



ELIDIANE GOMES DA SILVA

**COMBINAÇÃO DE TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE
SELÊNIO**

**CAMPINAS
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ELIDIANE GOMES DA SILVA

**COMBINAÇÃO DE TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE
SELÊNIO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FABIO AUGUSTO**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR ELIDIANE GOMES DA SILVA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI
ARRUDA.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38c Silva, Elidiane Gomes da (1983-).
Combinação de técnicas para a determinação de espécies de selênio / Elidiane Gomes da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.
Coorientador: Fabio Augusto.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Selênio. 2. Especificação química. 3. SMPE-GF. 4. GC-MS. 5. HPLC-ICP MS. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Augusto, Fabio. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Combination of analytical techniques for selenium species determination

Palavras-chave em inglês:

Selenium
Chemistry speciation
SPME-GF
GC-MS
HPLC-ICP MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]
Márcia Andréia Mesquita Silva da Veiga
Valderi Luiz Dressler
Jarbas José Rodrigues Rohwedder
Adriana Vitorino Rossi

Data de defesa: 18/10/2012

Programa de pós-graduação: Química

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o SENHOR, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar danos, planos de dar-lhes esperança e um futuro” (Jeremias 29.11).

Agradecimentos

A Deus, pois Ele é bom e sua misericórdia dura para sempre. A Ele seja toda honra e glória.

Aos meus pais, Maria da Conceição e Francisco de Assis, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui; aos meus irmãos, Edson, Mariza e Eliseu, e os meus sobrinhos, Bruno, Maria Rita e Mariely. Eu os amo verdadeiramente.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela orientação, confiança e contribuição na minha formação.

Ao Prof. Dr. Fabio Augusto, pela co-orientação e à Profa. Dra. Anne Hélène pela boa convivência e por ter feito parte da minha formação.

A Capes, pela bolsa concedida, e a FAPESP e CNPq, por também apoiarem financeiramente.

Ao Instituto de Química da UNICAMP. Ao corpo docente, pela formação acadêmica; ao Jose, Rita e Miran, pela ajuda nas análises, e a todos os funcionários que direta ou indiretamente contribuíram.

À Lidiane Raquel Verola Mataveli, pela amizade e disposição em sempre ajudar.

Aos amigos, companheiros da família GEPAM: Adilson, Alessandra Paula, Alessandra Sussulini, Ana Cristi, Aline, Bruna, Cícero, Daiane, Eduardo, Eraldo, Fabiana, Gustavo, Heloísa, Herbert, Ivanilce, Kelly, Marcelo, Renata, Geovana, Rodrigo, Silvana. Obrigada pela amizade, disposição, carinho e respeito.

À Francisca Diana, pela convivência, apoio e amizade, bênção de Deus em minha vida.

À família que ganhei na Igreja Batista Vida Nova de Campinas, herança do Senhor, uma recompensa que Ele me deu. Eu os amo muito.

Aos meus amigos conterrâneos (Adriano, Benedito, Clécio, Eva, Flamys, Laiane, Lucas, Lilia, Lívia, Márcia, Samuel, Sérgio, Tiago) pelo apoio e amizade.

A todos os colegas que conheci na UNICAMP, muito obrigada pelo bom convívio.

Curriculum vitae

Dados pessoais:

Elidiane Gomes da Silva

Nacionalidade: brasileira, nascida em 16/01/1983 (Teresina/PI)

e-mail: elydyany@hotmail.com

Formação acadêmica:

Mestrado em Química (2006-2008)

Universidade Federal do Piauí

Título: Pedúnculos de diferentes cajueiros: uma abordagem analítica.

Orientador: Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita

Graduação em Licenciatura Plena Em Química (2001-2005)

Universidade Federal do Piauí

Iniciação científica:

2004-2005 - Determinação de cálcio, magnésio, ferro e fósforo no caju.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita.

2003-2004 - Determinação de vitamina C em suco natural de caju.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita.

2002-2003 - Desenvolvimento de método para determinação de vitamina C em suco de caju industrializado

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita.

Produção científica:

- Artigos

Silva, E. G.; Augusto, F.; Arruda, M. A. Z. Determination of Se using a solid-phase micro-extraction device coupled to a graphite furnace and detection by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, v. 137, p. 3841-3846, 2012.

Lima, E. S.; Silva, E. G.; Moita Neto, J. M.; Moita, G. C. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína. *Química Nova*, v. 30, p. 1143-1146, 2007.

Souza, C. M. L.; Moita Neto, J. M.; Silva, E. G.; Araujo, F. D. S. Composição do coco babaçu triturado integralmente. *Química no Brasil*, v. 1, p. 21-24, 2007.

- Trabalhos apresentados em eventos

Silva, E. G.; Mataveli, L. R. V.; Arruda, M. A. Z. Selenium speciation using HPLC-DRC-ICP-MS. In: IV Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2011, Campinas. Forma de apresentação: painel.

Silva, E. G.; Augusto, F.; Arruda, M. A. Z. Determination of Se(IV) using SPME coupled to the graphite furnace and detection by gas chromatography-mass spectrometry. In: Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVII, 2011, Búzios. Forma de apresentação: painel.

Silva, E. G.; Arruda, M. A. Z. Extraction of piaszelenol using SPME coupled to the graphite furnace and detection by GC-MS. In: Eleventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2010, Mar del Plata. Forma de apresentação: painel.

Silva, E. G.; Augusto, F.; Arruda, M. A. Z. Extração simultânea de dimetilseleneto e dimetildisseleneto por SPME e identificação por GC MS. In: 2º Encontro Brasileiro sobre Especificação Química - EspeQBrasil, 2010, São Pedro. Forma de apresentação: painel.

Total de trabalhos apresentados em eventos nacionais: 11

Total de trabalhos apresentados em eventos internacionais: 2

Premiação:

Primeiro lugar do II Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação e II Encontro de Pós-Graduação da UFPI, Universidade Federal do Piauí-2007.

Histórico profissional:

- Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP

Participação no Comitê de Apoio do EspeQBrasil-2008, realizado em 2008 em São Pedro/SP.

Participação no Comitê de Apoio do EspeQBrasil-2010, realizado em 2010 em São Pedro/SP.

Apoio à docência parcial em Química Analítica IV. Período: 08/2011 a 12/2011.

- Brasil Ecodiesel Comércio e Indústria de Óleos Vegetais LTDA

Cargo: analista químico (análise de biodiesel). Período: 12/2005 a 03/2006.

Resumo

COMBINAÇÃO DE TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE SELÊNIO. No Capítulo 1, é proposta a combinação das técnicas de microextração em fase sólida com a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite para extração de Se(IV) derivado, seguida de detecção por GC-MS. O método é aplicado com sucesso na determinação de Se total em materiais de referência certificado (BCR-414 and SRM 1643e), sendo obtidas recuperações de 97% para a água (SRM 1643e) e 101% para o plâncton (BCR-414). O método também é aplicado para determinação de selênio em amostra de medicamento manipulado a base de quelato de selênio. No Capítulo 2, a técnica de HPLC com troca aniônica acoplada a ICP-MS, é usada para identificação e determinação de quatro espécies de selênio (Se(IV), Se(VI), selenometionina e selenocistina) em amostras biológicas (plâncton, castanha-do-pará, urina e folhas de girassol). A extração das espécies, presente em plâncton (BCR-414), castanha-do-pará e folhas de girassol, é realizada com água, e um teste de simulação de digestão gastrointestinal também é aplicado para identificar as espécies de selênio bioacessíveis em castanha do Pará. O Se(IV) é a principal espécie extraída no plâncton, com maior concentração de selênio no extrato. A castanha-do-pará possui, principalmente, selenocistina e selenometionina, sendo que somente a selenometionina é identificada como bioacessível. O estudo de especiação de selênio por HPLC-ICP-MS sugere a presença de selenocistina em urina de homens e mulheres. As folhas de girassol, de plantas cultivadas com solução de selenito apresentam um maior número de espécies de selênio, em comparação a planta controle.

Abstract

COMBINATION OF ANALYTICAL TECHNIQUES FOR SELENIUM SPECIES DETERMINATION. In Chapter 1, the combination of the techniques of solid phase microextraction with atomic absorption spectrometry graphite furnace is proposed, using an SPME fiber device and graphite furnace (GF) for extracting Se compounds. The extracted compounds are separated and detected by GC-MS. The method is successfully applied to the total Se determination in certified reference materials (BCR-414 and SRM 1643e). The SPME-GF method combined with GC-MS is also applied to the determination of total selenium in a commercial drug sample (selenium chelate). In Chapter 2, the anion-exchange HPLC technique coupled to ICP-MS is used for identification and determination of four selenium species (Se(IV), Se(VI), selenomethionine and selenocystine) in biological samples (plankton, Brazil nuts, urine and sunflower leaves). The extraction of the species is carried out using water for plankton (BCR-414), Brazil nuts and sunflower leaf. A simulated gastrointestinal digestion is also used to identify bioaccessible selenium in Brazil nuts. The Se(IV) is the predominant specie in the plankton, with the highest selenium concentration in the extract. The Brazil nuts contain selenomethionine and selenocystine species, but only selenomethionine is identified as bioaccessible. The study of selenium speciation by HPLC-ICP-MS suggests the presence of selenocystine in the urine of women and men. The sunflower leaves of plants cultivated with selenite have a higher number of selenium species compared to the control plants.

Índice

Lista de abreviaturas.....	xxiii
Lista de tabelas	xxvii
Lista de figuras	xxix
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Selênio.....	3
2.2. Análise de especiação	6
2.3. Microextração em fase sólida (SPME).....	10
2.3.1. Análise quantitativa por SPME.....	14
2.3.2. SPME e determinação de selênio.....	15
2.3.4. Acoplamento SPME-GF.....	16
2.4. Cromatografia.....	19
2.4.1. Cromatografia gasosa	20
2.4.1.1. Derivação	21
a) Derivação de espécies de selênio	22
2.4.1.2. Detecção	24
2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	25
2.4.2.1. Cromatografia por exclusão.....	26
2.4.2.2. Cromatografia por troca iônica	29
2.4.2.3. Cromatografia de fase reversa	30
2.4.2.4. Detecção	31
2.5. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.....	33

CAPÍTULO 1

Acoplamento SPME-GF e determinação de selênio por GC-MS	35
1.1. Objetivo.....	37
1.2. Parte experimental	39
1.2.1. Equipamentos e acessórios	39
1.2.2. Gases, reagentes e soluções	40
1.2.3. Condições do GC-MS <i>ion-trap</i>	41
1.2.4. Condições do GC-MS quadrupolo no modo SIM.....	41
1.2.5. Extração de DMSe e DMDS ₂ usando SPME no modo <i>headspace</i>	42
1.2.6. Derivação do Se(IV) em frasco de vidro para SPME	42
1.2.7. Extração de Se(IV) derivado por SPME no modo direto	43
1.2.8. Acoplamento SPME-GF.....	43
1.2.8.1. Extração por SPME-GF.....	45
1.2.8.2. Modificações para a reação de formação do complexo piázoselenol	46
1.2.8.3. Derivação e extração no forno de grafite	47
1.2.8.4. Avaliação das condições de derivação e extração no GF	48
a) Avaliação do volume de HNO ₃	49
b) Concentração do derivante DCFDA	49
c) Temperatura de derivação	49
d) Tempo de extração e derivação.....	50
e) Temperatura de extração.....	50
1.2.9. Determinação de selênio.....	51
1.2.9.1. Parâmetros analíticos.....	51
1.2.9.2. Preparo das amostras	53
1.3. Resultados e Discussão.....	55
1.3.1. Extração simultânea de espécies de Se por SPME	55
1.3.2. Derivação do Se(IV) e extração por SPME (método original).....	57

1.3.3. Extração do complexo piazoselenol usando SPME acoplada ao forno de grafite.....	59
1.3.4. Avaliação das modificações para a derivação do Se(IV) com DCFDA ..	61
1.3.5. Derivação e extração no forno de grafite.....	65
1.3.6. Avaliação das condições de derivação e extração	68
1.3.7. Determinação de selênio por GC-MS	74
1.4. Conclusões	77

CAPÍTULO 2

Especiação de selênio por HPLC-ICP-MS	79
2.1. Objetivo.....	81
2.2. Parte Experimental	83
2.2.1. Equipamentos e acessórios	83
2.2.2. Gases, reagentes e soluções	84
2.2.3. Amostras	84
2.2.4. Determinação das espécies de selênio por HPLC-ICP-MS.....	86
2.2.5. Extração das espécies de selênio.....	88
2.2.5.1. Extração com água	88
2.2.5.2. Teste de bioacessibilidade	89
2.2.6. Coleta das Frações.....	89
2.2.7. Análise da urina.....	90
2.2.8. Determinação de selênio total por ICP-MS	90
2.2.9. Identificação de espécies de selênio por ESI-MS	92
2.3. Resultados e Discussão.....	95
2.3.1. Separação das espécies de selênio por HPLC-ICP-MS	95
2.3.2. Espécies de selênio em plâncton	97
2.3.3. Espécies de selênio em castanha-do-pará.....	98

2.3.4. Espécies de selênio na urina	102
2.3.5. Espécies de selênio em folhas de girassol	106
2.3.5.1. Análise por HPLC-ICP-MS.....	106
2.3.5.2. Análise por ESI-MS	108
2.4. Conclusões	113
3. Conclusões Finais.....	115
Referências Bibliográficas.....	117

Lista de abreviaturas

AAS	do inglês, <i>atomic absorption spectrometry</i>
ADP	adenosina difosfato
AED	do inglês, <i>atomic emission detection</i>
AES	do inglês, <i>atomic emission spectrometry</i>
AEX	do inglês, <i>anion-exchange</i>
AFS	do inglês, <i>atomic fluorescence spectroscopy</i>
ATP	adenosina trifosfato
CAR	Carboxen
CEX	do inglês, <i>cation-exchange</i>
CID	do inglês, <i>collision-induced dissociation</i>
Cis	Cisteína
CW	Carbowax
DCFDA	4,5-dicloro1,2-fenilenodiamino
DEDSe	Dietildisseleneto
DESe	Dietilseleneto
DMDSe	Dimetildisseleneto
DMSe	Dimetilseleneto
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRC	do inglês, <i>dynamic reaction cell</i>
DVB	Divinilbenzeno
ECD	do inglês, <i>electron-capture detection</i>
EDTA	do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ESI	do inglês, <i>Electrospray ionization</i>
FID	do inglês, <i>flame ionization detector</i>

GC	do inglês, <i>gas chromatography</i>
GEPAM	grupo de espectrometria, preparo de amostra e mecanização
GF	do inglês, <i>graphite furnace</i>
GSH	glutathiona reduzida
GS-Se-SG	Selenodiglutathiona
GSSG	glutathiona oxidada
HG	do inglês, <i>hydride generation</i>
HPLC	do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
HS	do inglês, <i>headspace</i>
ICP	do inglês, <i>inductively coupled plasma</i>
IMS	do inglês, <i>ion mobility spectrometry</i>
IUPAC	do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	limite de detecção
LPME	do inglês, <i>liquid-phase microextraction</i>
LQ	limite de quantificação
MIP	do inglês, <i>microwave induced plasma</i>
MS	do inglês, <i>mass spectrometry</i>
NP	do inglês, <i>normal-phase</i>
OES	do inglês, <i>optical emission spectrometry</i>
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RP	do inglês, <i>reversed-phase</i>
SAH	s-adenosil homocisteína
SAM	s-adenosil metionina

SEC	do inglês, <i>size exclusion chromatography</i>
SeCis2	Selenocistina
SeMet	Selenometionina
SIM	do inglês, <i>selected ion monitoring</i>
SPME	do inglês, <i>solid-phase microextraction</i>
TPR	resina TPR-100 (divinilbenzeno/ metacrilato)
UPLC	do inglês, <i>ultra performance liquid chromatography</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de tabelas

Tabela 1. Algumas espécies de interesse na análise de especiação de selênio ..	9
Tabela 2. Fibras para SPME comercialmente disponíveis.....	13
Tabela 3. Métodos de separação por HPLC para selenocompostos.....	13
Tabela 4. Programação do forno de grafite usada para exposição da fibra de PDMS/DVB na extração do complexo piazoselonol	45
Tabela 5. Programação do forno de grafite aplicada para testes de derivação do Se(IV) e extração do complexo piazoselonol dentro do forno.....	48
Tabela 6. Programação do forno de grafite aplicada para otimizar a temperatura de extração do complexo piazoselenol após derivação no forno.	51
Tabela 7. Programação do forno de grafite aplicada na derivação do Se(IV) e extração do complexo piazoselenol por SPME-GF.....	52
Tabela 8. Condições de decomposição das amostras em forno micro-ondas..	53
Tabela 9. Características analíticas do método para determinação de Se(IV).	74
Tabela 10. Comparação do método proposto com outros métodos pra determinação de Se(IV).....	75
Tabela 11. Determinação de selênio por GC-MS, sem reduzir e após a redução do selênio a Se(IV).....	76
Tabela 12. Parâmetros instrumentais aplicados	87
Tabela 13. Programação do forno micro-ondas para decompor a amostra de castanha-do-pará	91

Tabela 14. Características analíticas para determinação de selênio por ICP-MS	92
Tabela 15. Características analíticas para determinação de SeCis2, SeMet, Se(IV) e Se(VI) por HPLC-ICP-MS.....	96
Tabela 16. Concentração das espécies de selênio extraídas com água de material certificado de plâncton (valor certificado: $1,75 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$).....	98
Tabela 17. Concentração de selênio em testes de digestão gastrointestinal com a castanha-do-pará.....	101
Tabela 18. Concentração de selenocistina em urina humana, antes e após consumo de castanha-do-pará (1 castanha por dia)	105

Lista de figuras

- Figura 1. Rota metabólica do selênio em mamíferos. S-adenosil metionina (SAM), S-adenosil homocisteína (SAH).....5
- Figura 2. Metabolização de selênio proposta para plantas. Adenosina trifosfato (ATP); Adenosina difosfato (ADP); Cisteína (Cis); glutathiona reduzida (GSH); glutathiona oxidada (GSSG); selenodiglutathiona (GS-Se-SG)6
- Figura 3. Dispositivo convencionalmente utilizado na microextração em fase sólida (holder), mostrando a fibra exposta 10
- Figura 4. (a) Sistema convencional de extração por SMPE no modo direto e (b) no modo headspace..... 11
- Figura 5. Adaptado de Lopes (2009). (a) Forno de grafite sem o extrator de fumos do espectrômetro; (b) Adaptador utilizado para prender o holder de SPME; (c) Fibra de SPME acoplada ao forno de grafite; (d) Visão frontal e lateral do acoplamento..... 18
- Figura 6. Representação da reação de derivação para formação do complexo piazoselenol23
- Figura 7. Esquema de exposição da fibra de SPME no tubo de grafite do instrumento de GF AAS (Adaptado de Lopes *et al.*, 2011). (a) Introdução de 99 μL de solução no tubo de grafite; (b) exposição da fibra (início da etapa de extração); (c) e (d) evaporação do solvente (vapor em contato com a fibra) e (e) remoção da fibra. Moléculas de vapor do solvente e analito são representados com círculos laranja e preto, respectivamente44
- Figura 8. Cromatograma da misturas de padrões (DMSe a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e DMDSa a $40 \mu\text{g L}^{-1}$) obtido por SPME-GC-MS. 1: DMSe e 2: DMDSa56

Figura 9. Efeito da quantidade de HCl 10% (v/v) para derivação do Se(IV) com DCFDA em frasco de vidro (n = 3)	58
Figura 10. Efeito da quantidade de DCFDA 1% (m/v) para derivação do Se(IV) em frasco de vidro (n = 3).....	58
Figura 11. Efeito do tempo de reação para derivação do Se(IV) com DCFDA em frasco de vidro (n = 3)	59
Figura 12. Cromatograma dos compostos extraídos por SPME-GF, após reação de formação do complexo piazoselenol ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) derivado com DCFDA), e detectados por GC-MS	60
Figura 13. Cromatogramas dos compostos extraídos por SPME-GF e detectados por GC-MS, após reação de derivação do Se(IV) ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) com DCFDA e brancos: (a) sem usar o ácido e (b) usando $100 \mu\text{L}$ de HCl 10% (v/v). (1 - complexo piazoselenol, 2 - DCFDA).....	62
Figura 14. Cromatogramas dos compostos extraídos por SPME-GF e detectados por GC-MS, após reação de derivação do Se(IV) ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) com DCFDA, quando foram usados diferentes reagentes: (a) - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 10% (v/v), (b) - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 1% (v/v), (c) - adição de $100 \mu\text{L}$ de NH_4Cl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (d) - adição de $100 \mu\text{L}$ de HNO_3 1% (v/v), (e) - adição de $100 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pico 1 - complexo piazoselenol) ..	64
Figura 15. Médias das áreas (n = 3) dos picos cromatográficos do complexo piazoselenol, obtidos após derivação da solução de Se(IV) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ com DCFDA, usando diferentes reagentes como fonte de íons H^+ , extração por SPME-GF e detecção por GC-MS. A - sem adição de ácido, B - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 10% (v/v), C - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 1% (v/v), D - adição de	

100 μL de NH_4Cl 0,01 mol L^{-1} , E - adição de 100 μL de HNO_3 1% (v/v), F - adição de 100 μL de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1}	65
Figura 16. Medias das áreas (n = 3) dos picos cromatograficos do complexo piazoselenol, obtidas após extração por SPME-GF e detecção por GC-MS. A - derivação realizada em frasco de vidro; B - derivação e extração no forno de grafite (condioes ainda não otimizadas).....	66
Figura 17. Efeito do HNO_3 na derivação do Se(IV) usando o DCFDA como agente de derivação (n = 3)	68
Figura 18. Efeito da concentração de DCFDA na extração do complexo piazoselenol por SPME-GF (n = 3)	70
Figura 19. Efeito da temperatura de derivação do Se(IV) com DCFDA (n = 3)	70
Figura 20. Efeito do tempo de extração do complexo piazoselenol por SPME-GF (n = 3)	71
Figura 21. Efeito da temperatura na extração do complexo piazoselenol por SPME-GF.....	72
Figura 22. Cromatogramas de GC-MS <i>ion trap</i> obtidos após a derivação de uma solução de Se(IV) 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ com solução de DCFDA 1% (m/v) e extração por SPME-GF em diferentes temperaturas: (a) 60 $^\circ\text{C}$, (b) 70 $^\circ\text{C}$, (c) 80 $^\circ\text{C}$ e (d) 90 $^\circ\text{C}$	73
Figura 23. Análise de uma mistura de espécies de selênio por HPLC-ICP-MS usando troca aniônica. SeCis2: DL-Selenocistina; SeMet: L-Selenometionina; Se(IV): selenito e Se(VI): selenato. (Programa de eluição: 7 min a 0% de B; 3,75 min a 25% de B; 3,75 min a 50% B; 22,5 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo	

método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 96

Figura 24. Análise da fração aquosa do plâncton por HPLC-ICP-MS. Os pontos de interrogação indicam as espécies desconhecidas. (Programa de eluição: 7 min a 0% de B; 3,75 min a 25% de B; 3,75 min a 50% B; 22,5 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 97

Figura 25. Análise da fração aquosa (a) e da fração bioacessível (b) da castanha-do-pará por HPLC-ICP-MS. (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 100

Figura 26. Cromatogramas de espécies de selênio por HPLC-ICP-MS com troca aniônica. Mistura de padrões (—) e amostra de urina antes da ingestão de castanha-do-pará (—). (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 6 min a 50% de B e 6 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 103

Figura 27. Cromatogramas das espécies de selênio em amostras de urina humana por HPLC-ICP-MS com troca aniônica após consumo de castanha-do-pará. Amostra de urina feminina (a) e masculina (b). O ponto de interrogação indica a espécie não identificada (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 6 min a 50% de B e 6 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo

método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 104

Figura 28. Análise da fração aquosa das amostras de folhas de girassol por HPLC-ICP-MS. (a) planta controle e (b) planta irrigada com solução de selenito. Os números de 1-8 correspondem as espécies não identificadas (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B) Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 107

Figura 29. Cromatograma das espécies de selênio presentes nas amostras de folhas de girassol (planta enriquecida) por HPLC-ICP-MS. As linhas tracejadas marcam as regiões de coleta das frações. (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos 109

Figura 30. Espectro de massa da infusão direta de extrato de folhas de girassol adquirido por ESI-MS (a), com o padrão isotópico do Se no canto esquerdo. Padrão isotópico dos precursores: m/z 417 (b), 453 (c) e 555 (d). 111

1. Introdução

A determinação e/ou identificação de espécies de selênio, tem sido tema de muitos trabalhos devido a sua importância como um micro nutriente essencial ao organismo, a sua estreita faixa entre deficiência e toxicidade e o efeito tóxico diferenciado das espécies.

Embora a determinação da concentração total de selênio seja uma variável importante, ela não fornece informações sobre a mobilidade, biodisponibilidade e efeitos nos organismos ou sistemas ecológicos. A função biológica específica depende da forma físico-química na qual o elemento está presente na amostra (Wrobel *et al.*, 2003b; Michaelke, 2003).

No organismo, tanto os compostos orgânico e inorgânico de selênio podem ser metabolizados (Tinggi, 2008). Porém, os compostos inorgânicos (selenito e selenato) são menos biodisponíveis e também mais tóxicos que as formas orgânicas (selenometionina e selenocisteína) (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008; Valdiglesias *et al.*, 2010). A selenometionina é a espécie química frequentemente usada como suplemento de selênio (Tinggi, 2008), mas segundo Muecke *et al.* (2010) o uso de selenito de sódio como suplemento seria uma melhor opção, pois os efeitos da suplementação podem ser mais facilmente verificados a partir de amostras de sangue dos pacientes. Contudo, é necessário ressaltar que os benefícios da suplementação de selênio ainda são incertos, e seu uso indiscriminado pode aumentar o risco de intoxicação (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008).

Assim, existe grande interesse em determinar espécies de selênio presentes em alimentos, suplementos nutricionais, plantas, micro-organismos

e urina. Dentre a variedade de compostos de selênio, as principais espécies identificadas em amostras ambientais e biológicas são Se(IV), Se(VI), dimetilseleneto, dimetildisseleneto, selenocisteína e selenometionina (Ochsenkühn-Petropoulou e Tsopelas, 2002).

A combinação de diferentes técnicas de extração, separação e detecção é uma ferramenta importante para os propósitos de identificação e/ou quantificação de espécies de um elemento. Os estudos de especiação de selênio têm aumentado principalmente utilizando as técnicas de cromatografia gasosa e líquida (como a exclusão de tamanho, troca iônica ou fase reversa) acopladas a técnicas de detecção elemento-seletiva (como a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado) ou molecular-seletiva (como a espectrometria de massas).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Selênio

O selênio é um calcogênio, presente na tabela periódica ao lado do enxofre (S), com o qual possui similaridade química, promovendo interações Se-S nos sistemas biológicos, mas diferem em algumas propriedades que constitui a base de suas funções biológicas. O Se forma compostos orgânicos e inorgânicos e pode ser encontrado no estado de oxidação reduzido (Se^{2-} ; seleneto), elementar (Se^0) e oxidado (Se^{6+} ; selenato e Se^{4+} ; selenito) (Polatajko *et al.*, 2006).

