. F., BARROS NETO, B. **Calibração: uma revisão para químicos analíticos**, *Quím. Nova*, 19, 268-277, 1996.
- 110 INMETRO DOQ-DQUAL-008, março 2003.
- 111 FRANCO, E., DAVATZ, A., RICHERT, R. **Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester**, *J. Chromatogr. B*, 686, 77-93, 1996.
- 112 CAUSON, R., **Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion**, *J. Chromatogr. B*, 689, 175-180, 1997.

113 CLAPP, C. H., SWAN, J. S., PEECHMANN, J. L. **Identification of amino acids in unknown dipeptides, a derivatization with 9-fluoremethy chloroformate and HPLC**, J. Chem. Education, 69, 122-126, 1992.

114 REYES, L. H., SANZ, M. F., ESPÍLEZ, P. H., MARCHANTE-GAYÓN, J.M. ALONSO, J. I. G., SANZ-MEDEL, A. **Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine: application to its determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis – HPLC-ICP-MS**, J. Anal. At. Spectrom., 19, 1230-1235, 2004.

115 TECHNICAL NOTE, DIONEX. **Determination of the amino acid content of peptides by AAA-Direct.**

116 SCOTT, M. L., THOMPSON, J. N. **Selenium content of feedstuffs and effects of dietary selenium levels upon tissue selenium in chicks and poults.** Poult Sci. 50, 1742-1748, 1971.

117 SCHOTT, K. L. **Quantificação da glutatona reduzida em eritrócitos humanos por HPLC-UV: validação e aplicação**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

118 MICHALKE, B. **Selenium speciation in human serum of cystic fibrosis patients compared to serum from healthy persons**, J. Chromatogr. A 1058, 203-208, 2004.

119 PATCHING, S. G., GARDINER, P. **Recent developments in selenium metabolism and chemical: a review**, J. Trace Elem. Med. Biol. 13(4), 193-214, 1999.

120 ORTMAN, K., PEHRSON, B. **Effect of selenate as a feed supplement to diary cows in comparison to selenite and selenium yeast**, J. Anim. Sci., 77, 3365-3370, 1999.

-
- 121 MACIEL, E. N., FLORES, E.M. M., ROCHA, J. B. T., FOLMER, V. **Comparative deposition of diphenyl diselenide on liver, kidney and brain of mice**, Bull. Environ. Toxicol., 70, 470-476, 2003.
- 122 SUSUKI, K. T., KURASAKI, K., OGAWA, S., SUSUKI, N. **Metabolic transformation of methylselenic acid through key selenium intermediate selenide**, Toxic. Appl. Pharmacol., 215, 189-197, 2006.
- 123, SANTOS, F. W. **Estudos dos quelantes sulfidrílicos (BAL, DMPS e DMSA: efeitos sobre parâmetros toxicológicos e modelos de intoxicação por cádmio**, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.
- 124 ROCHA, J. B. T., PEREIRA, M. E., EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R. S., SOUZA, D. O. **Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney, and blood of suckling rats**, Toxicology, 100, 27-37, 1995.
- 125 RODRIGUES, A. L. S., ROCHA, J. B. T., PEREIRA, M. E., SOUZA, D. O. **Delta aminolevulinic acid dehydratase activity in weaning and adult rats exposed to lead acetate**, Environ. Contam. Tox., 57, 47-53, 1996.
- 126 FOLMER, V., SOARES, J. C. M., ROCHA, J. B. T. **Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in diet**. I. J. B. C. B., 34, 1279-1285, 2002.