Como um nutriente essencial ao organismo, está presente em algumas selenoproteínas e é associado à regulação redox e função antioxidante, atuando no metabolismo energético e proteção contra danos ao DNA (Muecke *et al.*, 2010; Navarro-Alarcon *et al.*, 2008). Também, tem sido relatada sua aplicação na prevenção de câncer, cardiopatias e hepatopatias (Combs e Gray, 1998; Navarro-Alarcon *et al.*, 2008; Tinggi, 2008).

Geralmente, as principais fontes de selênio são frutos do mar, cereais, carnes, peixe e ovo. Alimentos como frutas, vegetais e leite apresentam baixos teores deste elemento, mas isto varia muito entre diferentes regiões dependendo dos níveis de selênio encontrados nos solos que também pode ser correlacionado a situação nutricional de selênio da população humana na região (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008; Tinggi, 2008).

Os limites entre deficiência e toxicidade de selênio são muito próximos e as recomendações diárias diferem entre as agências reguladoras. O Food and

Nutrition Board Institute of Medicine (2000) recomenda a ingestão de 55 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de selênio para um indivíduo adulto, enquanto que, para a WHO (World Health Organization, 1998) a dose deve estar na faixa entre 26 e 34 $\mu\text{g}/\text{dia}$ para homens e mulheres. A toxicidade crônica de selênio em humanos causa perda de cabelo, fragilidades das unhas, distúrbios gastrointestinais, erupção na pele, hálito de alho e funcionamento anormal do sistema nervoso (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008). Problemas na tireoide e distrofia muscular são consequências associadas à deficiência de selênio e estão relacionadas à expressão reduzida de selenoproteínas (Navarro-Alarcon *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2010, Papp *et al.*, 2007).

Em mamíferos, quando ingerido em altas quantidades, o selênio é metabolizado via processos de biometilação, produzindo as espécies dimetilseleneto, dimetildisseleneto e o cátion trimetilselenônio, que podem ser excretadas pela urina ou exaladas através da pele e hálito (Figura 1) (B' Hymer e Caruso, 2006; Pedrero e Madrid, 2009). Este processo é chamado de detoxicação, pois os compostos formados são menos tóxicos que outros compostos de selênio (Pyrznska, 1996).

O mecanismo de detoxicação também é importante em plantas hiperacumuladoras de selênio, que convertem selênio inorgânico em formas voláteis que são liberadas na atmosfera (Dumont *et al.*, 2006b; Pilon-Smits e LeDuc, 2009; Rayman *et al.*, 2008). A Figura 2 mostra uma representação da metabolização de selênio em plantas. As plantas Se-acumuladoras suportam grandes quantidades deste elemento (1000-10000 $\mu\text{g}/\text{g}$), porque sintetizam principalmente selenoaminoácidos não-proteicos (Whanger, 2004).

Consequentemente, são necessários métodos para determinar seletivamente diferentes espécies de selênio, incluindo as inorgânicas e

orgânicas, pois o efeito biológico do selênio para o homem, animal e organismos marinhos, depende da dose e da forma físico-química na qual está presente.

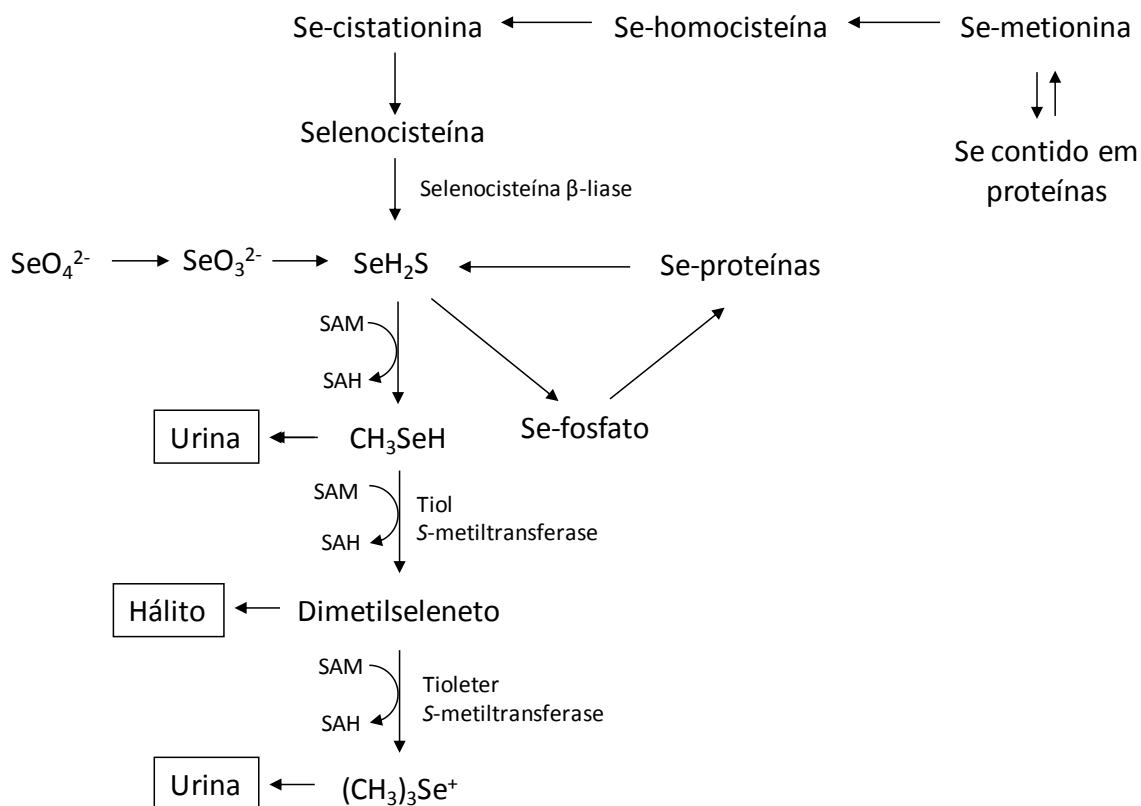


Figura 1. Rota metabólica do selênio em mamíferos. S-adenosil metionina (SAM), S-adenosil homocisteína (SAH). (Adaptado de B'Hymer e Caruso, 2006)

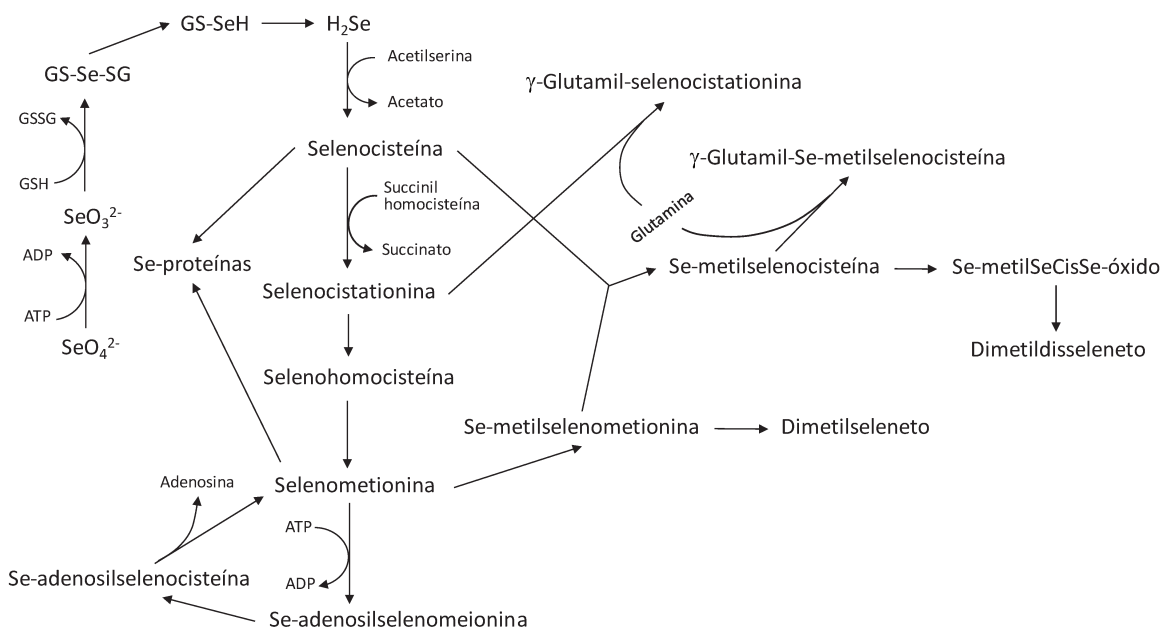


Figura 2. Metabolização de selênio proposta para plantas. Adenosina trifosfato (ATP); Adenosina difosfato (ADP); Cisteína (Cis); glutathiona reduzida (GSH); glutathiona oxidada (GSSG); selenodiglutathiona (GS-Se-SG). (Adaptado de Whanger, 2004)

2.2. Análise de especiação

A variedade de espécies encontradas para um dado elemento inclui (Wrobel *et al.*, 2003b): aquelas que ocorrem naturalmente, as emitidas por meio das diferentes atividades humanas e as transformadas por meio de organismos vivos. Assim, diferentes campos da ciência (ambiental, biológico, clínico e nutricional) tem focado seu interesse na caracterização de compostos ou espécies de um elemento.

A identificação e quantificação de diferentes formas físico-químicas de elementos, presentes em uma amostra, ficou conhecida como especiação química, conceito introduzido por Florence e Batley em 1980 (in: Wrobel *et*

al., 2003b). Porém, o termo “especiaçãoção” tem levado a diferentes interpretações, assim, a União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC, do Inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda usar o termo “análise de especiaçãoção” como atividade analítica de identificação e medida de espécies e restringe o uso do termo especiaçãoção em química para distribuição de um elemento em suas espécies (Templeton *et al.*, 2000).

Como os compostos químicos podem diferir em composição isotópica, conformação, estado de oxidação ou eletrônico, ou quanto a seus substituintes ligados covalentemente ou complexados, a IUPAC levanta as seguintes definições (Templeton *et al.*, 2000):

- Espécies químicas: forma específica de um elemento definido pela composição isotópica, estado de oxidação ou eletrônico, e/ou estrutura molecular ou complexa.
- Análise de especiaçãoção: atividade analítica de identificação e/ou medida das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra.
- Especiaçãoção de um elemento: distribuição de um elemento associada às espécies químicas definidas em um sistema.

A análise de especiaçãoção de selênio pode ser dividida em dois grupos de espécies: não-voláteis, que incluem as espécies inorgânicas, selênio elementar e compostos orgânicos; e selenetos orgânicos voláteis, como DMSe e DMDS_e (produzidos por meio de processos de biometilação; Figuras 1 e 2) (Pyrznska, 1996; Dauchy *et al.*, 1994). Os maiores campos de interesse são a especiaçãoção de metabólitos de selênio presentes em plantas, suplementos nutricionais e micro-organismos (aminoácidos e peptídeos) e de metabólitos

da urina (Szpunar, 2005). Algumas espécies de selênio avaliadas em amostras ambientais e biológicas são apresentadas na Tabela 1.

A base para análise de especiação consiste de sistemas combinados nos quais as espécies são separadas e subsequentemente detectadas por técnicas elemento-seletivo ou molecular-seletivo. As técnicas analíticas ideais para estudo de especiação devem ser seletivas e possuir sensibilidade para quantificação de todas as formas na amostra (B' Hymer e Caruso, 2006; Pyrznska, 1996; Pyrznska, 2009).

Os métodos típicos para análise de especiação envolvem a combinação e hifenação entre as técnicas de cromatografia (gasosa e líquida) ou eletroforese capilar com AAS (do inglês, *atomic absorption spectrometry*), ICP OES (do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*), ICP-MS (do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*) e ESI-MS (do inglês, *electrospray ionization-mass spectrometry*) (Michaelke, 2003).

Geralmente, antes da análise por essas variadas combinações de técnicas instrumentais, a amostra precisa passar por etapas de extração e pré-concentração. Os métodos tradicionais de preparo de amostra (hidrodestilação, extração Soxhlet, extração líquido-líquido e extração em fase sólida) consomem tempo e possuem várias etapas que podem levar a perda do analito e, frequentemente, ao uso de grandes quantidades de solventes. Por esta razão, métodos de extração livres de solvente e que consumam menos tempo na etapa de preparo de amostra, vem sendo investigados e introduzidos na literatura (Mester *et al.*, 2001). A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de amostragem livre de solvente, que combina extração e pré-

Tabela 1. Algumas espécies de interesse na análise de especiação de selênio

Nome	Tipo de amostra	Referências
Selenito	Água, arroz, solos	Fang <i>et al.</i> , 2009; Tolu <i>et al.</i> , 2011
Selenato	Água, arroz, solos	Fang <i>et al.</i> , 2009; Tolu <i>et al.</i> , 2011
Cátion trimetilselenônio	Urina	Gammelgaard, <i>et al.</i> , 2000; Kuehnelt <i>et al.</i> , 2006b
Dimetilseleneto	Mostarda, sedimento	Meija <i>et al.</i> , 2002; Ochsenkühn-Petropoulou <i>et al.</i> , 2003
Dimetildisseleneto	Hálito, sedimento	Ochsenkühn-Petropoulou <i>et al.</i> , 2003; Cai <i>et al.</i> , 1995
Selenocisteína	Frango, cebola	Bierta <i>et al.</i> , 2008; Shah <i>et al.</i> , 2004
Metilselenocisteína	Alho, cebola	Shah <i>et al.</i> , 2004; Mounicou <i>et al.</i> , 2009
Selenometionina	Arroz, frango, castanha-do-pará	Bierta <i>et al.</i> , 2008; Dumont <i>et al.</i> , 2006a; Fang <i>et al.</i> , 2009
Selenocístina	Arroz, castanha-do-pará	Dumont <i>et al.</i> , 2006a; Fang <i>et al.</i> , 2009
γ -glutamil-Se-metilselenocisteína	Alho, cebola, levedura	Dernovics <i>et al.</i> , 2009; Shah <i>et al.</i> , 2004; Mounicou <i>et al.</i> , 2009
Selenoaçúcares	Urina	Gammelgaard e Bendahl, 2004; Letsiou <i>et al.</i> , 2007

concentração em uma única etapa que é compatível com métodos de separação por cromatografia gasosa e líquida.

2.3. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida é uma microtécnica de extração que vem sendo aplicada em diversos campos, incluindo farmacêutico, clínico, forense, bioquímico, toxicológico e produtos naturais (Theodoridis *et al.*, 2000).

Geralmente, a unidade de extração por SPME comercialmente disponível (Figura 3), possui uma pequena fibra de sílica fundida revestida por uma fase extratora, que pode ser sólida, líquida ou uma combinação de ambas. Devido à sua estrutura frágil, esta fibra é adaptada a um dispositivo de proteção (*holder*) para assegurar sua estrutura frágil durante a manipulação (Theodoridis *et al.*, 2000; Mester *et al.*, 2001).

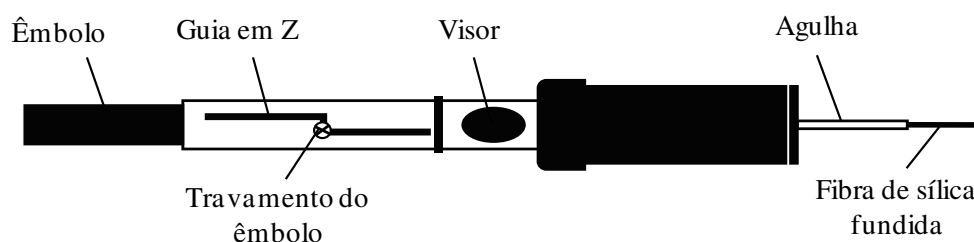


Figura 3. Dispositivo convencionalmente utilizado na microextração em fase sólida (*holder*), mostrando a fibra exposta (adaptado de Mester *et al.*, 2001)

A técnica de SPME baseia-se na absorção e/ou adsorção de analitos da matriz da amostra pela micro fase extratora que reveste a fibra, seguida de

dessorção dos compostos em um sistema cromatográfico para posterior separação e detecção (Theodoridis *et al.*, 2000; Alpendurada, 2000). Vários fatores estão envolvidos neste processo de transferência de massa dos analitos, os quais afetam o modo de extração, o tipo de fase extratora (revestimento da fibra) e as condições de dessorção.

O aparato convencional de extração por SPME, geralmente, é composto por um sistema de aquecimento e agitação, frasco de vidro e *Holder* de SPME. Por este sistema, dois modos básicos podem ser usados para extração de analitos: extração direta ou extração no modo *headspace* (HS). Na extração direta (Figura 4a), a agulha do *holder* perfura o septo do frasco amostrador, e em seguida, o revestimento da fibra é imerso dentro da amostra e os analitos são transferidos diretamente da matriz da amostra para a fase extratora. No modo HS (Figura 4b) a fibra é exposta à fase gasosa acima da amostra confinada no frasco e os analitos são transferidos até o revestimento da fibra (Pawliszyn, 1999).

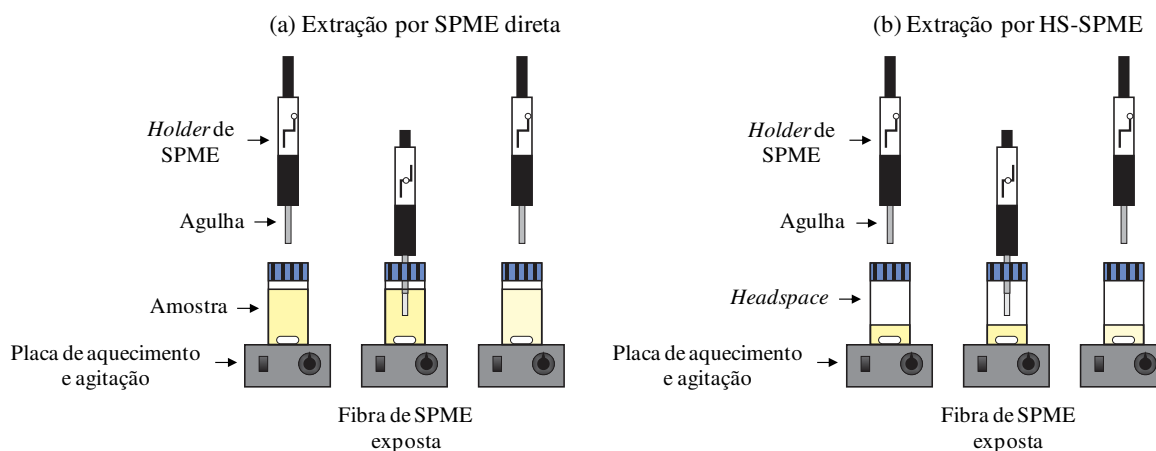


Figura 4. (a) Sistema convencional de extração por SMPE no modo direto e (b) no modo headspace (adaptado de Chen *et al.*, 2008)

Na seleção do modo de extração, deve-se considerar a matriz da amostra, a volatilidade do analito e a afinidade do analito pela matriz (Theodoridis *et al.*, 2000). A extração por HS é ideal nos casos em que os analitos são suficientemente voláteis na temperatura de extração escolhida. Diferentemente da SPME direta, a HS-SPME apresenta vantagens, tais como minimização dos danos ao revestimento da fibra, aplicação a matrizes sólidas e aquosas contendo materiais particulados, a fase extratora é mais protegida de interferências de moléculas de alta massa molecular, tais como proteínas, além de facilitar a modificação de matriz (pH, força iônica, solvente) sem afetar a fibra (Alpendurada, 2000; Mester *et al.*, 2001; Valente e Augusto, 2000).

Como mencionado anteriormente, dependendo do revestimento da fibra, a extração se dará por mecanismos de absorção ou adsorção. Fibras absorventes (líquidos poliméricos) extraem analitos por processo de partição e sua capacidade depende principalmente da espessura da camada líquida e do tamanho do analito (Parreira e Cardeal, 2005).

Fibras adsorventes (revestimento sólido) extraem compostos por interações físicas, retendo os analitos dentro dos poros até serem desorvidos termicamente ou por solvente. Neste tipo de fibra, ao contrário das absorventes, existe um número limitado de sítios adsorventes que podem levar à competição e ao deslocamento entre analitos com diferentes afinidades pela fase extratora (Parreira e Cardeal, 2005).

Existem poucas fibras de SPME comercialmente disponíveis com diferentes combinações ou misturas de revestimentos. As espessuras dos filmes variam de 7 a 100 μm , resultando em um volume de fase extratora de 0,03 a 0,7 μL (Dietz *et al.*, 2006; Pawliszyn, 1999). A Tabela 2 mostra algumas fibras de SPME disponíveis e suas aplicações gerais. A escolha do

Tabela 2. Fibras para SPME comercialmente disponíveis (Alpendurada, 2000; Valente e Augusto, 2000; Vas e Vékey, 2004)

Revestimento	Espessura do filme (μm)	Recomendação de uso	Aplicações gerais
PDMS ^a	100	GC, HPLC	Voláteis apolares
	30	GC, HPLC	Semivoláteis apolares
	7	GC, HPLC	Semivoláteis de média polaridade
PA ^b	85	GC, HPLC	Voláteis de alta e média polaridade
CW ^c /DVB ^d	65	GC	Voláteis de alta e média polaridade
PDMS/DVB	65	GC, HPLC	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade
	60	GC	
CAR ^e /PDMS	75	GC	Gases e voláteis
CW/TPR ^f	50	HPLC	Compostos polares
CAR/PDMS/DVB	30/50	GC	Odores e sabores

^a Polidimetilsiloxano; ^b Poliacrilato; ^c Divinilbenzeno; ^d Carbowax (polietileno glicol); ^e Carboxen (peneira molecular de carbono); ^f Resina TPR-100 (divinilbenzeno/ metacrilato).

tipo de revestimento deve ser baseada em fatores como (Parreira e Cardeal, 2005; Pawliszyn, 1999): peso molecular, tamanho, ponto de ebulição e pressão de vapor do analito; polaridade e grupos funcionais da fibra e do

analito; faixa de concentração e tipo de técnica de separação ou detecção usada.

A dessorção dos analitos em SPME usualmente é realizada na porta de injeção de um instrumento de cromatografia gasosa ou na interface de um cromatógrafo líquido. Porém, a cromatografia gasosa é a principal técnica para separação de analitos por SPME, na qual estes são termicamente dessorvidos sem utilização de solvente orgânicos (Mester *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2008).

2.3.1. Análise quantitativa por SPME

A teoria da SPME é descrita pela cinética de transferência de massa e pela termodinâmica do equilíbrio de distribuição dos analitos entre as fases (matriz, *headspace* e revestimento da fibra). Na literatura é possível encontrar trabalhos que discutem com detalhes os fundamentos teóricos da SPME (Pawliszyn, 1999; Parreira e Cardeal, 2005). O uso da SPME para quantificação está baseada na relação entre quantidade de analito extraído pelo revestimento da fibra e sua concentração na amostra, como pode ser observado na equação 1, que expressa a massa de analito absorvida por um revestimento polimérico após o equilíbrio no sistema ser atingido (Mester *et al.*, 2001; Pawliszyn, 1999; Valente e Augusto, 2000):

$$n = \frac{K_{fa} V_f C_0 V_a}{K_{fa} V_f + V_a} \quad (1)$$

Onde, n é a massa do analito extraído; C_0 é a concentração inicial do analito na amostra; V_f e V_a são os volumes do revestimento da fibra e da amostra, respectivamente, e K_{fa} é a constante de distribuição do analito entre o revestimento da fibra/amostra. Quando as fases presentes estão em equilíbrio,

a quantidade de analito extraída pela fibra é diretamente proporcional a concentração do analito na amostra e independente da sua localização no sistema (matriz ou *headspace*) (Pawliszyn, 1999; Valente e Augusto, 2000).

A sensibilidade depende principalmente do coeficiente de partição entre o revestimento e a matriz. Alguns artifícios como agitação, mudança no pH da amostra, derivação do analito ou tipo de fibra, podem facilitar a extração (Pawliszyn, 1999). Os fatores mais importantes que afetam a precisão em SPME convencional são: condições de agitação, tempo de extração (quando as condições de equilíbrio não são usadas), temperatura, volume de amostra e *headspace*, tipo de fibra (polaridade, grupo funcional e espessura), componentes na matriz da amostra (sal, umidade, pH, entre outros) e condições de dessorção (Pawliszyn, 1999).

2.3.2. SPME e determinação de selênio

A SPME aliada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas pode proporcionar um método com amostragem livre de solvente e com sensibilidade, exatidão e precisão adequadas para determinações quantitativas (Valente e Augusto, 2000; Zambonin, 2003). Esta técnica tem sido usada para especiação de organoselênios voláteis (DMSe, DMDS_e, DESe, DEDSe) (Lenz *et al.*, 2011; Dietz *et al.*, 2003, Dietz *et al.*, 2004a) e para determinação de selênio inorgânico, após derivação (Guidotti, 2000; Shahdousti e Alizadeh, 2011) (este tópico será apresentado a seguir).

O revestimento de fibra mais aplicado para extração de organoselênios voláteis é CAR/PDMS (Bueno e Pannier, 2009; Dietz *et al.*, 2004b; Meija *et al.*, 2002) usando o modo de extração *headspace*. Para a determinação de

selenito são relatados os revestimentos de PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS/DVB e CAR/PDMS (Campilo *et al.*, 2007; Dimitrakakis *et al.*, 2004; Kapsimali e Zachariadis, 2010). Porém, de acordo com o Campilo *et al.* (2007), as fibras de PA, PDMS e CW/PDMS não favorecem a extração de dimetilseleneto, dimetildisseleneto e Se(IV) derivado, e melhores resultados são observados para os revestimentos de PDMS/DVB, CAR/PDMS/DVB e CAR/PDMS. Segundo os mesmos autores, maior sensibilidade foi encontrada para Se(IV) derivado quando o modo de extração por imersão direta foi adotado para extração.

2.3.4. Acoplamento SPME-GF

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica é uma técnica sensível de análise aplicada para determinação de um grande número de elementos, onde os mecanismos de atomização ocorrem em um tubo cilíndrico, aberto em suas extremidades e com um orifício central para introdução da amostra (Holler *et al.*, 2009).

Dentre os avanços tecnológicos que ocorreram em sua instrumentação desde a sua proposta pode se destacar: a utilização de fornos de grafite com plataforma de L'vov recoberto de carbono pirolítico, reduzindo perdas por difusão através da parede do atomizador, e o aquecimento transversal do tubo que proporcionou um ambiente espacialmente isotérmico para a atomização (Welz e Sperling, 1999; Correia *et al.*, 2003). Deste modo, o aquecimento da amostra, injetada sobre a plataforma do tubo, ocorre em um ambiente com controle eficiente de temperatura para gerar um vapor do analito.

O programa de aquecimento eletrotérmico envolve etapas de secagem para evaporar o solvente (geralmente, 110 °C), uma etapa de pirólise para remover interferentes da matriz (300-1200 °C), uma etapa de atomização para vaporizar o analito (até 2000 e 3000 °C) e uma de limpeza em temperatura máxima para eliminar o resíduo (Erickson, 2000; Skoog *et al.*, 2007). As temperaturas de pirólise e atomização são definidas de acordo com o analito e as condições de análise.

Outra aplicação relatada para espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, apresenta essa técnica como uma estratégia para a extração de espécies voláteis. Recentemente, Lopes *et al.* (2011) utilizaram-se das vantagens da técnica de SPME com as características da GF AAS, usando o forno de grafite como um reator para controle fino de temperatura, visando a extração de espécies organoestânicas (monobutilestanho, dibutilestanho e tributilestanho), com subsequente identificação por GC-MS.

Para realizar o acoplamento da fibra de SPME com o forno de grafite, o extrator de fumos do espectrômetro foi removido e substituído por um adaptador para suportar o *holder* de SPME (Figura 5a e 5b). O abaixamento do *holder* até a entrada do tubo de grafite é, então, realizado pelo pistão que controlava a exposição do extrator de fumos no atomizador, e a altura da fibra dentro do tubo é controlada pelo alinhamento do *holder* usando o parafuso do adaptador (Figura 5b). O alinhamento é realizado de forma a manter a fibra cerca de 1 mm acima da plataforma do tubo de grafite e expondo, aproximadamente, 4 mm do comprimento da fibra (1 cm). As Figuras 5c e 5d apresentam um perfil do acoplamento SPME-GF para exposição da fibra (outros detalhes são apresentados no Capítulo 1).

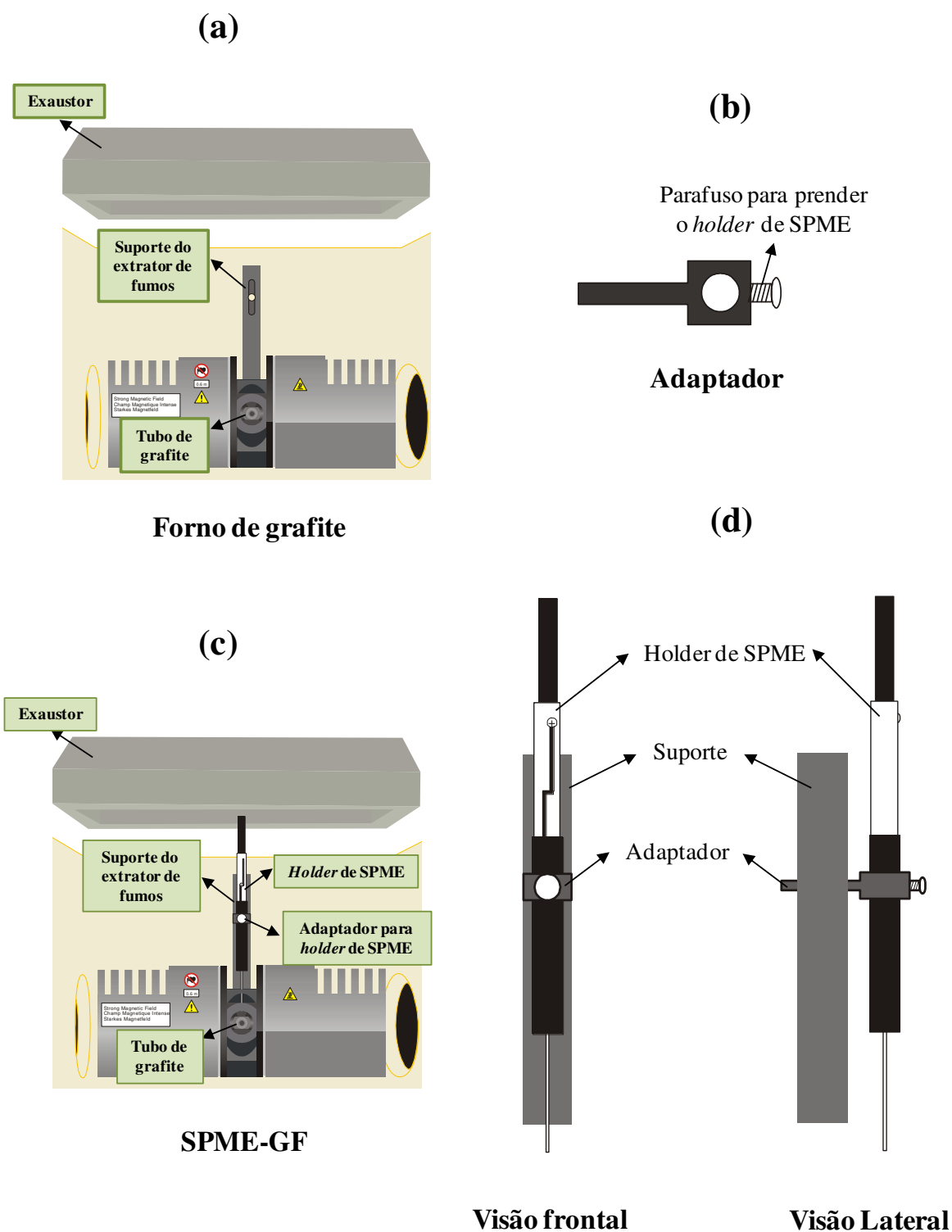


Figura 5. Adaptado de Lopes (2009). (a) Forno de grafite sem o extrator de fumos do espectrômetro; (b) Adaptador utilizado para prender o holder de SPME; (c) Fibra de SPME acoplada ao forno de grafite; (d) Visão frontal e lateral do acoplamento

Enquanto que na técnica de SPME convencional a transferência de massa é facilitada pela agitação da solução, no acoplamento SPME-GF a temperatura é o único parâmetro que contribuiu para a eficiência da transferência de massa, das espécies de interesse, entre a plataforma e o espaço em que se encontra a fibra. Assim, pelo sistema de extração SPME-GF, é necessário definir um programa de temperatura adequado para expor a fibra a temperaturas apropriadas para a extração das espécies.

Lopes *et al.* (2011) também verificou um comportamento de retenção diferenciado para os analitos mais e menos voláteis. Em tempo máximo de exposição da fibra de SPME dentro do tubo de grafite, permitido pela programação do forno de grafite, foi observado um maior sinal analítico para a espécie menos volátil (tributiletilestanho), após a extração por SPME-GF. Destaca-se ainda que, embora o procedimento de retenção por SPME-GF não se caracterize como um processo dinâmico (não existe fluxo de gás arrastando os analitos até a região da fibra), pois a extração é realizada em um sistema aberto, o sistema pode envolver parâmetros similares a um processo dinâmico, onde o aumento da pressão parcial do solvente contribui para o arraste de espécies menos voláteis, favorecendo sua retenção por SPME-GF (Lopes *et al.*, 2011). Um dos desafios é a aplicação deste sistema na extração de espécies para fins de determinação quantitativa.

2.4. Cromatografia

A cromatografia é um método físico de separação, onde os componentes de uma mistura são separados por sua distribuição entre duas fases (estacionária e móvel) (Ettre, 1993). Esta técnica é muito aplicada

devido à sua capacidade de separação, identificação e quantificação, principalmente quando combinada com outras técnicas instrumentais, como a espectrometria de massas (Collins *et al.*, 2006).

Os tipos de cromatografia existentes podem ser classificados em relação a técnica (planar e em coluna), ao estado físico das fases empregadas e aos mecanismos de separação. Considerando a fase móvel, a cromatografia se classifica em: cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás inerte; cromatografia líquida, na qual a fase móvel é um líquido que pode influenciar na separação, e cromatografia supercrítica que usa um vapor pressurizado, em temperatura e pressão acima de seu ponto crítico (Collins *et al.*, 2006; Poole, 2003; Ettre, 1993). Em relação aos mecanismos de separação, os processos podem ser por adsorção, absorção (partição), troca iônica, bioafinidade e exclusão (Collins *et al.*, 2006, Ettre, 1993).

Nos processos físicos de sorção (adsorção ou absorção), os solutos interagem com a fase estacionária e podem retornar a fase móvel por volatilidade (cromatografia gasosa) ou solubilidade (cromatografia líquida e cromatografia com fluido supercrítico) (Collins *et al.*, 2006).

2.4.1. Cromatografia gasosa

Aplicada somente na separação de espécies voláteis, semi-voláteis e termicamente estáveis (Collins *et al.*, 2006; Popp *et al.*, 2010). A amostra é vaporizada no sistema de injeção e introduzida na coluna, onde as substâncias são separadas de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária. Os compostos são eluídos pelo gás de arraste, que não deve interagir com o recheio da coluna e ser compatível com o detector usado. Em cromatografia

gasosa, a programação de temperatura da coluna melhora a separação e diminui o tempo de análise (Collins *et al.*, 2006). Esta técnica possui alto poder de resolução, permitindo a análise de várias substâncias de uma mesma amostra, e fornece excelentes resultados quantitativos (Collins *et al.*, 2006; McNair e Miller, 1997).

Para o selênio, a cromatografia gasosa é bastante usada na determinação das espécies voláteis (dimetilseleneto, dietilseleneto e dimetildisseleneto) (Bueno e Pannier, 2009; Campillo *et al.*, 2005; Dietz *et al.*, 2003; Gómez-Ariza *et al.*, 1998; Hunter e Kuykendall, 2004; Winkel *et al.*, 2010), mas também é relatada sua aplicação para determinação de selênio inorgânico, após reação de complexação (derivação) para formação de compostos voláteis (Campillo *et al.*, 2007; Gómez-Ariza *et al.*, 1999a; Güler *et al.*, 2011; Najafi *et al.*, 2012; Saleh *et al.*, 2009).

2.4.1.1. Derivação

Somente os gases e cerca de 20% dos compostos orgânicos conhecidos podem ser analisados por GC sem tratamento prévio (Collins *et al.*, 2006; Meyer, 2004). Em casos onde as substâncias não são voláteis ou possuem grupos fortemente polares é necessário realizar a reação de derivação. Este procedimento também pode ser usado para melhorar a detectabilidade de compostos. As reações para produzir derivados voláteis podem ser classificadas como: sililação, acilação, alquilação e complexação (Collins *et al.*, 2006; McNair e Miller, 1997). As aminas, por exemplo, voláteis ou não, devem ser derivadas devido a sua tendência em formar ligações de hidrogênio que dificulta a sua eluição da coluna (McNair e Miller, 1997).

a) Derivação de espécies de selênio

Para determinação de selenito por GC, alguns trabalhos reportam o uso do tetraetilborato de sódio como agente de derivação (Kapsimali e Zachariadis, 2010; Guidotti, 2000; Guntinas *et al.*, 1995; Clark e Craig, 1992), onde, neste caso, o Se(IV) reage com o tetraetilborato de sódio formando o dietilseleneto que pode ser separado por GC. Porém, este derivante também reage com a espécie dimetildisseleneto que é quimicamente transformada em metiletilseleneto (Campillo *et al.*, 2007).

A geração de hidretos foi usada por Moreno *et al.* (2003) para a determinação de Se(IV) na presença de dietilseleneto e dimetildisseleneto. Os autores demonstraram que sob a mesma condição de redução para o selênio inorgânico, essas espécies dimetiladas são transformadas em outras espécies mais voláteis, por reação com o borohidreto de sódio, interferindo na determinação de Se(IV).

Em sua maioria, a derivação de selênio se baseia na formação do complexo piazoselenol, em meio ácido (pH entre 1 e 3). Vários métodos são descritos pela literatura usando diferentes reagentes de derivação como: 1,2-fenilenodiamino (Al-Attar e Nickless, 1988; Saleh *et al.*, 2009; Sarkouhi *et al.*, 2007), 4-cloro-1,2-fenilenodiamino (Gómez-Ariza *et al.*, 1998; Gómez-Ariza *et al.*, 1999a), 4-nitro-1,2-fenilenodiamino (Ashournia e Aliakbar, 2010; Bidari *et al.*, 2008; Najafi *et al.*, 2012), 4,5-dicloro-1,2-fenilenodiano (Guidotti *et al.*, 1999; Campillo *et al.*, 2007) e o 2,3-diaminonaftaleno (Güler *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2010). Nestes métodos, o Se(IV) forma o composto volátil que pode ser separado por GC. O complexo de piazoselenol mais

simples é obtido a partir da reação entre o selenito e o 1,2-fenilenodiamino (Figura 6) (Gontijo, 2006).

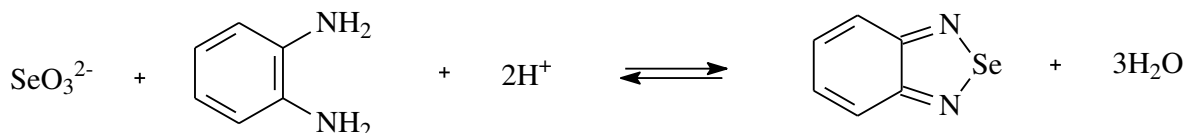


Figura 6. Representação da reação de derivação para formação do complexo piazoselenol

Gómez-Ariza *et al.* (1999b) avaliaram três agentes de derivação (4-cloro-1,2-fenilenodiamino, 4-nitro-1,2-fenilenodiamino e 2,3-diaminonaftaleno) para determinação de selenito em amostras de água, e observaram que temperaturas maiores de reação foram necessárias para a formação do 4-cloro-piazoselenol e 4-nitro-piazoselenol. Entretanto, o tempo de derivação para estes dois reagentes foi menor (7 min), comparado ao do 2,3-diaminonaftaleno (60 min), e o método de derivação usando o 4-cloro-1,2-fenilenodiamino foi considerado mais útil para determinação de Se(IV) por obter maior sensibilidade.

Também é relatada a derivação de seleno-amino ácidos para determinação por GC (Duan e Hu, 2009a; Vonderheid *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012). Vonderheid *et al.* (2002) aplicaram a GC para determinação de selenometionina, selenoetionina e selenocistina após acilação do grupo amina e esterificação do grupo carboxílico usando o cloroformiato de isobutila, para aumentar a volatilidade desses compostos.

2.4.1.2. Detecção

As colunas cromatográficas podem ser acopladas a diferentes sistemas de detecção. Dependendo do detector empregado é possível obter baixos limites de detecção (10^{-12} g ou até menos) (Collins *et al.*, 2006; McNair e Miller, 1997). A cromatografia gasosa combinada à espectrometria de massas permite a identificação de vários compostos. Este sistema, geralmente, possui (Collins *et al.*, 2006): uma interface para ligação dos equipamentos; uma câmara de ionização onde os íons moleculares são formados e fragmentados, principalmente por impacto de elétrons; um analisador de massas, onde os íons são separados de acordo com a razão massa/carga, e um sistema de detecção de íons com um programa para interpretação dos dados.

Os espectros de massas obtidos são característicos para cada substância e podem ser comparados a espectros armazenados em bibliotecas, podendo confirmar a presença do analito através da massa molar e estrutura. Operando no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM) possui alta seletividade e permite a quantificação de picos sobrepostos (Collins *et al.*, 2006).

Para determinação das espécies de selênio (dimetilseleneto, dimetildisseleneto, compostos derivados) o acoplamento GC-MS é o a mais usual (Campillo *et al.*, 2009; Bueno e Pannier, 2009; Gómez-Ariza *et al.*, 1999b; Guidotti, 2000; Kapsimali e Zachariadis, 2009). Guidotti *et al.* (1999) realizaram uma determinação seletiva de Se(IV) e Se(VI) por GC-MS em amostras de água, obtendo limite de detecção de 6 ng L^{-1} para o método. Para o dimetilseleneto e dimetildisseleneto, Ghasemi *et al.* (2011) apresentam um

método com determinação por GC-MS onde limites de detecção de 65 ng L⁻¹ e 57 ng L⁻¹ são encontrados para estes compostos, respectivamente.

Outras técnicas reportadas na literatura para detecção de selênio usando a cromatografia gasosa são: ICP-MS (Bueno e Pannier, 2009; Dietz *et al.*, 2004a; Duan e Hu, 2009a), ECD (do inglês, *electron-capture detection*) (Bidari *et al.*, 2008), AED (do inglês, *atomic emission detection*) (Campillo *et al.*, 2005; Campilo *et al.*, 2007), MIP AES (do inglês, *microwave induced plasma atomic emission spectrometry*) (Dietz *et al.*, 2004a; Dietz *et al.*, 2004b; Gutinas *et al.*, 1995) e AFS (do inglês, *atomic fluorescence spectroscopy*) (Dietz *et al.*, 2004a).

2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é aplicada na determinação de vários compostos, podendo separar misturas com um grande número de substâncias similares (Collins *et al.*, 2006, Meyer, 2004). Independe da volatilidade ou estabilidade térmica dos compostos e requer apenas que a amostra seja solúvel na fase móvel.

Em HPLC, a fase móvel é eluída sob altas pressões através da coluna contendo a fase estacionária e a separação ocorre devido as diferentes interações de cada componente da amostra com ambas as fases, estacionária e móvel (Meyer, 2004; Weston e Brown, 1997). É possível realizar separações e análises quantitativas em poucos minutos com alta resolução, eficiência e detectabilidade (Collins *et al.*, 2006).

Diferentes mecanismos de separação (fase normal, fase reserva, exclusão de tamanho, troca iônica e bioafinidade) podem ser utilizados em

HPLC, trocando a fase estacionária e a fase móvel (Collins *et al.*, 2006). Os principais mecanismos de separação usados para análise de especiação de bioinorgânicos, inclusive compostos de selênio, são a exclusão de tamanho, troca iônica e fase reversa ou fase reversa por pares de íons (Polatajko *et al.*, 2006; Szpunar, 2000). Frequentemente, uma combinação desses mecanismos de separação é necessária para identificar corretamente as espécies (Szpunar, 2000). Além disso, a escolha da fase móvel (pH e força iônica), também é importante para separações ótimas e pode variar em função do modo de separação e do detector utilizado. A Tabela 3 apresenta alguns métodos analíticos com HPLC para selenocompostos.

2.4.2.1. Cromatografia por exclusão

A cromatografia por exclusão (SEC) é um processo mecânico de separação no qual as moléculas são separadas devido as suas diferenças de tamanho e/ou forma, que afetam sua capacidade de penetração nos poros da fase estacionária (Collins *et al.*, 2006; Ettre, 1993). O tempo médio que uma substância gasta nos poros é usualmente associado a sua massa molecular (Szpunar, 2000). As moléculas pequenas penetram mais facilmente na fase estacionaria e, por consequência, se movem mais lentamente que as moléculas maiores, sendo as últimas a chegarem ao detector.

Devido à baixa resolução, este mecanismo de separação é pouco aplicado para análise de amostras biológicas complexas. Suas aplicações mais comuns são para: isolar e purificar proteínas para separação subsequente, por métodos de alta resolução como troca iônica e fase reversa, e estimar a massa molar a partir da curva de calibração (Collins *et al.*, 2006). Na análise de

Tabela 3. Métodos de separação por HPLC para selenocompostos

Amostra	Tipo	Fase móvel	Deteção	Referências
Levedura enriquecida com Se	SEC ^a	Tampão acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹)	ICP-MS	Far <i>et al.</i> , 2010
	NP ^b	Tampão acetato de amônio (2,5 mmol L ⁻¹) em 80% de acetonitrila	ICP-MS e ESI ^f -MS/MS	
Tecido de <i>M. anguillicaudatus</i>	RP ^c	1% de metanol e 0,1% de ácido fórmico em água	ICP-MS	Gong <i>et al.</i> , 2012
		(A) 3% de metanol e 0,1% de ácido fórmico em água (B) 100% de metanol	ESI-MS/MS	
Levedura selenizada	RP	Metanol água em 0,1% de ácido fórmico	ICP-MS e ESI-MS/MS	Infante <i>et al.</i> , 2006
Suplemento alimentar (levedura)	AEX ^d	Acetato de amônio (A-25 mmol L ⁻¹ e B-250 mmol L ⁻¹)	ICP-MS	Dernovics e Lobinski, 2008
Tecido de tartaruga	AEX	Acetato de amônio 50 mmol L ⁻¹		Anan <i>et al.</i> , 2011
	SEC	Acetato de amônio 10 mmol L ⁻¹		
Levedura enriquecida com Se	SEC	Acetato de amônio 10 mmol L ⁻¹	ICP-MS	Casal <i>et al.</i> , 2010
	AEX	Acetato de amônio (A-25 mmol L ⁻¹ e B-250 mmol L ⁻¹)	ICP-MS	
	CEX ^e	Formiato de piridina (A-1 mmol L ⁻¹ e B-40 mmol L ⁻¹)	ICP-MS	
		Formiato de amônio (A-1 mmol L ⁻¹ e B-100 mmol L ⁻¹) em 20% de metanol	ESI-MS	

Tabela 3. (continuação)

Soja	RP	2% de metanol em 0,02% de ácido heptafluorobutírico	ICP-MS	Chan <i>et al.</i> , 2010
Arroz	RP	5% de metanol em 0,015% de ácido heptafluorobutírico	ICP-MS	Fang <i>et al.</i> , 2009
	AEX	Tampão citrato (A-2 mmol L ⁻¹ e B-10 mmol L ⁻¹) com 1% de metanol		
Leveduras e castanha-do-pará	SEC	10 mmol L ⁻¹ de ácido fórmico/NH ₃	ICP-MS	Wrobel <i>et al.</i> , 2003a
	RP	5 mmol L ⁻¹ de ácido cítrico/NaOH, 5 mmol L ⁻¹ ácido hexanosulfônico		
Grão de trigo	RP	2% de metanol em 0,1% de ácido fórmico	ICP-MS	Cubadda <i>et al.</i> , 2010
	AEX	3% de metanol em 3,5 mmol L ⁻¹ de ácido salicílico		
	CEX	(A) 3% de metanol, (B) 3% de metanol 10 mmol L ⁻¹ de formiato de piridínio		
Alho e mostarda	RP	10% de metanol em 0,2% de ácido heptafluorobutírico	ICP-MS	Montes-Bayón <i>et al.</i> , 2006
	AEX/SEC	10 mmol L ⁻¹ de acetato de amônio		
Farinha e pão	AEX	2% de metanol em 5 mmol L ⁻¹ de citrato de amônio		Hart <i>et al.</i> , 2011

^a Cromatografia de exclusão; ^b Fase normal; ^c Fase reversa; ^d Troca aniônica; ^e Troca catiônica; ^f *Electrospray*

selenocompostos a SEC é aplicada, geralmente, para verificar a distribuição de proteínas contendo selênio e/ou como uma etapa de purificação de amostra (Dernovics *et al.*, *In press*; Preud'homme *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2008). Duan *et al.*, (2004) reportou o uso da SEC para avaliar a distribuição de compostos de selênio em músculos de sete animais (frango, peru, pato, avestruz, cordeiro, bovino e suíno). Kápolna *et al.* (2007), utilizaram a SEC para investigar a presença de selenoproteínas em cebolinha (*Allium schoenoprasum*) enriquecida com Se(IV), Se(VI) e selenometionina (SeMet), e verificaram que comparado ao Se(IV) e SeMet a suplementação com Se(VI) leva a maior incorporação de selênio em espécies de baixa massa molecular.

2.4.2.2. Cromatografia por troca iônica

Na separação por troca iônica, a fase estacionária é um sólido com grupos iônicos imobilizados e o mecanismo dominante de separação é por interação eletrostática (Poole, 2003). Para trocadores aniônicos, os sítios ativos são carregados positivamente, retendo ânions, e para trocadores catiônicos são adicionados grupos carregados negativamente que retêm cátions. Nestes casos, geralmente, a fase móvel é uma solução iônica tamponante que contém íons capazes de competir, com as moléculas da amostra, pelos sítios da fase estacionária (Collins *et al.*, 2006).

Este mecanismo de separação é usado para separação de íons inorgânicos, organometálicos e compostos facilmente ionizáveis em condições tamponadas, como: ácidos carboxílicos, bases orgânicas, peptídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos (Collins *et al.*, 2006; Polatajko *et al.*, 2006). Vários trabalhos reportam a aplicação da cromatografia por troca aniônica

(AEX) para análise de especiação de selênio inorgânico (selenito e selenato) e orgânico como os selenoamino ácidos, que podem ser ionizados dependendo do pH da fase móvel, (Floor *et al.*, 2011; Peachey *et al.*, 2009; Sánchez-Martínez *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2011).

Tanto os trocadores aniônicos como catiônicos podem ser usados em HPLC para separação de espécies (Casal *et al.*, 2010; Cubadda *et al.*, 2010). Kápolna *et al.* (2009) demonstraram por HPLC com troca aniônica e catiônica que a selenometionina e a γ -glutamil-Se-metilselenocisteína são as principais espécies orgânicas em raízes de cenouras (plantas enriquecidas com selênio).

2.4.2.3. Cromatografia de fase reversa

A cromatografia de fase reversa consiste na separação de compostos entre uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar (geralmente, cadeias $-C_{18}H_{37}$ ou $-C_8H_{17}$). A eluição é realizada pela diminuição da polaridade da fase móvel usando solventes orgânicos (Polatajko *et al.*, 2006). Quando os compostos da amostra ionizam-se facilmente a fase reversa por par iônico pode ser utilizada. Neste método, um contra-íon orgânico é adicionado à fase móvel formando um par iônico, de carga neutra, com o soluto a ser separado, que passa a ficar mais retido na fase reversa proporcionando a separação (Collins *et al.*, 2006). A cromatografia de fase reversa por par iônico é uma técnica que permite a separação simultânea de moléculas aniônicas, catiônicas e neutras, podendo ser uma alternativa à cromatografia por troca iônica (Collins *et al.*, 2006; Uden, 2002).

Estes métodos de separação também são aplicados em estudos de especiação de selênio (Amoako *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2008). Gosetti *et al.*

(2007) aplicaram a cromatografia de fase reversa por pares de íons, para determinação de espécies de selênio em suplementos alimentares, utilizando uma mistura de água e metanol, ambos com 0,05% de ácido trifluoroacético, como fase móvel para separação das espécies orgânicas e uma mistura de metanol e hidróxido de tetrabutilamônio (1 mmol L^{-1}) para separação das espécies inorgânicas. Também é relatada a sua aplicação em combinação como outros mecanismos de separação como SEC e troca iônica (Dernovics *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Lipiec *et al.*, 2010; Tolu *et al.*, 2011). Lu *et al.* (2012) desenvolveram um método para análise de especiação de quatro espécies de selênio (cátion trimetilselenônio, selenometionina e dois selenoaçúcar) em urina humana, utilizando uma pré-coluna de troca catiônica acoplada em série com uma coluna de fase reversa para separação.

2.4.2.4. Detecção

Apesar do alto custo, o uso da espectrometria de massas como detector para HPLC tem aumentado devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar e estrutura do analito. As diferenças entre os componentes do espectrômetro de massas (fonte de ionização, analisador de massas e detector) classificam os tipos de técnicas de MS aplicadas em HPLC. As interfaces mais usadas são a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por *electrospray* (ESI) e os analisadores mais comuns são os magnéticos, eletrostáticos, quadrupolos lineares, quadrupolos *ion trap* e tempo de voo (Collins *et al.*, 2006).

As dificuldades na análise por espectrometria de massas moleculares surgem quando a ionização do analito é pobre e quando ocorre supressão de

íons devido a matriz da amostra, prejudicando a identificação de espécies (Gammelgaard *et al.*, 2011). Os principais problemas no acoplamento HPLC-MS são referentes a composição do efluente da coluna e tipo de analito (Collins *et al.*, 2006). A análise de compostos difíceis de serem ionizados é prejudicada em HPLC-MS, uma vez que a MS detecta apenas espécies carregadas e o uso de fase móvel contendo componentes não voláteis, como fosfato e EDTA, pode ser proibida.

Outra técnica muito usada para detecção dos compostos separados por HPLC, especialmente de selênio, é a ICP-MS, uma técnica de espectrometria de massas elementar. Sua aplicação em estudos de especiação de selênio aumentou devido ao potencial de separação e detecção, obtidos com a combinação destas técnicas, possibilitando a quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos. Entretanto, enquanto a MS molecular carece de sensibilidade na MS elementar falta especificidade (Dumont *et al.*, 2006b). Por ICP-MS é possível determinar baixas concentrações dos elementos (ng L^{-1}), porém, as altas temperaturas produzidas no plasma destroem toda informação estrutural com a atomização e ionização do composto. Assim, análises usando a MS para aquisição de informação molecular (estrutural) e elementar (isotópica, quantitativa), como ESI-MS e ICP-MS, respectivamente, resultam em uma combinação ideal para estudos de especiação elementar (Schaumlöffel e Tholey, 2011), principalmente quando os padrões não são disponíveis ou a espécie é desconhecida.

2.5. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

Atualmente, a técnica analítica de espectrometria de massas elementar (ICP-MS) é a mais utilizada em estudos de especiação. Esta técnica é caracterizada pelos baixos limites de detecção (ng L^{-1}) obtidos para muitos elementos, ampla faixa linear dinâmica (10^8) e capacidade multi-elementar (Becker, 2007). As principais partes comuns de um ICP-MS são: o sistema de introdução de amostra (nebulizador); a fonte de íons ICP para desolvatação, atomização e ionização; e o espectrômetro de massas. Neste sistema, a solução aquosa é nebulizada, introduzida na fonte de íons e os íons formados são extraídos até a região de alto vácuo usando um sistema de lentes. O feixe de íons é então separado no analisador de massas e detectado (Becker, 2007). A maioria dos instrumentos usados é baseada em filtros de massa quadrupolo (Polatajko *et al.*, 2006; Popp *et al.*, 2010).

Os maiores problemas em ICP-MS são devido à ocorrência de interferências de massas, causadas por espécies atômicas ou poliatômicas com mesma razão m/z do analito, e interferências não espectrais, causadas, principalmente pela matriz da amostra (Becker, 2007; D'Illo *et al.*, 2011; Polatajko *et al.*, 2006). As interferências de massa são menos acentuadas quando a técnica de ICP-MS é empregada após separação cromatográfica (Polatajko *et al.*, 2006; Uden, 2002). Porém, estas interferências podem ser contornadas usando espectrômetros de massas de alta resolução ou com sistemas de celas de reação/colisão usando gases ou mistura de gases, tais como o H_2 , He, NH_3 , O_2 , CH_4 , entre outros (Becker, 2007; Polatajko *et al.*, 2006).

As celas de reação/colisão são multipolos (quadrupolo, hexapolo ou octapolo) posicionados antes do analisador quadrupolo no qual um gás inerte ou reativo é introduzido para eliminar interferências por processos de colisão ou reação. A cela de colisão é usada quando a interferência não é conhecida e o analito é menor que 100 u (íons mais leves). A cela dinâmica de reação (DRC) é limitada a íons moleculares reativos e eficientemente empregada quando a interferência é conhecida. As vantagens da DRC incluem perda mínima de sensibilidade e reações previsíveis e controláveis (D'Illo *et al.*, 2011).

Para determinação de selênio por ICP-MS, as interferências são principalmente correlacionadas a íons poliatômicos que apresentam a mesma razão m/z que os isótopos de selênio (^{80}Se , ^{82}Se , ^{78}Se , ^{77}Se , ^{76}Se e ^{74}Se). Os dois isótopos mais abundantes, ^{80}Se (49,7%) e ^{78}Se (23,6%), sofrem interferência de dímeros de argônio ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$), elemento abundante na fonte de plasma. Os outros isótopos menos abundantes também são afetados por íons poliatômicos como: $^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{81}\text{BrH}^+$ e $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$ (D'Illo *et al.*, 2011; Dressler *et al.*, 2011). Estas interferências têm sido atenuadas por mecanismos de colisão/reação usando gases como o metano (Albuquerque *et al.*, 2012; Bednar *et al.*, 2009; Sucharová, 2011), hidrogênio (Chen *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011) e oxigênio (Gabel-Jensen *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011; Stürup *et al.*, 2006) ou mistura de gases como H_2 e He (Al-Saad, *et al.*, 2011). Silva e Arruda (2012), utilizaram a DRC com oxigênio para detecção da m/z 96 ($^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$) por ICP-MS a fim de identificar proteínas contendo selênio em folhas de girassol, e este também foi o método aplicado neste trabalho (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

Acoplamento SPME-GF e determinação de selênio por GC-MS

1.1. Objetivo

Determinar selênio por GC-MS usando o sistema SPME-GF para extração de Se(IV), após reação de derivação com o 4,5-dicloro1,2-fenilenodiamino em forno de grafite.

Objetivos específicos:

- Investigar a identificação simultânea de espécies de selênio (DMSe, DMDS e Se(IV) derivado) por GC-MS após extração por SPME;
- Avaliar o método original de derivação do Se(IV) para formação do complexo piazoselenol com extração por SPME;
- Separar e identificar as espécies extraídas por GC-MS;
- Aplicar a técnica de SPME acoplada ao forno de grafite para extração do complexo piazoselenol;
- Propor modificações ao meio reacional de derivação do Se(IV), afim de minimizar danos ao revestimento da fibra de SPME e melhorar a eficiência de extração.
- Verificar a derivação do Se(IV) dentro do forno de grafite;
- Otimizar as condições de derivação e extração do complexo piazoselenol dentro do forno de grafite;
- Determinar o teor de selênio total em materiais de referência e amostra de medicamento usando a técnica proposta.

1.2. Parte experimental

1.2.1. Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético digital Mirak;
- Desionizador de água Millipore, modelo Milli Q-Plus;
- Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Perkin Elmer, modelo AAnalyst 600, equipado com corretor Zeeman longitudinal e auto-amostrador AS-800;
- GC-MS *ion trap* (VARIAN, Saturn 2100D) equipado com um injetor tipo *split/splitless* e *liner* para SPME, usado durante a otimização dos procedimentos de derivação e extração;
- GC-MS quadrupolo (SHIMADZU, GC-17A / QP-5000) equipado com um injetor tipo *split/splitless* e *liner* para SPME;
- Forno de microondas (Provecto Analítica, DGT 100 Plus);
- Fibra comercial Supelco de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 μm , condicionada a 250 °C por 30 min no injetor do sistema cromatográfico;
- Frascos de vidro 16 mL equipado com septo de PTFE (politetrafluoroetileno)/silicone Pierce;
- Lâmpada de EDL (do inglês, *electrodeless discharge lamp*) para selênio, Perkin Elmer;
- *Holder* de SPME para fibra (Supelco) modificado (Lopes *et al.*, 2011).

- Tubos de grafite do tipo *end-capped* que possui aberturas mais restritas nas extremidades, com plataforma integrada revestida com grafite pirolítico (PerkinElmer).

1.2.2. Gases, reagentes e soluções

- Gases Ar e He com pureza de 99,999%;
- Solução de brometo de potássio 1% (m/v) (99,8%, Carlo Erba);
- Solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ (99%, Vetec);
- Soluções estoques de DMSe (99,0 %, Aldrich) e DMDS₂Se (96 %, Aldrich) 1000 mg L⁻¹ de Se preparadas por diluição em metanol (99,9%, J.T.Becker) e estocadas a 4 °C. Soluções intermediárias de 10 mg L⁻¹ foram preparadas diariamente por diluição a partir das soluções estoques com metanol. As soluções trabalho foram preparadas por diluição a partir das soluções intermediárias com água;
- Solução estoque de selenito de sódio (99,999%, Aldrich) 1000 mg L⁻¹ de Se preparada por diluição do sal em HNO₃ (65%, Merck) 0,2% (v/v);
- Solução de 4,5-dicloro1,2-fenilenodiamino (DCFDA) (97%, Aldrich), preparada por solubilização em HCl (37,5%, Merck) 0,1 mol L⁻¹ diluído em etanol (36%, Merck);
- Soluções de HCl 10% e 1% (v/v);
- Soluções de HNO₃ 1% (v/v), NH₄Cl (99,8%, Merck) 1% (m/v) e H₂SO₄ (96%, Merck) 0,01 mol L⁻¹;

1.2.3. Condições do GC-MS *ion-trap*

- Coluna HP-5 (30 m-comprimento x 0,25 mm-diâmetro x 0,25 μm -espessura do filme);
- Temperatura de injeção: 250 °C;
- Tempo de dessorção: 5 min;
- Gás de arraste: hélio em um fluxo de 1 mL min⁻¹;
- Programa de temperatura da coluna: 2 min a 80 °C, 80 até 280 °C programado para 10 °C/min e 5 min a 280 °C;
- Temperatura de interface: 260 °C;
- Faixa de massa: 60-350 m/z.

Em todos os experimentos, após extração, a fibra foi transportada em gelo seco até o equipamento de GC-MS para dessorção dos compostos no modo *splitless*.

1.2.4. Condições do GC-MS quadrupolo no modo SIM

Foram aplicadas as mesmas condições cromatográficas (tipo de coluna e programação de temperatura, temperaturas de injeção e de interface, fluxo do gás de arraste) usadas no procedimento **1.2.3**. Neste caso, apenas os íons 252, 254, 137 e 101 m/z, foram monitorados para quantificação, o que torna a técnica extremamente seletiva.

1.2.5. Extração de DMSe e DMDSe usando SPME no modo *headspace*

Um volume de 5 mL de solução contendo DMSe e DMDSe a 100 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, foi adicionado em frasco de vidro para SPME de 16 mL, agitado a 650 rpm a temperatura ambiente. A fibra de PDMS/DVB foi, então, exposta ao *headspace* por 20 min (Campilo *et al.*, 2007). Após esse tempo, a fibra foi inserida no injetor do equipamento de GC-MS.

1.2.6. Derivação do Se(IV) em frasco de vidro para SPME

Um volume de 7 mL de solução de selenito de sódio $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi adicionado em frasco de vidro para SPME de 16 mL; em seguida, foram adicionados 100 μL de HCl 10% (v/v) e 200 μL de DCFDA 1% (m/v). O frasco foi imediatamente fechado e agitado a 650 rpm a temperatura ambiente (26 a 28 °C) por 30 min para a formação do complexo piazoselenol (Guidotti *et al.*, 1999).

Nesta etapa, algumas condições deste método de derivação foram avaliadas de modo univariado: efeito do HCl 10% (v/v) (0-150 μL), volume de DCFDA 1% (m/v) (100-250 μL) e tempo de reação (20-50 min). As condições iniciais usadas foram: 100 μL de HCl 10% (v/v); 200 μL de solução de DCFDA 1% (m/v) e 30 min de derivação.

1.2.7. Extração de Se(IV) derivado por SPME no modo direto

Após derivação, o septo do frasco foi perfurado pela agulha do *holder* de SPME e a fibra de PDMS/DVB foi exposta a solução ficando imersa por 30 min, sob agitação (650 rpm) constante à temperatura ambiente. Após esse tempo, a fibra foi retraída e os compostos retidos foram dessorvidos termicamente para identificação no GC-MS.

1.2.8. Acoplamento SPME-GF

A montagem do acoplamento foi realizada como descrito por Lopes *et al.* (2011). O alinhamento no interior do tubo foi realizado de forma a manter a ponta da fibra à aproximadamente 1 mm da superfície da plataforma do tubo de grafite.

Na Figura 7 é mostrado um diagrama esquemático para extração por SPME-GF. Resumidamente, uma alíquota de solução (99 μ L) é injetada dentro do tubo de grafite (Fig. 7a) gerando uma gota de solução que deve se manter formada dentro do tubo após injeção. Com a exposição da fibra no tubo de grafite, a extração dos compostos é iniciada por meio do contato direto da fase extratora com a solução (Fig. 7b). Depois que o volume da gota de solução diminui, até a completa evaporação do solvente, o vapor entra em contato com a fibra e a extração também passa a ocorrer na fase vapor (Fig. 7c e 7d). A fibra é removida 5 s antes de concluir o tempo da etapa de extração (Fig. 7e) e, imediatamente, transferida para o GC-MS.

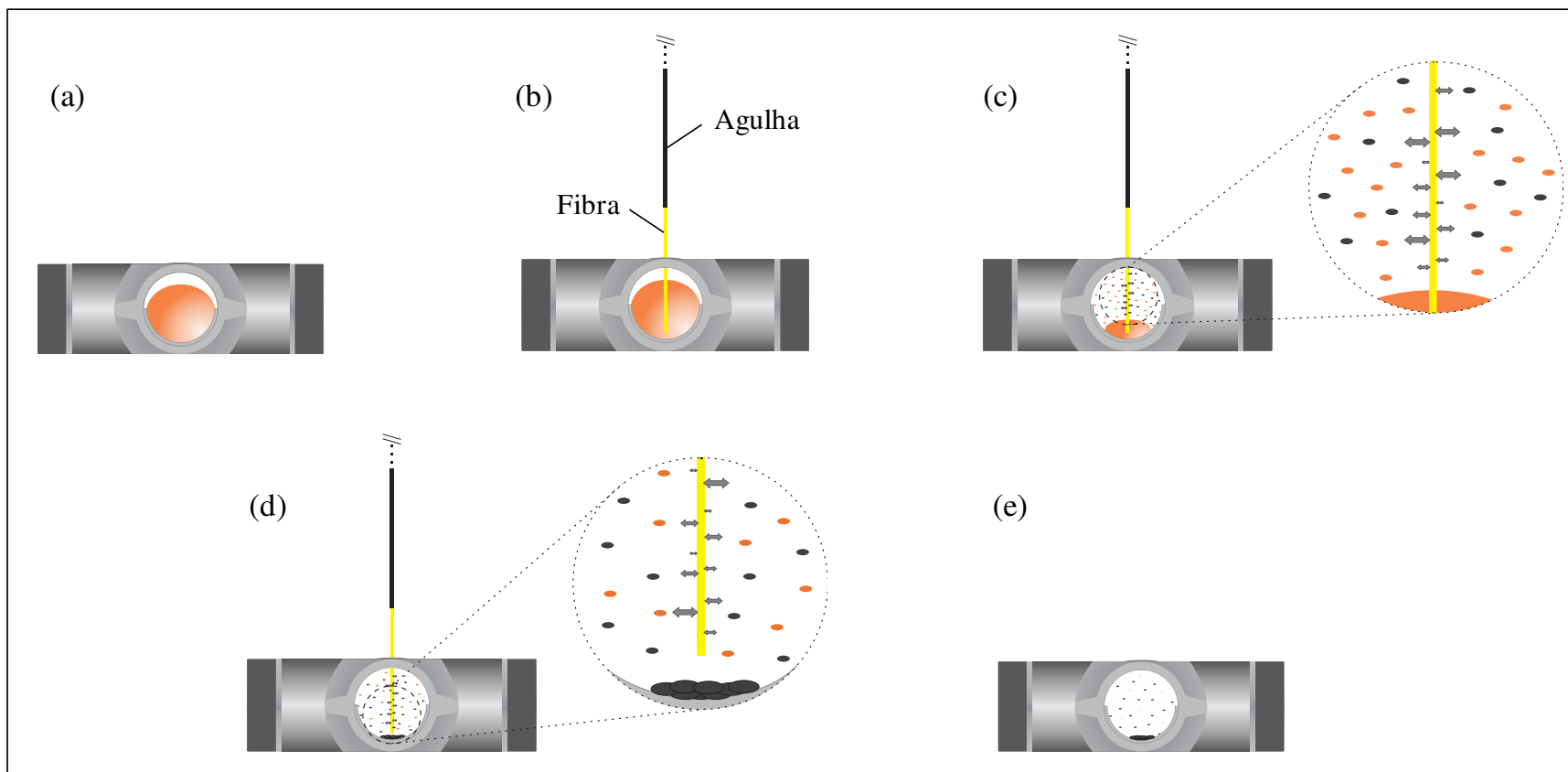


Figura 7. Esquema de exposição da fibra de SPME no tubo de grafite do instrumento de GF AAS (Adaptado de Lopes *et al.*, 2011). (a) Introdução de 99 μL de solução no tubo de grafite; (b) exposição da fibra (início da etapa de extração); (c) e (d) evaporação do solvente (vapor em contato com a fibra) e (e) remoção da fibra. Moléculas de vapor do solvente e analito são representados com círculos laranja e preto, respectivamente

1.2.8.1. Extração por SPME-GF

Para extração usando o sistema SPME-GF, foi usado tubo de grafite com aberturas mais restritas nas extremidades (tubos *end-capped*) onde 99 μL da solução de Se(IV) derivado (procedimento 1.2.6) foram injetados automaticamente pelo amostrador do GF AAS e submetido a uma programação de temperatura (extração, pirólise, atomização e limpeza) (Tabela 4). O fluxo de argônio foi interrompido durante as etapas 1 e 2 para evitar espalhamento da solução dentro do tubo e arraste dos vapores gerados.

Tabela 4. Programação do forno de grafite usada para exposição da fibra de PDMS/DVB na extração do complexo piazoselonol

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de Ar (mL min⁻¹)
1	70	15	99	0
2*	70	396	396	0
3	110	10	20	250
4	300	10	25	250
5	900	10	20	250
6	1900	0	5	0
7	2450	1	3	250

1 e 2 - extração; 3 e 4 - secagem; 5 - pirólise; 6 - atomização; 7 - limpeza

* No programa, essa etapa foi dividida em 4 outras com de 99 s para tempo de rampa e de permanência

A fibra de PDMS/DVB foi exposta no atomizador no início da etapa 1 a uma temperatura de extração de 70 °C por um tempo de aproximadamente 15 min (durante as etapas de 1 a 2, Tabela 4). Em seguida, a fibra foi retraída

5 s antes de concluir o tempo da última etapa de extração para evitar a dessorção dos compostos da fibra devido ao aumento na temperatura (para 110 °C) na etapa seguinte (etapa 3, Tabela 4). Após extração, os compostos retidos na fibra foram, imediatamente, dessorvidos e determinados no GC-MS.

O sinal residual de selênio (absorbância integrada) foi monitorado durante a etapa de atomização (etapa 6, Tabela 4). Porém, é importante ressaltar que este programa foi usado somente para extração. Nenhuma quantificação foi realizada usando esta programação de temperatura do forno de grafite.

1.2.8.2. Modificações para a reação de formação do complexo piazoselenol

Devido a fragilidade da fibra na presença de ácidos, outros meios de derivação foram testados, em substituição a solução de HCl 10% (v/v) inicialmente utilizada (procedimento **1.2.6**).

Os diferentes meios testados foram, a substituição dos 100 µL de solução de HCl 10% (v/v) pelo mesmo volume de:

- solução de HCl 1% (v/v);
- solução de HNO₃ 1% (v/v);
- solução de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ ou
- solução de NH₄Cl 0,01 mol L⁻¹.

Nestes experimentos a extração foi realizada por SPME-GF como descrito no procedimento **1.2.8.1**.

1.2.8.3. Derivação e extração no forno de grafite

Além do procedimento de extração dentro do forno, também foi investigada a realização da etapa de derivação. Para este experimento, uma proporção aproximada daquela usada no método de derivação convencional (procedimento 1.2.6) foi mantida para volume de solução de selenito e de solução de DCFDA 1% (m/v). As temperaturas para os testes iniciais de derivação e extração dentro do forno foram selecionadas com base em trabalhos que relatam a formação do complexo piazolenol, a partir do 4,5-dicloro-1,2-fenilenodiamino, e extração deste por SPME (Guidotti *et al.*, 1999; Campillo *et al.*, 2007).

Para derivação em forno de grafite, 3 μL de DCFDA 1% (m/v) e 96 μL da solução de selenito de sódio $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foram coletados e injetados automaticamente no forno pelo amostrador do GF AAS e submetida a uma programação de temperatura. O programa de aquecimento do GF foi, então, dividido em etapas referentes aos tempos de derivação, extração, secagem, pirólise, atomização e limpeza (Tabela 5).

Após a etapa de derivação por 2 min à 40 °C (etapa 1 e 2, Tabela 5), a fibra de PDMS/DVB foi exposta à solução dentro do forno de grafite no início da etapa de extração a uma temperatura de 70 °C, permanecendo por aproximadamente 15 min (durante as etapas de 3 e 4, Tabela 5), sendo retraída 5 s antes do término da etapa de extração do forno de grafite, e, imediatamente, transferida para o GC-MS.

O sinal residual de selênio (absorbância integrada) foi monitorado durante a etapa de atomização (etapa 8, Tabela 5) afim de avaliar a eficiência de derivação do Se(IV) dentro do forno.

Tabela 5. Programação do forno de grafite aplicada para testes de derivação do Se(IV) e extração do complexo piazoselonol dentro do forno

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de Ar (mL min⁻¹)
1	40	5	55	0
2	40	30	30	0
3	70	15	99	0
4*	70	396	396	0
5	110	10	20	250
6	300	10	20	250
7	900	10	20	250
8	1900	0	5	0
9	2450	1	3	250

1 e 2 - derivação; 3 e 4 - extração; 5 e 6 - secagem; 7 - pirólise; 8 - atomização; 9 - limpeza

* No programa, essa etapa foi dividida em 4 outras com 99 s para tempo de rampa e de permanência

1.2.8.4. Avaliação das condições de derivação e extração no GF

A partir destes experimentos, tanto a derivação do Se(IV) quanto a extração foram realizadas dentro do forno de grafite.

As condições foram avaliadas usando análise univariada e todos os experimentos realizados em triplicata. As condições iniciais foram: injeção de 96 µL de amostra mais 3 µL de solução de DCFDA 1% (m/v); derivação a 40 °C por 120 s e extração a 70 °C por 906 s. Os compostos extraídos pela fibra foram determinados por GC-MS.

a) Avaliação do volume de HNO₃

Diferentes volumes (100-300 µL) de solução de HNO₃ 1% (v/v) foram adicionados a 7 mL de solução de selenito de sódio 100 µg L⁻¹, e a solução foi homogeneizada em frasco de vidro. Em seguida, 96 µL desta solução de Se(IV) e 3 µL de DCFDA 1% (m/v) foram injetados no forno e submetidos a mesma programação de temperatura do procedimento **1.2.8.3** (Tabela 5). Após 2 min de derivação à 40 °C (etapa 1 e 2) a fibra de PDMS/DVB foi exposta à solução dentro do forno de grafite, a uma temperatura de extração de 70 °C, por aproximadamente 15 min (durante as etapas de 3 e 4), e retraída 5 s antes do término da etapa 3. Em seguida, os compostos sorvidos pela fibra foram determinados por GC-MS.

b) Concentração do derivante DCFDA

Foram avaliadas três concentrações de DCFDA: 1, 2 e 3% (m/v). Para tanto, 96 µL de solução de Se(IV) 75 µg L⁻¹ e 3 µL do derivante foram injetados no forno de grafite, e submetidos a mesma programação de temperatura do procedimento **1.2.8.3** (Tabela 5). Após etapas de derivação (2 min a 40 °C) e extração (15 min a 70 °C) os compostos sorvidos pela fibra foram determinados por GC-MS.

c) Temperatura de derivação

Neste experimento, 96 µL de solução de Se(IV) 75 µg L⁻¹ e 3 µL de DCFDA 1% (m/v) foram injetados no forno de grafite e diferentes

temperaturas entre 30 e 70 °C foram aplicadas na etapa de derivação (etapa 1 e 2 da programação de temperatura da Tabela 5). Após as etapas de derivação e extração (15 min a 70 °C) os compostos sorvidos pela fibra foram determinados por GC-MS.

d) Tempo de extração e derivação

Como o experimento estava sendo realizado empregando o tempo máximo permitido pelo programa do forno de grafite (1125 s por corrida), foi necessário, inicialmente, verificar tempos menores que 15 min para a etapa de extração. Assim, mantendo as condições de derivação (2 min a 50 °C) da mistura de 96 µL de solução de Se(IV) 75 µg L⁻¹ com 3 µL de DCFDA 1% (m/v), o tempo de extração foi avaliado entre 10 e 15 min.

Otimizado o tempo de extração, a mesma proporção de 96:3 µL de padrão e derivante, respectivamente, foi injetada no forno de grafite e um intervalo entre 1 e 5 min foi avaliado para etapa de derivação, fixando as condições de extração em 12 min e 70 °C. Os compostos extraídos foram, então, determinados por GC-MS.

e) Temperatura de extração

Neste experimento, 96 µL de solução de Se(IV) 75 µg L⁻¹ e 3 µL de DCFDA 1% (m/v) foram injetados no forno de grafite e diferentes temperaturas de extração foram avaliadas na faixa de 60 a 90 °C durante as etapas 2 e 3 (Tabela 6). Após derivação (1 min a 50 °C) e extração, os compostos sorvidos pela fibra foram determinados por GC-MS.

Tabela 6. Programação do forno de grafite aplicada para otimizar a temperatura de extração do complexo piazoselenol após derivação no forno

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de Ar (mL min⁻¹)
1	50	1	60	0
2	60 – 90	15	99	0
3*	60 – 90	320	320	0
4	110	10	20	250
5	300	10	20	250
6	900	30	20	250
7	1900	0	5	0
8	2450	1	3	250

1 - derivação; 2 e 3 - extração; 4 e 5 - secagem; 6 - pirólise; 7 - atomização; 8 - limpeza

* No programa, essa etapa foi dividida em 4 outras com 80 s para tempo de rampa e de permanência

1.2.9. Determinação de selênio

1.2.9.1. Parâmetros analíticos

Soluções de Se(IV) foram preparadas com concentrações entre 1,5 e 45 $\mu\text{g L}^{-1}$, contendo, aproximadamente, 0,03% (v/v) de HNO_3 . Em seguida, 96 μL destas soluções de Se(IV) e 3 μL de DCFDA 1% (m/v) foram injetados no forno de grafite e submetidos a uma programação de temperatura (Tabela 7). Após derivação (etapa 1, Tabela 7) a fibra de PDMS/DVB foi exposta a solução dentro do tubo de grafite, durante as etapas 2 e 3 (Tabela 7). O

complexo de Se(IV) extraído pela fibra foi, então, quantificado por GC-MS no modo SIM.

Tabela 7. Programação do forno de grafite aplicada na derivação do Se(IV) e extração do complexo piazoselenol por SPME-GF

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de Ar (mL min⁻¹)
1	50	1	60	0
2	80	15	99	0
3*	80	320	320	0
4	110	10	20	250
5	300	10	20	250
6	900	30	20	250
7	1900	0	5	0
8	2450	1	3	250

1 - derivação; 2 e 3 - extração; 4 e 5 - secagem; 6 - pirólise; 7 - atomização; 8 - limpeza

* No programa, essa etapa foi dividida em 4 outras com 80 s para tempo de rampa e de permanência

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica (International Conference on Harmonization, 2005; Ribani *et al.*, 2004), utilizando as equações a seguir:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad LQ = 10 \frac{s}{S}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação (intercepto) e S é o coeficiente angular da curva analítica (inclinação). Os parâmetros da curva (coeficiente de correlação, coeficiente linear e

coeficiente angular) e a estimativa do desvio padrão destes parâmetros foram calculados utilizando o Software Microcal Origin®.

O sinal de selênio residual (absorbância integrada), medido durante a etapa de atomização do programa de GF AAS, foi monitorado como um parâmetro para avaliar a eficiência de derivação do Se(IV).

1.2.9.2. Preparo das amostras

O teor de selênio foi determinado em dois materiais de referência certificado (BCR-414, elementos traços em plâncton, e SRM 1643e, elementos traços em água) e em amostra de medicamento.

Aproximadamente 200 mg de amostra (plâncton e medicamento) foram pesadas e decompostas em forno micro-ondas usando uma mistura de ácido nítrico concentrado (65% v/v) e peróxido de hidrogênio (30% v/v) (Tabela 8). Após decomposição, o excesso de ácido foi removido usando um banho de areia, e as amostras foram filtradas e diluídas adequadamente.

Tabela 8. Condições de decomposição das amostras em forno micro-ondas

Amotras	Reagentes (mL)		Programa de digestão	
	HNO ₃	H ₂ O ₂	Tempo (min)	Potência (W)
Plâncton ^a	4	1	6	400
Medicamento ^b	3	0,5	2	400
			10	790

^a Material de referência certificado BCR-414

^b Medicamento manipulado, a base de quelato de selênio, adquirido em farmácia local

O material de plâncton foi filtrado para um volume de 5 mL. Para determinação do teor de Se total, uma alíquota de 2,5 mL de solução foi transferida para frasco de 10 mL contendo 3 mL de HCl 2 mol L⁻¹ e 1 mL de KBr 1% (m/v), a mistura foi, então, levemente agitada por 1 min à temperatura ambiente, e, em seguida, foram adicionados 3 mL de NaOH 2 mol L⁻¹, e o volume completado com água.

A amostra de medicamento foi filtrada para volume de 50 mL, e, em seguida, 260 µL desta solução foram transferidas para frasco de 10 mL e tratados com HCl e KBr para a determinação do teor de Se total, como descrito para a amostra de plâncton.

As soluções finais de plâncton, medicamento e a amostra de água (SRM 1643e) foram, então, analisadas para determinação de Se total em termos de Se(IV), usando as mesmas condições de derivação e extração aplicadas na calibração (procedimento **1.2.9.1**). Também foram realizadas determinações de selênio nas soluções das amostras (plâncton e medicamento) sem redução com a mistura de HCl e KBr.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Extração simultânea de espécies de Se por SPME

A fim de aplicar o sistema SPME-GF para extração e determinação de espécies de selênio (DMSe, DMDS_e e Se(IV) derivado) por GC-MS, alguns experimentos foram investigados para verificar a extração simultânea destes compostos.

Dentre as espécies de selênio, o dimetilseleneto e o dimetildisseleneto são classificadas como voláteis o que favorece a determinação por cromatografia gasosa. Vários trabalhos demonstram o uso da SPME para a extração desses compostos em diferentes amostras (Lenz *et al.*, 2011; Dietz *et al.*, 2003, Dietz *et al.*, 2004a). Após extração por SPME no modo *headspace*, de acordo com o procedimento aplicado por Campillo *et al.* (2007), foi verificada a separação e identificação dessas espécies voláteis (DMSe e DMDS_e) por GC-MS, como pode ser observado no cromatograma da Figura 8. O pico 1, com tempo de retenção de 2,10 min, foi identificado como DMSe e o pico 2, com tempo de retenção 6,54 min, correspondeu ao DMDS_e. Porém, nenhum sinal para as espécies DMSe e DMDS_e foi observado quando a extração simultânea de DMSe, DMDS_e e Se(IV) derivado foi avaliada por SPME com detecção por GC-MS.

Além disso, devido à volatilidade do dimetilseleneto (ponto de ebulição de 49,8 °C à 760 Torr) e do dimetildisseleneto (ponto de ebulição de 158,9 °C à 760 Torr) (SciFinder Scholar, 2007), alguns testes indicaram que o acoplamento SPME-GF não favorece a extração desses compostos. O aquecimento em forno de grafite (sistema aberto) pode promover uma maior

dispersão dessas espécies, bem como a sua desorção da fibra ainda no tubo, prejudicando a eficiência de extração por este sistema. Lopes *et al.* (2011), também observou que para a espécie mais volátil (monobutiltrietilestanho) nenhum sinal era observado no cromatograma quando a extração era realizada por SPME-GF, mesmo fortificando as amostras com altas concentrações das espécies, enquanto que a espécie menos volátil (tributiletilestanho) apresentava maior sinal analítico.

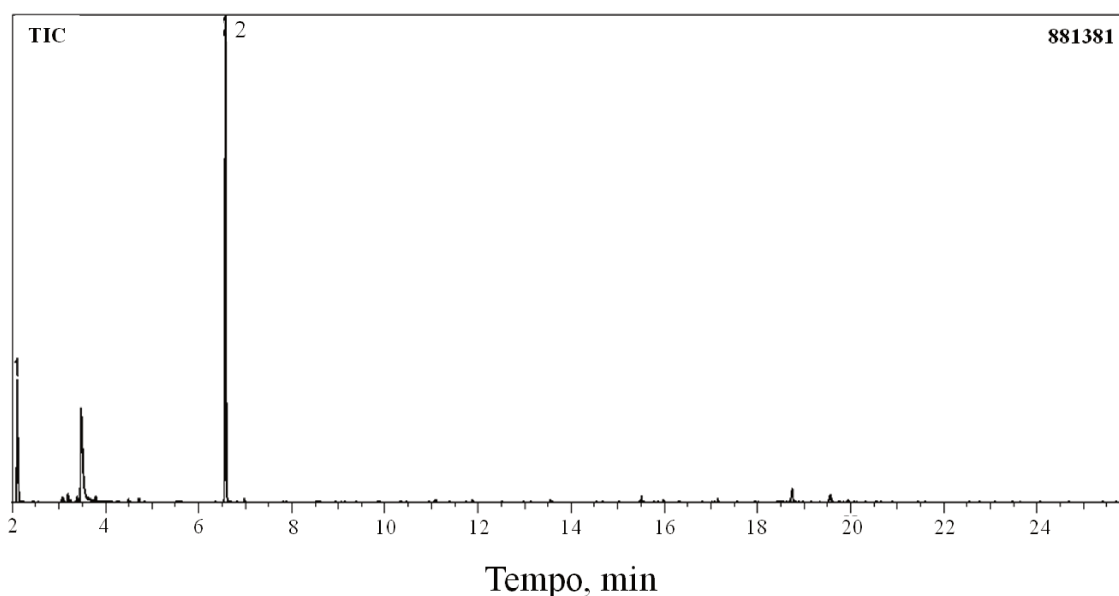


Figura 8. Cromatograma da misturas de padrões (DMSe a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e DMDSa a $40 \mu\text{g L}^{-1}$) obtido por SPME-GC-MS. 1: DMSe e 2: DMDSa

Assim, as pesquisas prosseguiram buscando avaliar a aplicação do acoplamento SPME-GF na extração de Se(IV) derivado e a sua determinação por GC-MS.

1.3.2. Derivação do Se(IV) e extração por SPME (método original)

Antes de aplicar o sistema SPME-GF para extração do complexo piazoselenol, o método “original”, descrito por Guidotti *et al.* (1999) para determinação de selenito, foi empregado para avaliar a etapa de derivação com extração por SPME e, também, a separação e identificação da espécie por GC-MS. Por este método o Se(IV) reage seletivamente com DCFDA formando o complexo piazoselenol que pode ser extraído por SPME e determinado por GC-MS.

Para a reação de derivação foram avaliadas a quantidade de ácido clorídrico e de reagente de derivação e o tempo de reação. Quando diferentes volumes de solução de HCl 10% (v/v), foram adicionados na faixa de 0 a 150 μL (pH entre 1,5 e 3) ao meio de derivação, a melhor resposta foi com 100 μL (Figura 9). Ao avaliar a quantidade de DCFDA 1% (m/v) na faixa de 100 a 250 μL foi observado um aumento em sensibilidade com adição do reagente até 200 μL (Figura 10). A partir desse ponto, não houve diferença significativa entre as médias ($n = 3$) em nível de confiança de 95%.

Trabalhando a temperatura ambiente, não foram observadas mudanças expressivas na sensibilidade para tempos de derivação acima de 30 min (Figura 11). Otimizadas as condições para a formação do complexo piazoselenol, o sistema SPME acoplado ao forno de grafite foi, então, aplicado para extração deste composto.

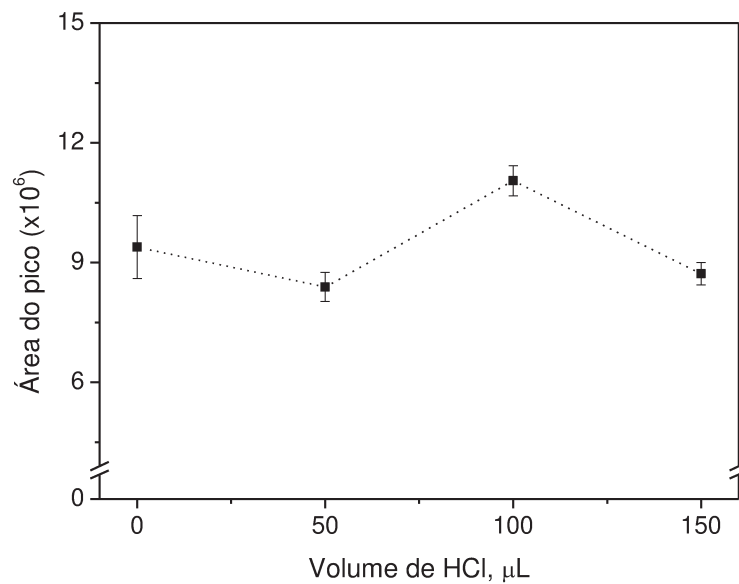


Figura 9. Efeito da quantidade de HCl 10% (v/v) para derivação do Se(IV) com DCFDA em frasco de vidro (n = 3)

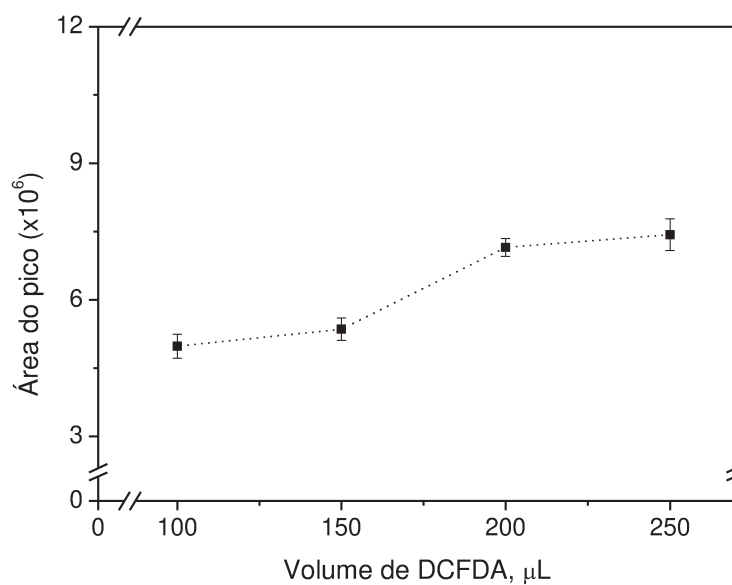


Figura 10. Efeito da quantidade de DCFDA 1% (m/v) para derivação do Se(IV) em frasco de vidro (n = 3)

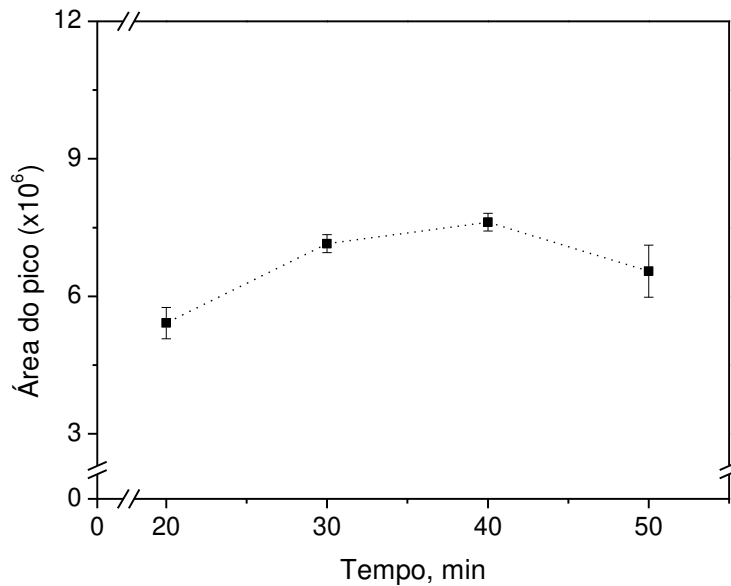


Figura 11. Efeito do tempo de reação para derivação do Se(IV) com DCFDA em frasco de vidro (n = 3)

1.3.3. Extração do complexo piazoselenol usando SPME acoplada ao forno de grafite

A Figura 12 apresenta o cromatograma de separação dos compostos extraídos usando o acoplamento SPME-GF. O uso desse sistema para extração do complexo piazoselenol foi bem sucedido, apresentando um sinal relativamente intenso. Além do pico de interesse, no tempo de retenção de 14,1 min, vários outros picos também foram observados e identificados como sendo produto da degradação da fibra, devido às condições do meio de extração, provavelmente, acidez e temperatura.

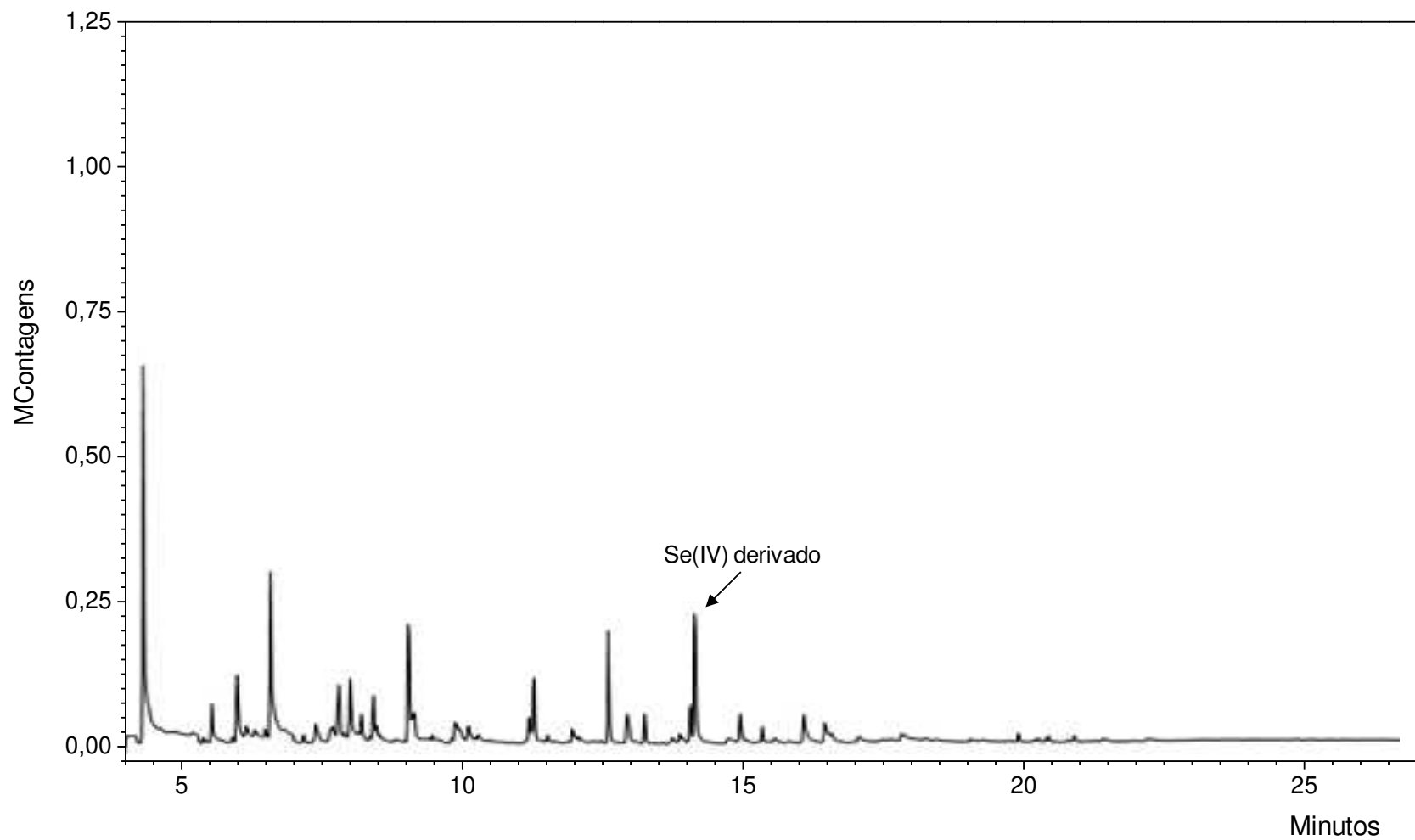


Figura 12. Cromatograma dos compostos extraídos por SPME-GF, após reação de formação do complexo piazoselenol ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV) derivado com DCFDA), e detectados por GC-MS

1.3.4. Avaliação das modificações para a derivação do Se(IV) com DCFDA

No sistema SPME-GF dois modos de extração são considerados. Inicialmente, o método se caracteriza como uma extração direta, devido ao contato da fibra com o volume de solução (99 μ L) injetado no tubo de grafite. Entretanto, com a evaporação do solvente no GF, a extração do analito na fase vapor passa a ser o mais importante processo de extração.

Sabe-se que o contato da fibra de SPME com o meio de extração, tanto em valores altos de pH, como baixos, danifica o revestimento de extração (Pawliszyn, 1997). Assim, o uso da solução de HCl 10% (v/v), comumente usado na reação de derivação do Se(IV) com o DCFDA, pode diminuir o tempo de vida útil da fibra, devido ao contato com a solução na etapa inicial de extração, e também devido à volatilização do ácido e interação deste com a fibra dentro do tubo de grafite.

Comparando o cromatograma dos compostos extraídos após derivação da solução de Se(IV) usando HCl 10% (v/v) com o cromatograma dos compostos extraídos após derivação sem adição do ácido ao meio reacional (Figura 13a e b), as diferenças mais evidentes são a ausência do pico 2, no tempo de retenção de 14,8 min que corresponde ao derivante (DCFDA), e a presença de picos mais intensos na faixa de 4 a 10 min. Nas mesmas condições, resultados semelhantes também foram observados para os brancos (Figura 13a e b). Os picos foram correspondentes a produtos de danos causados ao revestimento da fibra, quando foram utilizados 100 μ L de HCl 10% (v/v) (Figura 13b), indicando que a fibra sofre maiores prejuízos na presença do ácido, o que pode diminuir a eficiência de extração.

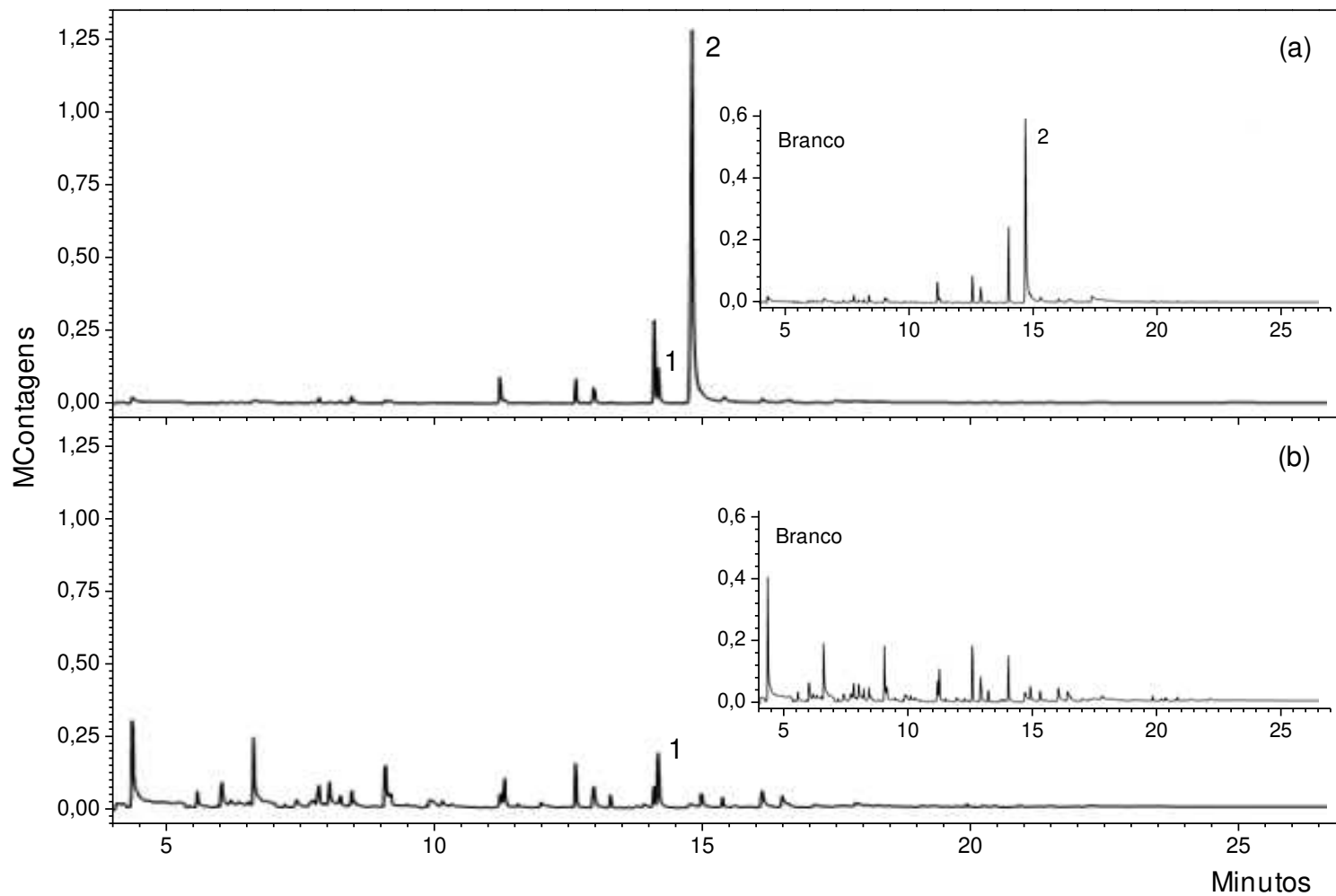


Figura 13. Cromatogramas dos compostos extraídos por SPME-GF e detectados por GC-MS, após reação de derivação do Se(IV) ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) com DCFDA e brancos: (a) sem usar o ácido e (b) usando $100 \mu\text{L}$ de HCl 10% (v/v). (1 - complexo piazoselenol, 2 - DCFDA)

Sabendo que a reação do Se(IV) com o DCFDA para a formação do complexo piazoselenol requer um meio ácido e buscando aumentar o tempo de vida útil da fibra, minimizando os danos ao revestimento, foram investigadas a utilização de outros reagentes, como a solução de NH_4Cl , ácidos menos voláteis que o HCl, como o HNO_3 e H_2SO_4 , e, também, uma solução mais diluída de HCl.

Como se observa na Figura 14, diminuindo 10 vezes a concentração do ácido clorídrico ou usando outros reagentes para preparar a solução de selenito, os cromatogramas de separação dos compostos extraídos por SPME-GF, após reação de derivação em frasco de vidro, apresentam picos menos intensos, entre os tempos de retenção de 4 a 10 min, indicando que a fibra sofre menos danos quando se utiliza solução de HNO_3 , H_2SO_4 , NH_4Cl ou uma solução de HCl 1% (v/v).

Além disso, ocorreu um favorecimento na extração por SPME-GF com um aumento representativo na área do pico do analito (Figura 15). Porém, foi verificado maior desvio padrão para resultados obtidos utilizando a solução de HCl 1% (v/v). O HNO_3 , além de ser usualmente aplicado para os propósitos da GF AAS, é menos volátil que o HCl o que pode minimizar os danos ao revestimento da fibra na fase vapor, contribuindo para a melhora do sinal (maior área) e da precisão. Assim, a solução de HCl 10% (v/v), comumente usada na derivação do Se(IV) (Guidotti *et al.*, 1999; Campilo *et al.*, 2007), foi substituída por uma de HNO_3 , pois foram observadas maiores áreas e boa precisão (RSD = 6,98%) das medidas nesta condição.

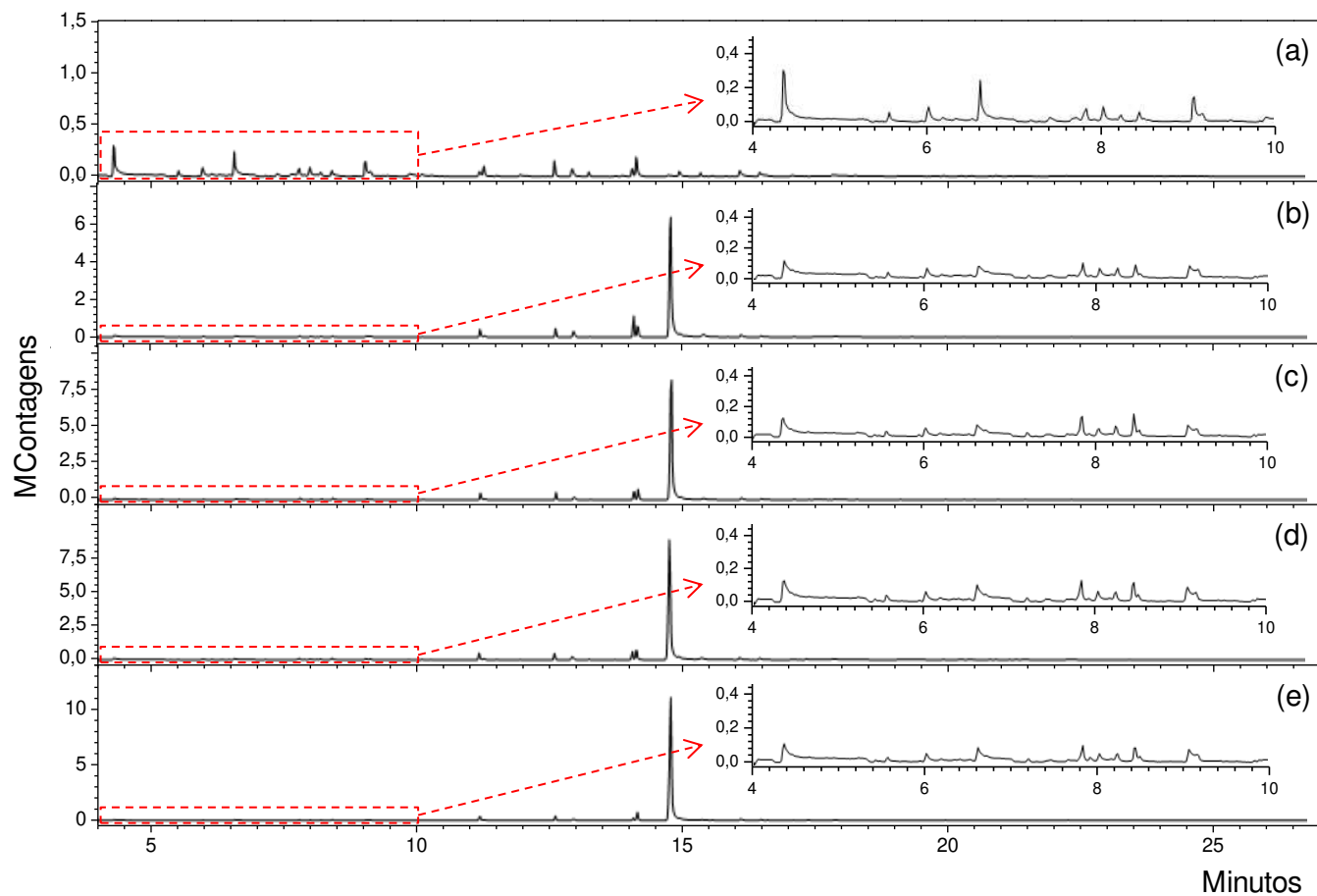


Figura 14. Cromatogramas dos compostos extraídos por SPME-GF e detectados por GC-MS, após reação de derivação do Se(IV) ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) com DCFDA, quando foram usados diferentes reagentes: (a) - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 10% (v/v), (b) - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 1% (v/v), (c) - adição de $100 \mu\text{L}$ de NH_4Cl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (d) - adição de $100 \mu\text{L}$ de HNO_3 1% (v/v), (e) - adição de $100 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pico 1 - complexo piazoselenol)

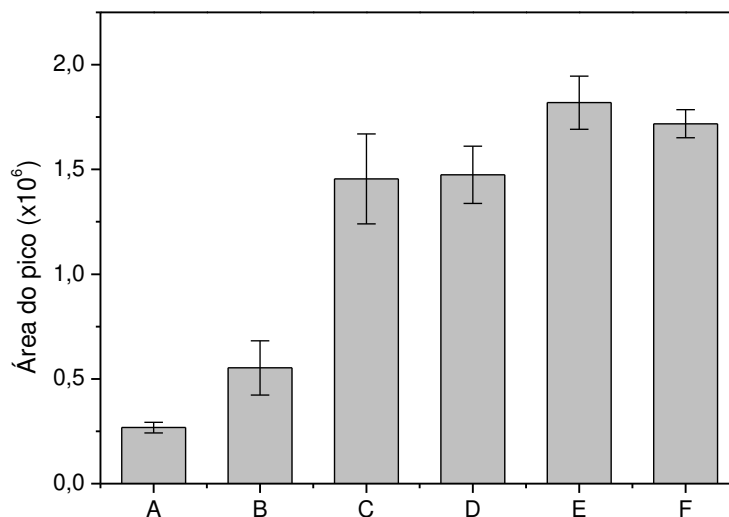


Figura 15. Médias das áreas ($n = 3$) dos picos cromatográficos do complexo piazoselenol, obtidos após derivação da solução de Se(IV) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ com DCFDA, usando diferentes reagentes como fonte de íons H^+ , extração por SPME-GF e detecção por GC-MS. A - sem adição de ácido, B - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 10% (v/v), C - adição de $100 \mu\text{L}$ de HCl 1% (v/v), D - adição de $100 \mu\text{L}$ de NH_4Cl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, E - adição de $100 \mu\text{L}$ de HNO_3 1% (v/v), F - adição de $100 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

1.3.5. Derivação e extração no forno de grafite

Até esta etapa do experimento, os testes para extração do complexo piazoselenol por SPME dentro do forno de grafite foram realizados após o procedimento de derivação do Se(IV) em frasco de vidro. Este método gera muito resíduo (aproximadamente 7 mL de solução por análise) e requer cerca de 30 min para ocorrer. Assim, buscando automatizar a etapa de derivação e minimizar o tempo de análise, também foram investigadas a realização de ambas as etapas (derivação e extração) dentro do forno de grafite do espectrômetro de absorção atômica.

A Figura 16 mostra os resultados obtidos pelos dois procedimentos de derivação com extração por SPME-GF. Em condições ainda não otimizadas, após 2 min a 40 °C, e utilizando apenas 96 µL de solução de Se(IV) mais 3 µL de DCFDA, o procedimento de derivação dentro do tubo de grafite permitiu a formação do complexo piazoselenol. Além disso, não houve diferença significativa entre as médias ($p = 0,05$) obtidas quando esta etapa é realizada no GF ou em frasco. Apesar do número de experimento ser pequeno ($n = 3$), o que pode ter contribuído para a igualdade estatística observada, nos procedimentos seguintes foi empregado o GF para a derivação e extração do Se(IV), pois, este procedimento foi também mais rápido, menos poluente e permitiu automatizar a etapa.

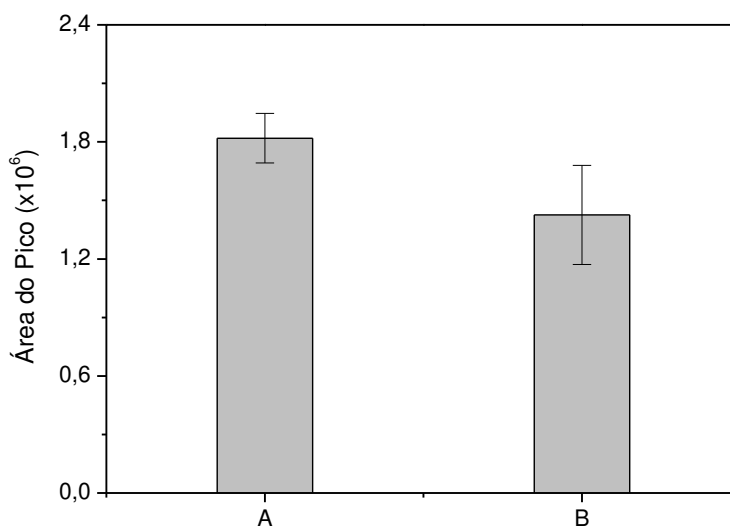


Figura 16. Médias das áreas ($n = 3$) dos picos cromatográficos do complexo piazoselenol, obtidas após extração por SPME-GF e detecção por GC-MS. A - derivação realizada em frasco de vidro; B - derivação e extração no forno de grafite (condições ainda não otimizadas)

Outra diferença muito importante do sistema SPME-GF quando comparado ao método original envolve a ausência da agitação da solução (analito + agente de derivação). No método original, a agitação é usada para facilitar a derivação e extração, homogeneizando a solução e aumentando a difusão do analito para a fase extratora. No GF a mistura da solução de Se(IV) com o derivante aconteceu somente durante a injeção destas soluções dentro do tubo de grafite, e foi dependente da perfeita formação da gota após injeção.

Em casos onde a injeção das soluções no tubo de grafite não permitia a formação de uma gota, devido ao mau alinhamento do capilar de injeção, não eram observados sinais para o analito por GC-MS. Entretanto, um alto sinal residual (absorbância integrada) de selênio era obtido na etapa de atomização do programa do GF AAS, indicando que a reação de derivação do Se(IV) não havia ocorrido. Quando a gota se mantinha formada sobre a plataforma do tubo, a reação de derivação era bem sucedida e apenas um pequeno sinal residual era encontrado.

Para uma solução de $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se(IV), após derivação, a absorbância integrada residual não foi maior que $0,044 \pm 0,010 \text{ s}^{-1}$ ($n = 15$), mostrando que a espécie volátil de selênio foi formada, vaporizada, extraída, e, em seguida, perdida durante a etapa de pirólise, devido ao aumento de temperatura e a vazão de Ar (250 mL min^{-1}). Assim, foi observado que a perfeita formação da gota no tubo garante um ambiente mais homogêneo, tanto para a reação de derivação quanto para a extração do complexo formado por SPME.

1.3.6. Avaliação das condições de derivação e extração

Dentre os fatores que podem afetar esse novo sistema de derivação e extração, que combina a SPME com as características do forno de grafite, foram avaliadas algumas condições envolvidas na reação de derivação (concentração do ácido, concentração do derivante, temperatura e tempo de reação) e na extração (temperatura e tempo).

Observando a Figura 17, variando os volumes de solução de HNO₃ 1% (v/v), entre 100 e 300 µL (pH entre 1,7 e 2,6), a melhor resposta foi observada quando a solução padrão de selenito foi prepara usando 250 µL deste ácido, correspondendo a pH 1,8, e concentração final de HNO₃ de 0,034% (v/v).

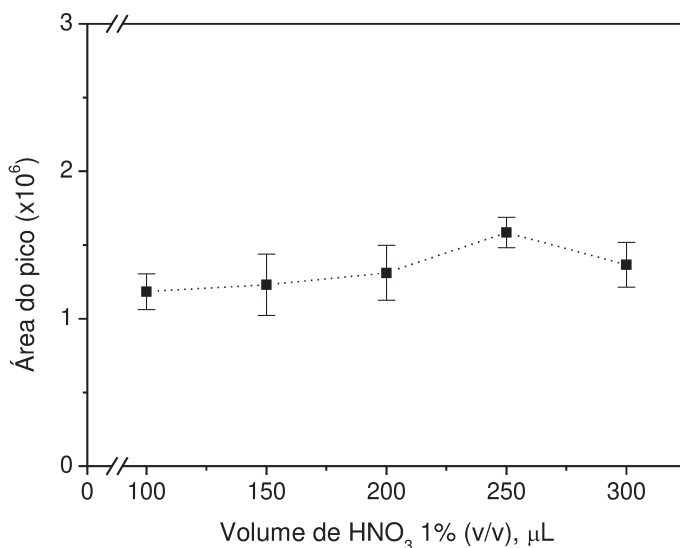


Figura 17. Efeito do HNO₃ na derivação do Se(IV) usando o DCFDA como agente de derivação (n = 3)

Todos os experimentos foram realizados com o volume máximo (99 μL), limitado pelo forno de grafite. Foi verificado que volumes de solução de DCFDA maiores do que para a proporção 96:3 de solução de Se(IV) e derivante, respectivamente, não permitiam formar a gota dentro do tubo, inviabilizando a extração pelo método SPME-GF. Volumes maiores de solução de DCFDA implicam na introdução de maior quantidade de álcool, visto que esta solução é preparada em meio etanólico, diminuindo a tensão superficial da solução (padrão + derivante). Assim, a proporção 96:3 foi mantida, e a quantidade de DCFDA foi, então, avaliada, variando a sua concentração entre 1 e 3% (m/v).

Foi verificado que o aumento da concentração do derivante diminui a eficiência de extração do complexo de piazoselenol e aumenta o desvio padrão das medidas (Figura 18). Isso pode ser, provavelmente, devido à competição pelos sítios da fibra de SPME, visto que tanto o complexo quanto o derivante podem ser extraídos pelo revestimento de PDMS/DVB. Logo, os experimentos seguintes prosseguiram usando 3 μL de DCFDA 1% (m/v) para cada 96 μL de solução padrão de Se.

O efeito da temperatura de derivação do Se(IV) foi estudado entre 30 e 70 $^{\circ}\text{C}$, e foi encontrada maior área para o complexo piazoselenol quando este procedimento de derivação foi realizado a 50 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 19) por um tempo de 2 min. Trabalhando nestas condições de derivação para formação do complexo piazoselenol, a influência do tempo de extração foi avaliada, antes do tempo de derivação para encontrar tempo menores sem perda significativa no sinal, pois, inicialmente, os experimentos estavam sendo realizados com o tempo máximo permitido para uma corrida pelo programa do equipamento do GF

AAS (1125 s, com 2 min para derivação, e, aproximadamente, 15 min para extração).

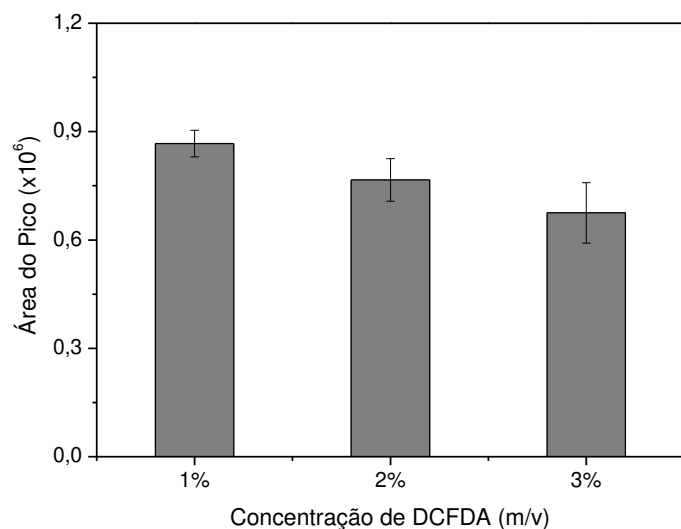


Figura 18. Efeito da concentração de DCFDA na extração do complexo piazoselenol por SPME-GF (n = 3)

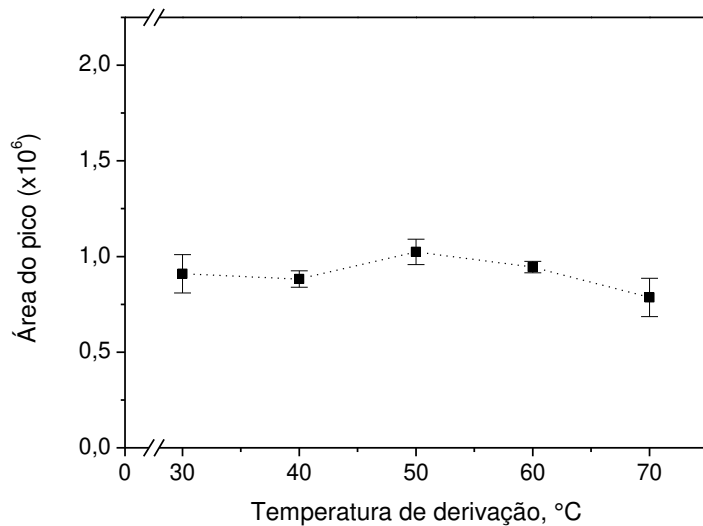


Figura 19. Efeito da temperatura de derivação do Se(IV) com DCFDA (n = 3)

Como pode ser observado na Figura 20, o menor tempo de sorção sem perda significativa do sinal foi encontrado com 12 min de extração. Em tempos de 11min de extração houve aumento do desvio padrão. Ao investigar o tempo de derivação do Se(IV) variando a faixa de 1 a 5 min, não foram observadas diferenças significativas entre as áreas do complexo piazoselenol extraído por SPME-GF, indicando que a reação de derivação já pode ser considerada quantitativa com um tempo de apenas 1 min.

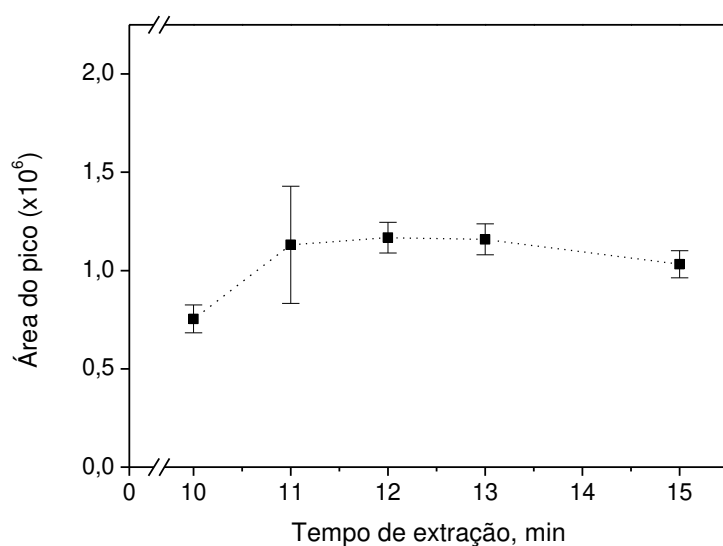


Figura 20. Efeito do tempo de extração do complexo piazoselenol por SPME-GF (n = 3)

Também, foi verificado um aumento na área do sinal quando a temperatura de extração variou de 60 a 80 °C, não sendo observadas mudanças expressivas entre as temperaturas de 80 e 90 °C (Figura 21). Entretanto, quanto maior a temperatura de extração, maior é a intensidade e o número de compostos desorvidos do revestimento de PDMS/DVB. Observando a Figura 22, além do pico do analito no tempo de retenção de 14,2

min, os cromatogramas apresentam picos mais intensos em quase toda região cromatográfica, que podem ser provenientes do meio de extração ou até mesmo da degradação da fibra. Conseqüentemente, a temperatura de 80 °C foi selecionada como ótima por ser a menor temperatura sem perda significativa de sinal para o complexo piazoselenol extraído por SPME-GF.

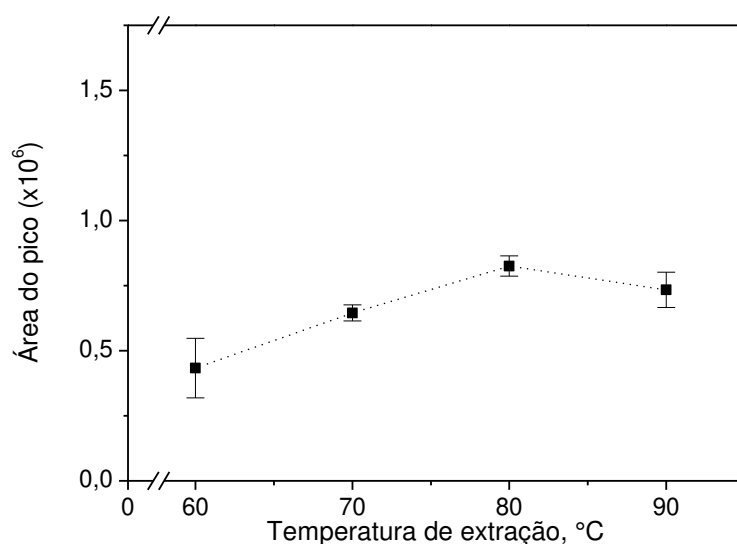


Figura 21. Efeito da temperatura na extração do complexo piazoselenol por SPME-GF (n = 3)

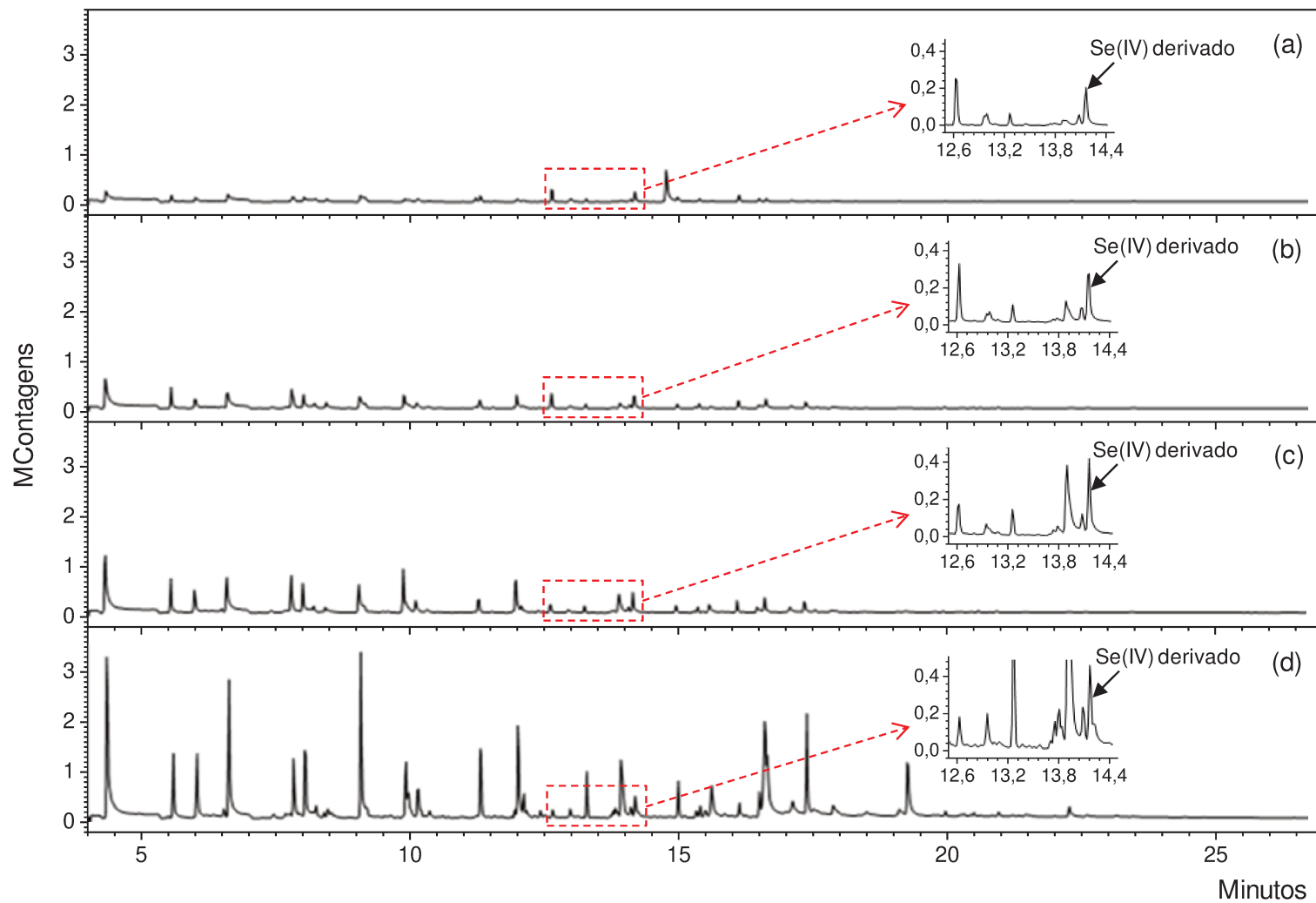


Figura 22. Cromatogramas de GC-MS *ion trap* obtidos após a derivação de uma solução de Se(IV) $75 \mu\text{g L}^{-1}$ com solução de DCFDA 1% (m/v) e extração por SPME-GF em diferentes temperaturas: (a) 60 °C, (b) 70 °C, (c) 80 °C e (d) 90 °C

1.3.7. Determinação de selênio por GC-MS

As determinações de Se(IV) foram realizadas em triplicata com base na área do pico. A Tabela 9 mostra as características analíticas do método proposto. O método apresentou uma boa correlação linear ($r = 0,9991$) entre concentração de Se(IV) e área do pico. O limite de quantificação foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 9. Características analíticas do método para determinação de Se(IV)

Parâmetros	Se(IV)
Desvio padrão do coeficiente linear ($\times 10^3$)	2,052
Inclinação ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$) ($\times 10^3$)	18,093
Coeficiente de correlação	0,9991
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,4
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1

Uma comparação entre o método proposto e alguns métodos publicados para extração e determinação de Se(IV) é apresentado na Tabela 10. O limite de detecção foi melhor que aqueles reportados para outros métodos (Dimitrakakis *et al.*, 2004; Mester *et al.*, 2000; Shahdousti e Alizadeh, 2011; Tyburska *et al.*, 2011; Sarkouhi *et al.*, 2007). Além disso, o método proposto apresentou menor consumo de amostra e rapidez.

O método de SPME-GF com GC-MS foi aplicado para determinação de selênio em materiais de referência certificado, BCR-414 (plâncton) e SRM 1643e (água), e em medicamento. Para a água foi encontrada uma recuperação de 97% e um desvio padrão relativo de 4% (Tabela 11).

Tabela 10. Comparação do método proposto com outros métodos pra determinação de Se(IV)

Extração/Determinação	Volume de amostra (µL)	Tempo de derivação (min)	Tempo de extração (min)	Limite de detecção (µg L ⁻¹)	RSD (%)	Referências
SPME/GC-MS	7000	30	35	0,006	9,0	Guidotti <i>et al.</i> , 1999
SPME/GC-MS	10000	-	20	0,03	5,5	Kapsimali e Zachariadis, 2010
SPME/GC-MIP-AED	10000	-	10	1,8	4,4	Dimitrakakis <i>et al.</i> , 2004
HG-SPME/GC-ICP-MS	20000	-	30	5,3	19,0	Mester <i>et al.</i> , 2000
SPME/IMS	1000	40	30	12	<6	Shahdousti e Alizadeh, 2011
HG-SPME/GC-ICP OES	5000	-	7	0,8	3,4	Tyburska <i>et al.</i> , 2011
SPME/GC-AED	7000	10	30	0,003	8,1	Campillo <i>et al.</i> , 2007
LPME/GC-FID	12500	15	20	0,9	3,2-6,1	Sarkouhi <i>et al.</i> , 2007
SPME-GF/GC-MS	99	1	12	0,4	3,5-8,9	Método Proposto

Do inglês: *Microwave Induced Plasma-Atomic Emission Detector (MIP-AED); Hydride Generation (HG); Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS); Ion Mobility Spectrometry (IMS); Optical Emission Spectrometry (OES); Flame Ionization Detector (FID); liquid-phase microextraction (LPME)*

Tabela 11. Determinação de selênio por GC-MS, sem reduzir e após a redução do selênio a Se(IV)

Amostras	Concentração de Se(IV)	
	Sem redução	Após redução
Água ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	11,7 ($\pm 0,5$) ^d	-
Plâncton ^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,2 ($\pm 0,1$)	1,8 ($\pm 0,1$)
Medicamento ^c ($\mu\text{g/cápsula}$)	21 (± 2)	21 (± 2)

^a Valor certificado: $11,97 \pm 0,14 \mu\text{g L}^{-1}$

^b Valor certificado: $1,75 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$

^c Medicamento manipulado adquirido em farmácia local a base de quelato de selênio (25 $\mu\text{g/cápsula}$)

^d Valor médio (\pm desvio padrão) (n = 3)

As determinações de Se(IV) nas amostras de plâncton e medicamento foram realizadas com e sem a redução do selênio total a Se(IV) (Tabela 11). Em amostras biológicas sabe-se que o selênio pode estar presente em diferentes formas orgânica e inorgânicas. Ao analisar as amostras de plâncton antes da etapa de redução, 68% do selênio total foi encontrado como Se(IV). Entretanto, após redução de todo selênio a Se(IV), o teor encontrado no material BCR-414 foi concordante com o valor certificado, com uma recuperação de 101% e um desvio padrão relativo de 3,5% (Tabela 11).

O mesmo procedimento foi aplicado na amostra de medicamento, e não houve diferença significativa entre os valores antes ou após a redução de selênio, em nível de confiança de 95% (teste *t*), indicando que todo selênio presente no medicamento estaria na forma de Se(IV). Considerando o valor indicado no rótulo do medicamento (25 $\mu\text{g/cápsula}$), foi encontrada uma recuperação de 84% do valor total (Tabela 11) e um desvio padrão relativo de 8,9% (n = 3).

1.4. Conclusões

Pela primeira vez a abordagem SPME-GF foi aplicada com sucesso em análise quantitativa, sendo que a realização da etapa de derivação no forno de grafite permitiu a automação do procedimento, tornando esta etapa mais rápida e menos poluente que o método de derivação em frasco de vidro para SPME. Aproximadamente, 7 mL de solução por análise é tipicamente usada no método de derivação em frasco (fora do forno), comparado aos 99 μ L de solução usando o método proposto.

Por esta nova abordagem, a homogeneidade para a derivação e extração no GF requer que a gota se mantenha formada dentro do tubo de grafite durante a injeção das soluções. Assim, proporções menores do que 96:3 entre solução de Se(IV) e derivante, respectivamente, são inviáveis para extração por SPME-GF, pois não permitem a formação da gota no GF.

A substituição da solução de HCl 10% (v/v), comumente usada na reação de derivação do Se(IV) com DCFDA, por solução de HNO₃ 1% (v/v) diminuiu os danos ao revestimento da fibra de SPME e melhorou a extração.

Sob condições otimizadas, o método proposto mostrou uma boa resposta linear ($r = 0,9991$), exatidão e limite de detecção adequado para a determinação de selênio em água, plâncton e medicamento.

CAPÍTULO 2

Especiação de selênio por HPLC-ICP-MS

2.1. Objetivo

Realizar uma análise de especiação de selênio em amostras biológicas (plâncton, castanha-do-pará, urina, folhas de girassol).

Objetivos específicos:

- Avaliar a separação e identificação de padrões de espécies de selênio por HPLC-ICP-MS;
- Realizar uma extração aquosa de espécies de selênio em plâncton, castanha-do-pará e folhas de girassol;
- Realizar teste de bioacessibilidade em amostras de castanha-do-pará;
- Identificar as espécies de selênio com base no tempo de retenção de padrões;
- Determinar o teor de Se(IV), Se(VI), selenocistina (SeCis2) e selenometionina (SeMet) nos extratos das amostras;
- Identificar e quantificar espécies de selênio em amostras de urina de pessoas, antes e após 15 dias de consumo de castanha-do-pará;
- Determinar o teor de selênio total nas amostras de castanha-do-pará e nos resíduos de extração por ICP-MS;
- Identificar espécies de selênio nas folhas de girassol por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS).

2.2. Parte Experimental

2.2.1. Equipamentos e acessórios

- Centrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5804 R);
- Centrífuga (BioAgency, Bio-Spin-R);
- Coletor de frações (Gilson, FC 203B);
- Banho-maria (Branson, 2510);
- Banho de areia (Quimis);
- Espectrômetro de massas Xevo Q/TOF (quadrupolo/tempo de voo) com fonte de nano spray (Waters, Micromass, Manchester, Reino Unido);
- Filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (25 mm de diâmetro; 0,45 µm de poro; Millex);
- HPLC (Series 200, PerkinElmer) equipado com coluna de troca aniônica (PRP X100, Hamilton Co.) bomba binária, degaseificador, auto-amostrador e acoplado com um ICP-MS quadrupolo;
- ICP-MS quadrupolo (modelo ELAN[®] DRC-e, PerkinElmer) com cela dinâmica de reação (DRC) para redução das interferências isobáricas;
- Liofilizador (Freezone 4.5, Labconco);
- Ultrassom (ULTRASONIK, NEY);
- Agitador de tubos (Phoenix, AP 56)

2.2.2. Gases, reagentes e soluções

- Argônio líquido com pureza de 99,999%;
- Gás oxigênio com pureza de 99,99%;
- Solução estoque de selenato de sódio (Sigma) 1000 mg L⁻¹ de selênio, preparada pela diluição do sal em HNO₃ (65%, Merck) 0,2% (v/v);
- Solução estoque de selenito de sódio (99%, Aldrich) 1000 mg L⁻¹ de selênio, preparada pela diluição do sal em HNO₃ 0,2% (v/v);
- Solução estoque de seleno-DL-cistina (Sigma) 97 mg L⁻¹ de selênio, preparada por diluição em HCl (37,5%, Merck) 0,1 mol L⁻¹;
- Solução estoque de seleno-L-metionina (98%, Sigma) 122 mg L⁻¹ de selênio, preparada por diluição água;
- Solução gástrica, preparada pela diluição de 250 mg de pepsina (Sigma) em 25 mL de NaCl (99%, Synth) 150 mmol L⁻¹;
- Solução intestinal: foi preparado um volume de 50 mL de solução, contendo 3% (m/v) de pancreatina (Sigma), 1% (m/v) de amilase (Sigma) e 1,5 g L⁻¹ de sais biliares (Fluka);
- Tampão acetato de amônio (98,9%, J. T. Backer) 25 mmol L⁻¹ e 250 mmol L⁻¹ em pH 5,17, ajustado usando ácido acético concentrado (100%, J. T. Backer).

2.2.3. Amostras

- Material de referência certificado BCR-414 (plâncton);

- Castanhas-do-pará (*Bertholletia excelsa*) adquiridas em comércio local;

As amostras foram descascadas, congeladas em nitrogênio líquido para trituração em almofariz e armazenadas em frasco plástico.

- Folhas de girassol (*Helianthus annuus*) de plantas controle e de plantas cultivadas em estufa conforme descrito por Silva *et al.* (2011) (plantas irrigadas com solução de selenito de sódio).

Estas amostras foram adquiridas no laboratório do grupo de espectrometria, preparo de amostra e mecanização (GEPAM), no Instituto de Química da UNICAMP, e foram empregadas em uma Tese de doutorado.

- Amostras de urina

As amostras de urina analisadas foram cedidas por 9 participantes voluntários (4 mulheres e 5 homens), com faixa etária entre 20 e 32 anos, antes e após consumo de castanha-do-pará. Para realizar este estudo, um projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (número do certificado: 00894712800005404).

Cada participante realizou uma coleta no dia zero, antes de iniciar a ingestão de castanha-do-pará, e outra após 15 dias consumindo 1 castanha-do-pará por dia. Durante esse período os voluntários foram instruídos a não ingerir qualquer suplemento de selênio (medicamentos ou alimentos enriquecidos com espécies de selênio).

A coleta de aproximadamente 30 mL de urina foi realizada pelos próprios doadores, no período da manhã (primeira urina do dia) utilizando recipientes adequados (pote de boca larga, com tampa de rosca e descartável). As amostras foram analisadas com intervalo de, no máximo, 10 h da coleta.

2.2.4. Determinação das espécies de selênio por HPLC-ICP-MS

Inicialmente, soluções individuais das espécies de selênio (Se(IV), Se(VI), selenocistina e selenometionina) foram cromatografadas para identificação do tempo de retenção. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna de troca aniônica, como descrito por Mounicou *et al.* (2009). A Tabela 12 apresenta as condições instrumentais aplicadas para separação e detecção das espécies de selênio por HPLC-ICP-MS usando uma cela dinâmica de reação (DRC) com gás oxigênio para reduzir interferências isobáricas.

O método aplicado para eliminar a interferência do argônio ($^{80}\text{Ar}_2^+$) quando o íon $^{80}\text{Se}^+$ é monitorado para determinação de selênio por ICP-MS, consiste em formar o íon $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ a partir da reação do $^{80}\text{Se}^+$ com o oxigênio e medir a razão m/z 96 (Silva e Arruda, 2012).

Soluções das espécies de selênio foram preparadas com concentrações que variaram entre 2-60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Se(IV), 1,5-7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Se(VI), 1-12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para selenocistina e 2-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para selenometionina para obtenção de curvas analíticas. As medidas de área dos picos foram obtidas usando o Software Microcal Origin®.

Tabela 12. Parâmetros instrumentais aplicados

Condições Cromatográficas	
Coluna	PRP X100 (Hamilton Co.)
Dimensões da coluna	4,6x250 mm, 7 µm de tamanho de partícula
Fase móvel	A tampão acetato de amônio 25 mmol L ⁻¹ , pH 5,17 B tampão acetato de amônio 250 mmol L ⁻¹ , pH 5,17
Eluição	Gradiente, de 0 a 100% da fase móvel B
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	100 µL
Condições de operação do ICP-MS	
RF Power	1200 W
<i>RPq</i>	0,5
Vazão do gás nebulizador	0,92 L min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Isótopo monitorado	⁹⁶ SeO ⁺
DRC	gás da cela (O ₂) 0,4 L min ⁻¹

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros das curvas (International Conference on Harmonization, 2005; Ribani *et al.*, 2004), como descrito no Capítulo 1.

2.2.5. Extração das espécies de selênio

2.2.5.1. Extração com água

Para a extração das espécies de selênio com água (Mounicou *et al.*, 2009), 200 mg (para plâncton e castanha-do-pará) ou 50 mg (para folhas de girassol) de amostra foram pesadas em frasco de polipropileno de 15 mL. Em seguida, 10 mL de água foram adicionados em cada frasco e a suspensão foi homogeneizada usando um agitador de tubos. A mistura foi sonicada por 2h, e o sobrenadante coletado, após centrifugação, por 20 min a 2500 rpm. Este procedimento foi repetido três vezes, e os 3 sobrenadantes de cada reextração foram reunidos. Entre os intervalos das extrações, os sobrenadantes foram conservados em freezer (-20 °C). Após extração, os extratos de cada amostra foram congelados em nitrogênio líquido e, imediatamente, liofilizados.

A amostra de plâncton foi resuspensa com 2 mL de água e filtrada, utilizando uma seringa de 5 mL e membrana de PVDF (0,45 µm de poro). A solução obtida foi, então, analisada por HPLC-ICP-MS para identificação das espécies usando os parâmetros instrumentais descritos na Tabela 12.

O liofilizado de castanha-do-pará foi resuspenso com 2 mL de água e 200 µL da solução foram diluídos para 600 µL com água. A solução foi filtrada, utilizando uma seringa de 5 mL e membrana de PVDF (0,45 µm de poro), e cromatografada para identificação das espécies por HPLC-ICP-MS, aplicando os parâmetros instrumentais descritos na Tabela 12.

Para as amostras de folhas de girassol, o liofilizado da planta controle foi resuspensa com 1 mL de água, filtrado, usando seringa e filtro de PVDF, e

cromatografado. O material da planta enriquecida foi resuspensa com 2 mL de água, filtrado, diluído 5 vezes com água e analisado por HPLC-ICP-MS para identificação das espécies.

2.2.5.2. Teste de bioacessibilidade

Para a amostra de castanha-do-pará foi simulada uma digestão gastrointestinal, em duas etapas (Kápolna e Fodor, 2007; Mataveli *et al.*, 2010; Mounicou *et al.*, 2002): inicialmente, 300 mg de amostra triturada foram pesadas em frasco de polipropileno de 50 mL, e, em seguida, foram adicionados 5 mL de solução de gástrica. O pH foi ajustado para 2,5 com HCl concentrado e a solução foi incubada por 4 h a 37 °C em banho-maria. Após esse período, o pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH concentrado, 10 mL de solução intestinal foram acrescentados, e a solução foi novamente incubada por 4 h a 37 °C em banho-maria. A fase extratora foi centrifugada por 20 min a 2500 rpm e o sobrenadante foi diluído 10 vezes com água, filtrado, usando uma seringa de 5 mL e membrana com 0,45 µm de poro, e cromatografado.

2.2.6. Coleta das Frações

Frações do eluato de folhas de girassol (planta enriquecida), correspondentes aos picos contendo selênio previamente identificado por ICP-MS, foram coletas para posterior detecção de espécies de selênio por ESI-MS. O extrato aquoso de folhas de girassol foi filtrado e diluído 2 vezes com água. Um volume de 100 µL desta solução foi injetado no HPLC, eluído usando as

condições instrumentais descritas na Tabela 12, e os efluentes foram coletados usando um coletor de frações, a uma taxa de 1 mL min^{-1} . Esse procedimento de coleta foi realizado mais 2 vezes e as respectivas frações foram reunidas, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

2.2.7. Análise da urina

Uma alíquota de 1 mL de urina foi centrifugada por 5 min a 10000 rpm, o sobrenadante foi diluído 2 vezes com tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} e a solução foi filtrada usando seringa de 5 mL e filtros com $0,45 \mu\text{m}$ de poro. Em seguida, foi realizada a separação e detecção por HPLC-ICP-MS. A identificação foi baseada no tempo de retenção de padrões das espécies, e a quantificação foi realizada usando o método de calibração externa por HPLC-ICP-MS aplicando os parâmetros instrumentais descritos na Tabela 12.

2.2.8. Determinação de selênio total por ICP-MS

Para fins de balanço de massa, os resíduos de extração do plâncton (procedimento **2.2.5.1**) e da simulação gastrointestinal (procedimento **2.2.5.2**) foram digeridos utilizando uma mistura de HNO_3 e H_2O_2 na proporção 2:1, usando 2 e 3 mL da mistura, respectivamente, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h em banho de areia. Após decomposição, os resíduos de plâncton e castanha foram filtrados com papel de filtro e diluídos para um volume de 25 e 100 mL, respectivamente, com água e a solução foi usada para determinação do teor de selênio por ICP-MS.

O teor de selênio total nas amostras de castanha-do-pará também foi determinado por ICP-MS. Aproximadamente, 200 mg de amostra foram decompostas em forno micro-ondas (Tabela 13) , usando uma mistura de 3 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂. Após decomposição, o excesso de ácido foi removido usando um banho de areia (aproximadamente 90 °C). A amostra foi filtrada em papel de filtro e diluído para um volume de 50 mL com água e a solução foi, então, diluída 5 vezes com HNO₃ 1% (v/v) para determinação do teor de selênio por ICP-MS.

Tabela 13. Programação do forno micro-ondas para decompor a amostra de castanha-do-pará

Etapas	Programa de decomposição	
	Tempo (min)	Potência (W)
1	2	300
2	2	0
3	5	330
4	5	460
5	4	590

Os parâmetros analíticos para determinação de Se total por ICP-MS estão apresentados na Tabela 14. As soluções foram analisadas utilizando as mesmas condições operacionais do ICP-MS apresentadas na Tabela 12. Os limites de detecção e quantificação foram obtidos de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002).

Tabela 14. Características analíticas para determinação de selênio por ICP-MS

Parâmetros	
Faixa de concentração da curva ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 – 60
Inclinação ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	53,5188
As	0,6164
r^b	0,9999
LD^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,03
LQ^d ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,1

^a Desvio padrão de 10 medidas de branco; ^b Coeficiente de correlação; ^c Limite de detecção; ^d Limite de quantificação

2.2.9. Identificação de espécies de selênio por ESI-MS

Para identificação de espécies de selênio em folhas de girassol, o extrato foi filtrado e diluído 10 vezes com acetonitrila:água (1:1) e ácido fórmico 0,1% (v/v), e injetado (infusão direta) no *electrospray* usando uma seringa ($25 \mu\text{L min}^{-1}$) com o auxílio de uma bomba peristáltica automática (Havard Apparatus, 11 plus). Os compostos que apresentaram o padrão isotópico do selênio (^{74}Se , ^{75}Se , ^{76}Se , ^{80}Se e ^{82}Se) foram monitorados e selecionados para fragmentação por ESI-MS/MS.

Os dados foram adquiridos no modo íon positivo, usando as seguintes condições: temperatura do bloco 100°C , voltagem do capilar 3,0 kV e voltagem do cone de 20-60 V. Os experimentos de ESI-MS/MS dos íons selecionados foi realizado por dissociação induzida por colisão (CID) com gás argônio e energia de colisão entre 20-60 eV. Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de m/z 200-600 e os dados obtidos foram tratados com o software MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido).

Duas frações da cromatografia por troca aniônica das folhas de girassol (planta enriquecida), também foram analisadas por ESI-MS. As frações liofilizadas foram solubilizadas com 200 μ L de acetonitrila, diluída 10 vezes com acetonitrila:água (1:1) contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) e injetados (infusão direta) no *electrospray*.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Separação das espécies de selênio por HPLC-ICP-MS

A cromatografia por troca aniônica é particularmente recomendada para a identificação de espécies inorgânicas de selênio (selenato e selenito). Em cromatografia de fase reversa estes compostos eluem perto do volume morto e sofrem diminuição da retenção devido a interferentes da matriz ou co-eluição com espécies não retidas (Mounicou *et al.*, 2009). Neste trabalho, quatro espécies, que estão entre as principais espécies avaliadas em amostras ambientais e biológicas, foram usadas para estudo de especiação de selênio por HPLC com troca aniônica acoplada a ICP-MS. Inicialmente, foram realizadas injeções individuais de solução das espécies para identificar o tempo de retenção. A Figura 23 apresenta o cromatograma de separação da mistura de padrões de selênio com os tempos de retenção correspondentes.

As determinações destas espécies de selênio foram realizadas com base na área dos picos. A Tabela 15 mostra as características analíticas para a determinação por HPLC-ICP-MS. O método apresentou uma boa correlação linear para as quatro espécies e limites de detecção na faixa de microgramas por litro para SeCis2, SeMet, Se(IV) e Se(VI).

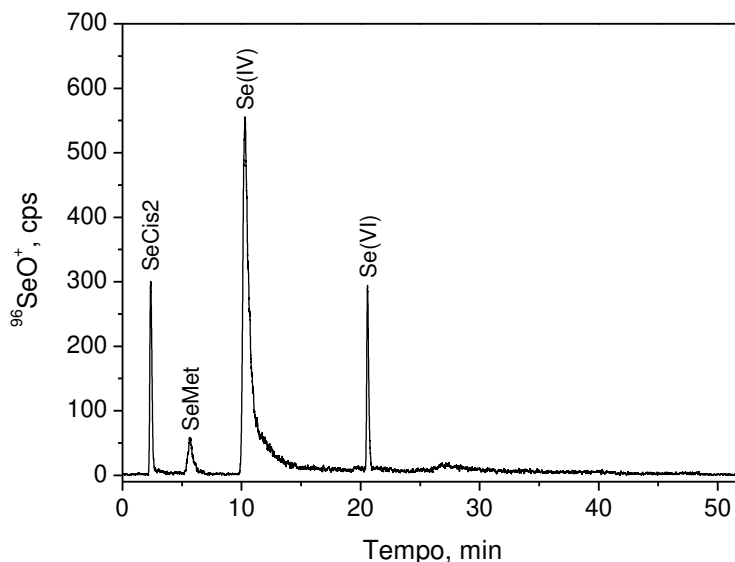


Figura 23. Análise de uma mistura de espécies de selênio por HPLC-ICP-MS usando troca aniônica. SeCis2: DL-Selenocistina; SeMet: L-Selenometionina; Se(IV): selenito e Se(VI): selenato. (Programa de eluição: 7 min a 0% de B; 3,75 min a 25% de B; 3,75 min a 50% B; 22,5 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos

Tabela 15. Características analíticas para determinação de SeCis2, SeMet, Se(IV) e Se(VI) por HPLC-ICP-MS

Parâmetros	SeCis2	SeMet	Se(IV)	Se(VI)
SD ^a do coeficiente linear	2,3974	0,7224	0,4053	1,1218
Inclinação (L µg ⁻¹)	23,3197	5,8346	8,7542	13,0544
r ^b	0,9995	0,9995	0,9999	0,9996
LD ^c (µg L ⁻¹)	0,3	0,4	0,2	0,3
LQ ^d (µg L ⁻¹)	1	1	0,5	0,9

^a Desvio padrão; ^b Coeficiente de correlação; ^c Limite de detecção; ^d Limite de quantificação

2.3.2. Espécies de selênio em plâncton

O plâncton é uma fonte alimentar para muitos peixes, podendo atuar no transporte de elementos traços e ser considerado como uma fonte de selênio (Kehrig *et al.*, 2009; Muscatello e Janz, 2009; Muscatello *et al.*, 2008). O cromatograma obtido para as espécies de selênio extraídas nesta amostra é mostrado na Figura 24. Tanto as espécies orgânicas (Selenocistina e Selenometionina) como as inorgânicas (Se(IV) e Se(VI)), identificadas com base no tempo de retenção, foram encontradas no extrato aquoso, e, pelo menos, mais duas espécies foram observadas, uma no tempo de retenção de 2,98 min e a outra em 15,14 min.

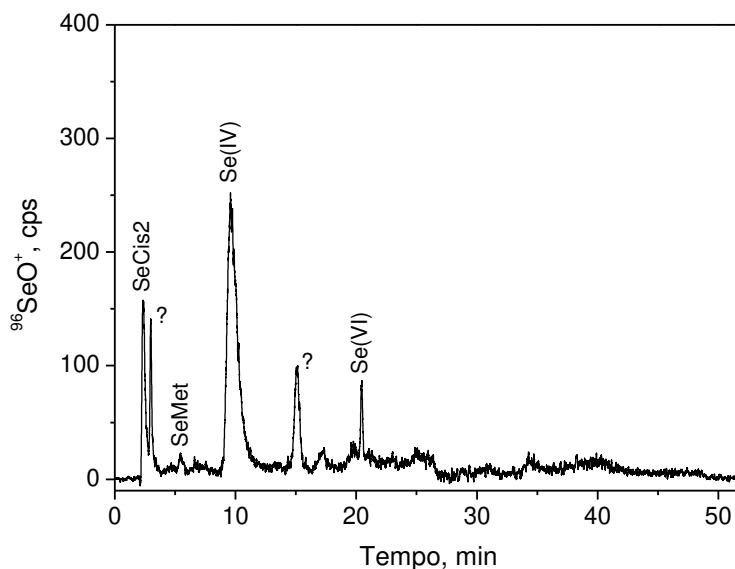


Figura 24. Análise da fração aquosa do plâncton por HPLC-ICP-MS. Os pontos de interrogação indicam as espécies desconhecidas. (Programa de eluição: 7 min a 0% de B; 3,75 min a 25% de B; 3,75 min a 50% B; 22,5 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos

O Se(IV) foi a principal espécie extraída do plâncton, com a maior concentração de selênio no extrato. Apesar de se observar duas espécies não identificadas no cromatograma (Figura 24) e uma espécie com concentração abaixo do limite de quantificação, pelo balanço de massa foi encontrada uma recuperação de 91% (Tabela 16) em relação ao valor certificado no material de referência.

Tabela 16. Concentração das espécies de selênio extraídas com água de material certificado de plâncton (valor certificado: $1,75 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$)

	$\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD (n=3)}$
SeCis2	0,03 ($\pm 0,01$)
SeMet	< LQ
Se(IV)	0,3 ($\pm 0,1$)
Se(VI)	0,02 ($\pm 0,01$)
Resíduo da extração	1,2 ($\pm 0,07$)
Balanço de massa	1,6 ($\pm 0,1$)

2.3.3. Espécies de selênio em castanha-do-pará

As diferentes formas, orgânicas e inorgânicas, em que o selênio pode ser encontrado em alimentos, não exercem o mesmo efeito no organismo. Quando ingeridas, algumas espécies são efetivamente usadas pelo organismo sendo transformadas em uma forma bioquimicamente ativa, e outras são eliminadas (Thiry *et al.*, 2012).

A castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*, da família *Lecythidaceae*) é um dos poucos alimentos que possuem altos níveis de selênio de ocorrência

natural (são relatados teores de até $600 \mu\text{g g}^{-1}$ dependendo dos níveis deste elemento no solo) (Chang *et al.*, 1995). Assim, a ingestão diária de uma única castanha pode ser suficiente para suprir as necessidades de selênio para um indivíduo adulto ($55 \mu\text{g}/\text{dia}$) (Food and Nutrition Board Institute of Medicine, 2000). A concentração total de selênio encontrada nas amostras de castanhas, analisadas neste trabalho foi de $54,8 (\pm 4,6) \mu\text{g g}^{-1}$. Porém, o teor total não é suficiente para definir o valor nutricional e os efeitos no organismo.

Apesar de estudos com ratos demonstrarem o uso desse alimento para a prevenção de câncer, ainda não está esclarecido quais espécies presentes nesse tipo de castanha são responsáveis pelos efeitos preventivos (Infante *et al.*, 2005). Pesquisas são, então, desenvolvidas na tentativa de contribuir para a elucidação desta questão (Chunhieng *et al.*, 2004; Dumont *et al.*, 2006a; Thomson *et al.*, 2008).

Neste trabalho, após extração com água, foi observado que a castanha-do-pará possui, principalmente, os compostos orgânicos, selenocistina e selenometionina, que são espécies mais biodisponíveis e menos tóxicas que as inorgânicas (Figura 25a). Nenhum pico das espécies de Se(IV) e Se(VI) foi encontrado no extrato aquoso da castanha.

Como os compostos orgânicos podem ter interações diferenciadas no organismo, um teste de bioacessibilidade foi avaliado. A bioacessibilidade de um elemento é definida como sendo a quantidade solúvel no meio gastrointestinal que se torna disponível para absorção por meio da mucosa intestinal (Ruby *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 2002). Esta fração solúvel pode ser estimada por simulação de uma digestão gastrointestinal, normalmente conduzida com uma etapa de digestão gástrica com pepsina em pH 2, seguida de uma etapa de digestão intestinal com amilase, pancreatina e sais biliares em

pH neutro, onde o extrato resultante é considerado a fração bioacessível (Kápolna e Fodor, 2007; Mounicou *et al.*, 2002; Thiry *et al.*, 2012).

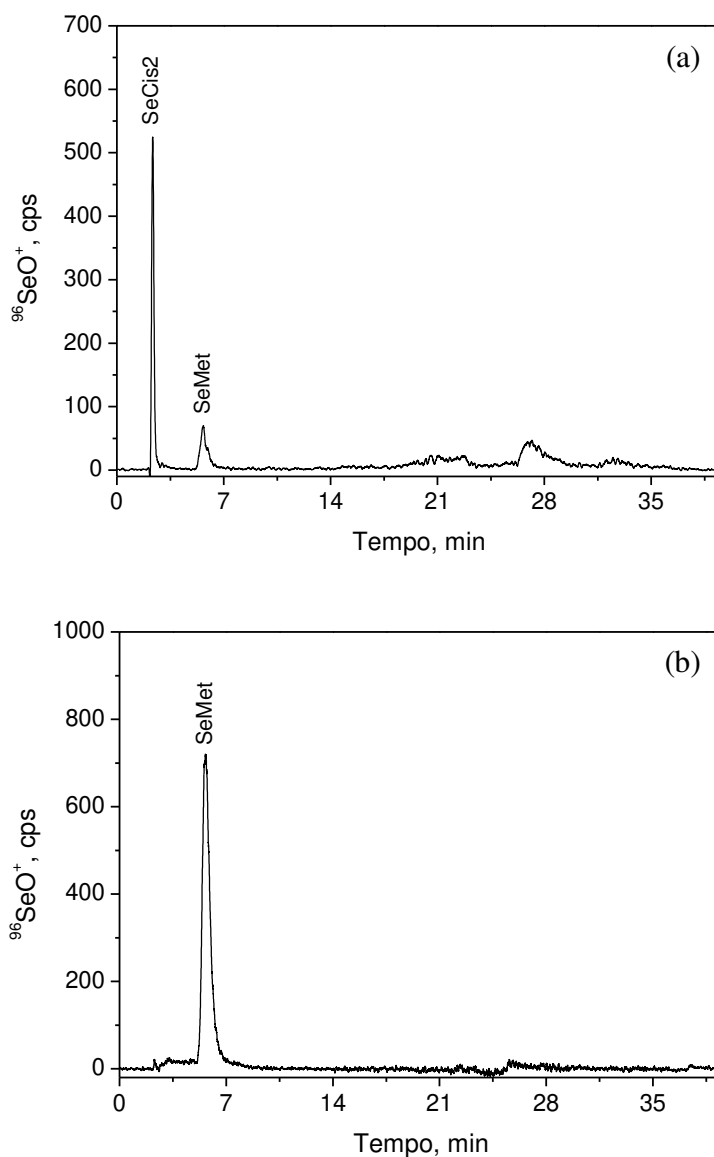


Figura 25. Análise da fração aquosa (a) e da fração bioacessível (b) da castanha-do-pará por HPLC-ICP-MS. (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos

Dentre as duas espécies orgânicas encontradas na castanha (SeCis2 e SeMet), somente a espécie selenometionina foi identificada como bioacessível na amostra, após simulação de digestão gastrointestinal (Figura 25b). Pelo teste, aproximadamente, 74% de todo o selênio presente na castanha-do-pará foi bioacessível. O balanço de massa do teste de bioacessibilidade também foi verificado, e foi encontrada uma recuperação de 86% (Tabela 17).

Tabela 17. Concentração de selênio em testes de digestão gastrointestinal com a castanha-do-pará

	$\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD (n=3)}$
SeMet (bioacessível)	40,4 ($\pm 1,4$)
Resíduo	7,0 ($\pm 0,4$)
Balanço de massa	47,4 ($\pm 1,5$)

Após procedimento com extração enzimática, Wrobel *et al.* (2003a) também verificou que 75% do selênio na castanha era encontrado como selenometionina, concordando com o valor obtido neste trabalho (74%). Os resultados encontrados são também concordantes com outros apresentados na literatura que apontam a selenometionina como a espécie mais abundante na castanha-do-pará (Dumont *et al.*, 2006a; Kannamkumarath *et al.*, 2002; Kannamkumarath *et al.*, 2005; Vonderheide *et al.*, 2002), onde essa porcentagem pode chegar até 96%, como encontrado por Bodó *et al.* (2003).

2.3.4. Espécies de selênio na urina

A partir da selenometionina, selenato e selenito o selênio poder ser utilizado para a síntese de selenoproteínas ou perdido por meio da urina, pele e/ou respiração devido a mecanismos de metilação (Dumont *et al.*, 2006b; Fairweather-Tait *et al.*, 2010; Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Rayman *et al.*, 2008). A urina é a principal forma de eliminação de espécies de selênio, sendo este, geralmente, excretado como selenoaçúcar (Se-metil-N-acetilgalactosamina). A excreção pela pele ou por via respiratória ocorre somente em níveis tóxicos, com um odor característico ao de alho devido à exalação de compostos voláteis (dimetilseleneto e dimetildisseleneto) (Dumont *et al.*, 2006b; Stahl *et al.*, 2002; Thiry *et al.*, 2012). Na urina, quando altas doses de selênio são administradas, o íon trimetilselênio também é identificado (Kuehnelt *et al.*, 2007; Kuehnelt *et al.*, 2006a; Lu *et al.*, 2012; Marchante-Gayón *et al.*, 2001). Entretanto, a excreção de selênio depende de fatores, como: quantidade ingerida, tipo de dieta e forma em que o selênio é consumido (Dumont *et al.*, 2006b; Stahl *et al.*, 2002).

Neste trabalho, todas as amostras de urina analisadas no dia zero, antes de iniciar o período de ingestão diária de castanha-do-pará, sugerem a presença de selenocistina, identificada com base no tempo de retenção do padrão (Figura 26). Outros trabalhos também reportam a presença desta espécie em urina (Duan e Hu, 2009b; Gómez *et al.*, 1998; Marchante-Gayón *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2007). A selenocistina foi relatada pela primeira vez como um metabólito de selênio em urina humana por Olivas *et al.* (1996), em análises por HPLC com fase-reversa acoplada a ICP-MS.

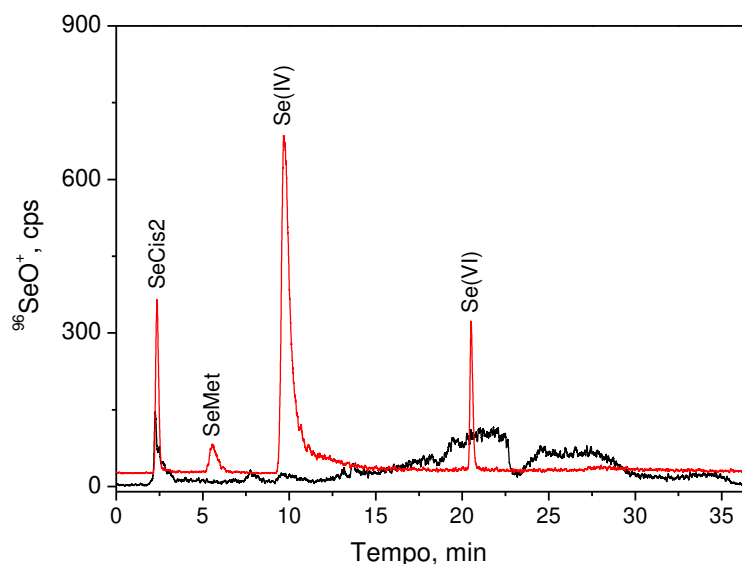


Figura 26. Cromatogramas de espécies de selênio por HPLC-ICP-MS com troca aniônica. Mistura de padrões (—) e amostra de urina antes da ingestão de castanha-do-pará (—). (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 6 min a 50% de B e 6 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos

Após o período de ingestão de castanha-do-pará, considerada excelente fonte natural de selênio, nenhuma amostra de urina apresentou a selenometionina, principal espécie encontrada neste tipo de alimento. No cromatograma, além da SeCis2 também foi observada a presença de uma espécie não identificada (Figura 27).

Em termos de concentração de SeCis2, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras de urina do grupo masculino e feminino, antes de iniciar o consumo de castanha-do-pará (Tabela 18). O teor médio encontrado foi de $1,9 (\pm 0,3)$ e $1,8 (\pm 0,5) \mu\text{g L}^{-1}$ para mulheres e homens, respectivamente.

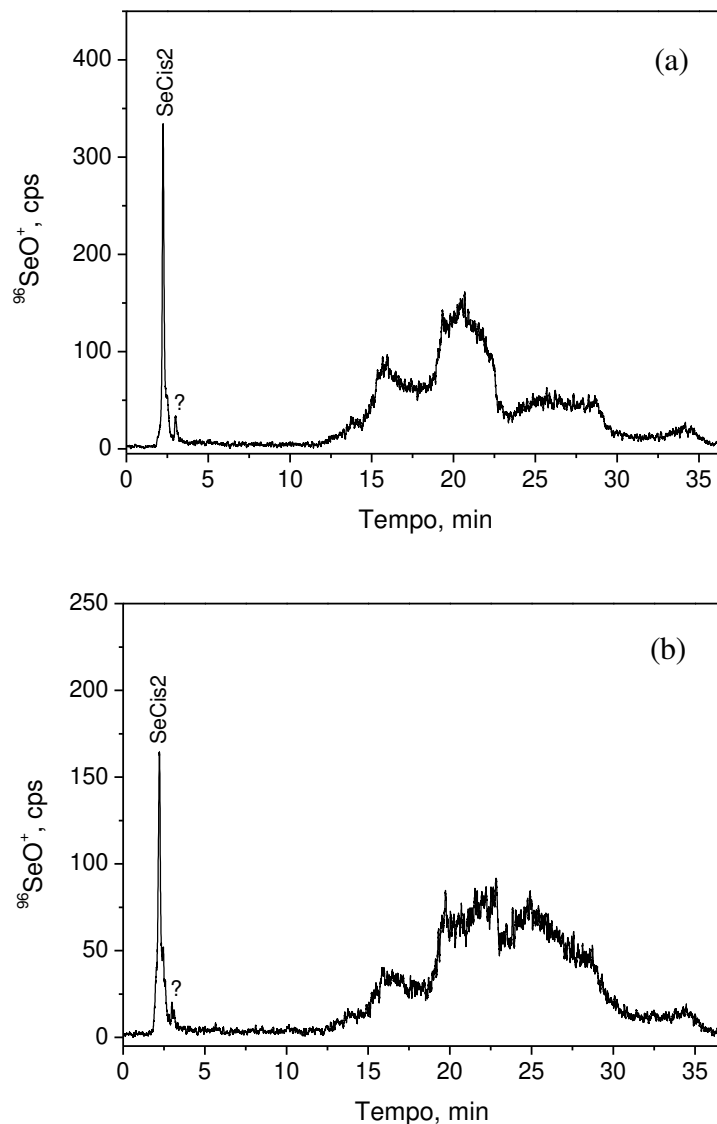


Figura 27. Cromatogramas das espécies de selênio em amostras de urina humana por HPLC-ICP-MS com troca aniônica após consumo de castanha-do-pará. Amostra de urina feminina (a) e masculina (b). O ponto de interrogação indica a espécie não identificada (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 6 min a 50% de B e 6 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos

Porém, houve um aumento no teor de SeCis2 em todas as amostras de urina feminina, após 15 dias de consumo de castanha-do-pará, com um valor médio de 2,9 (\pm 0,6) $\mu\text{g L}^{-1}$ para este grupo (Tabela 18). Contudo, não foram observadas variações significativas no teor médio de SeCis2 entre as amostras de urina masculina no dia zero e após 15 dias. O teor médio encontrado para este grupo, pós consumo de castanha, foi de 1,7 (\pm 0,5) $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes resultados, sugerem que a dose administrada (1 castanha por dia) pode não ter ultrapassado a necessidade diária para os homens. Nas mulheres, maior quantidade de selênio foi excretada na urina como SeCis2, espécie não identificada como bioacessível após simulação gastrointestinal em análise de especiação com castanha-do-pará (Capítulo 2, item 2.3.3).

Tabela 18. Concentração de selenocistina em urina humana, antes e após consumo de castanha-do-pará (1 castanha por dia)

Amostras	$\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SD (n=3)}$	
	Dia zero	Após 15 dias
F ^a 1	1,8 (\pm 0,03)	3,6 (\pm 0,1)
F2	1,4 (\pm 0,2)	2,9 (\pm 0,2)
F3	1,9 (\pm 0,1)	2,4 (\pm 0,8)
F4	2,3 (\pm 0,1)	2,8 (\pm 0,1)
M ^b 1	< LQ	< LQ
M2	1,4 (\pm 0,2)	1,4 (\pm 0,3)
M3	1,9 (\pm 0,05)	1,1 (\pm 0,03)
M4	1,5 (\pm 0,2)	2,1 (\pm 0,1)
M5	2,5 (\pm 0,1)	2,1 (\pm 0,1)

^a Feminina; ^b Masculina

As necessidades nutricionais de um elemento são influenciadas tanto pela diferença de sexo, como também pela idade, porte físico (medidas corporais) e atividades físicas (Food and Nutrition Board Institute of Medicine, 2000; Padovani *et al.*, 2006), o que pode justificar as diferenças de recomendação para a ingestão de nutrientes entre órgãos reguladores. No Reino Unido, doses superiores de selênio são recomendadas, sendo que para os homens (75 $\mu\text{g}/\text{dia}$) é maior do que para as mulheres (60 $\mu\text{g}/\text{dia}$) (Papp *et al.*, 2007). Assim, para inferir melhor sobre o assunto, deve ser realizado um estudo com um número maior de voluntário considerando não apenas o sexo, mas também características físicas e hábitos (como a prática de atividade esportiva).

2.3.5. Espécies de selênio em folhas de girassol

2.3.5.1. Análise por HPLC-ICP-MS

O acoplamento HPLC-ICP-MS também foi usado para analisar amostras de folha de girassol a fim de avaliar as diferenças cromatográficas, em termos de espécies de selênio, entre a planta irrigada periodicamente com solução de selenito de sódio e a planta controle (sem tratamento com selênio) (Figura 28a e b). As folhas de girassol das plantas cultivadas com solução de selenito apresentaram um maior número de espécies de selênio no cromatograma e maiores áreas de pico para as espécies observadas em ambas as amostras (Figura 28b). Em comparação a planta controle, pelo menos 5 outros picos foram verificados.

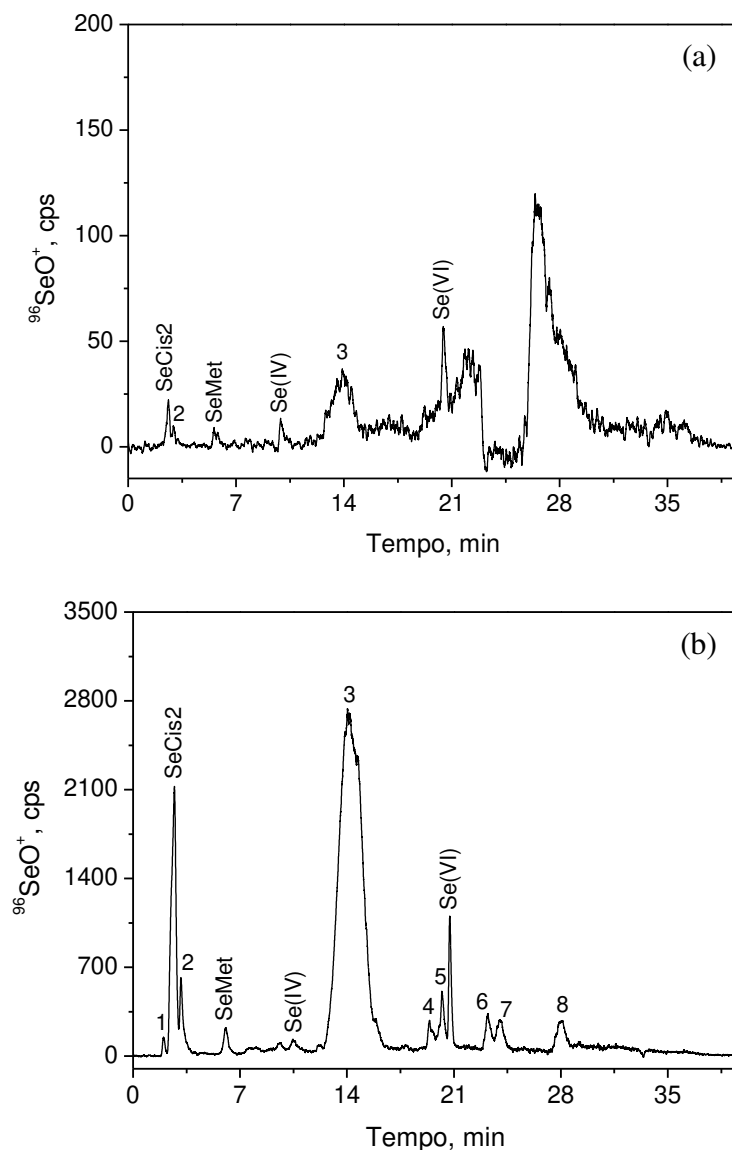


Figura 28. Análise da fração aquosa das amostras de folhas de girassol por HPLC-ICP-MS. (a) planta controle e (b) planta irrigada com solução de selenito. Os números de 1-8 correspondem as espécies não identificadas (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B) Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2° ordem e janela de 50 pontos

A detecção elemental por ICP-MS é uma ferramenta bastante sensível e, portanto, muitos compostos podem ser detectados. Porém, toda informação estrutural (molecular) das espécies é destruída durante a ionização no plasma e

a identificação de compostos somente é possível por comparação do tempo de retenção com padrões (Gammelgaard *et al.*, 2011). Deste modo, apenas quatro espécies (SeCis2, SeMet, SeIV e SeIV), cujos os padrões estavam disponíveis, puderam ser identificadas por HPLC-ICP-MS nas folhas de girassol (Figura 28b).

Foi interessante notar que, apesar do cultivo das plantas ter sido realizado com selenito, a intensidade de Se(IV) foi muito baixa, indicando que a planta biotransforma esta espécie após absorção. No mecanismo de metabolização de selênio proposto para plantas (Dumont *et al.*, 2006b; Whanger, 2004), o selenito é absorvido do solo e reduzido a seleneto, por uma rota envolvendo a glutathione reduzida (GSH), e o seleneto reage com a *o*-acetilserina formando a selenocisteína (SeCis) de maneira semelhante ao metabolismo do enxofre (Figura 2). Por sua vez, a SeCis pode ser também metabolizada a selenometionina (SeMet) da mesma maneira que os análogos de enxofre. Então, o selênio é incorporado as proteínas vegetais, principalmente como SeCis ou SeMet.

2.3.5.2. Análise por ESI-MS

Como poucos padrões de espécies de selênio são comercialmente disponíveis, a caracterização de composto por espectrometria de massas molecular pode ser necessária em estudo de especiação (Dressler *et al.*, 2011; Gammelgaard *et al.*, 2011). Ao contrário da técnica de ICP-MS, na ESI-MS a informação molecular é mantida durante a ionização permitindo a confirmação estrutural do composto com base na massa.

Na tentativa de realizar a identificação das espécies que não puderam ser identificadas por HPLC-ICP-MS nas amostras de folhas de girassol, duas frações (F1 e F2) cromatográficas (Figura 29) foram coletadas e analisadas por ESI-MS. Entretanto, nenhum composto com padrão isotópico de selênio foi detectado nestas frações, provavelmente devido à alta concentração de sal da fase móvel ($25\text{-}250\text{ mmol L}^{-1}$) que pode provocar a supressão do sinal das espécies de selênio. Mesmo o acetato de amônio possuindo características favoráveis para ser utilizado em ESI-MS, volatilidade e possibilidade de otimização de pH (Far *et al.*, 2010), essas condições de concentração do tampão para separação cromatográfica (Tabela 12) afetam negativamente a sensibilidade da técnica.

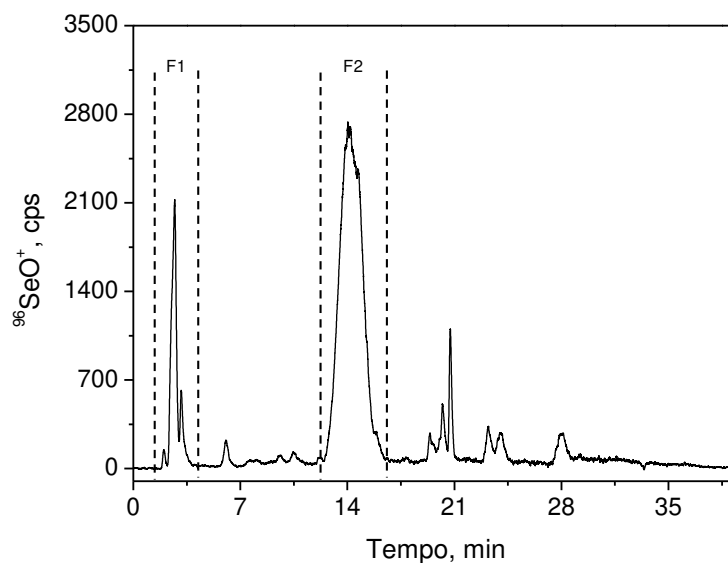


Figura 29. Cromatograma das espécies de selênio presentes nas amostras de folhas de girassol (planta enriquecida) por HPLC-ICP-MS. As linhas tracejadas marcam as regiões de coleta das frações. (Programa de eluição: 7,5 min a 0% de B; 3,3 min a 25% de B; 3,8 min a 50% B; 10 min a 100% de B; 7,5 min a 50% de B e 7,5 min a 0% de B). Os cromatogramas foram suavizados pelo método Savitzky-Golay usando polinômio de 2º ordem e janela de 50 pontos

Apesar da técnica HPLC com troca aniônica apresentar uma excelente separação de selenometabólitos, Casal *et al.* (2010) também relata o problema da perda de informação devido a composição da fase móvel que prejudica a ionização das espécies e sua detecção por ESI-MS. Uma alternativa poderia ser a realização de separações por outros mecanismos cromatográficos com fases móveis compatíveis para análise por ESI-MS. Vários trabalhos demonstram a aplicação da cromatografia líquida seguida de detecção por ESI-MS para identificação de selenocompostos (Anan *et al.*, 2011; Gosetti *et al.*, 2007; Infante *et al.*, 2006; Lindemann e Hintelmann, 2002). Preud'homme *et al.* (2012) sugere a HPLC com exclusão de tamanho seguida de UPLC (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) com fase reversa como um eficiente sistema de separação para ESI-trap/Orbitrap, onde 49 metabolitos de selênio foram identificados em leveduras.

Por infusão direta do extrato aquoso das folhas de girassol, pelo menos três razões m/z foram apontadas como sendo de possíveis selenocompostos (m/z 417, 453, 555), por apresentarem padrão isotópico semelhante ao do selênio (Figura 30). Entretanto, não há na literatura espécies de selênio relacionadas a estas massas.

Esses possíveis selenocompostos foram, então, selecionados e submetidos a experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) na tentativa de realizar a identificação estrutural. Porém, pouca informação estrutural foi obtida por MS/MS para as razões m/z 417, 453 e 555, devido à baixa fragmentação apresentada. Assim, até o momento não foi possível elucidar a estrutura desses compostos.

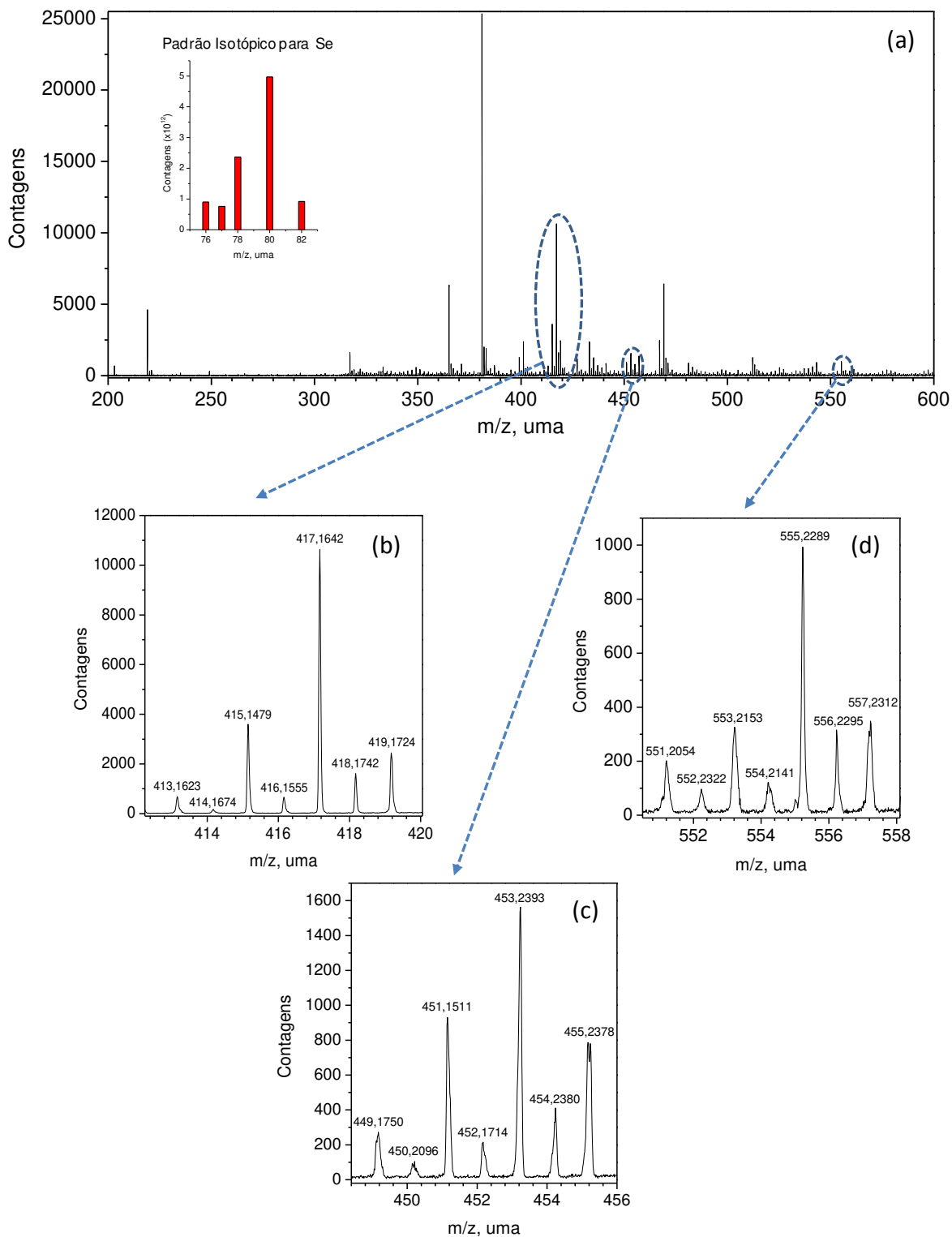


Figura 30. Espectro de massa da infusão direta de extrato de folhas de girassol adquirido por ESI-MS (a), com o padrão isotópico do Se no canto esquerdo. Padrão isotópico dos precursores: m/z 417 (b), 453 (c) e 555 (d).

McSheehy *et al.* (2002) também relata que selenocompostos não podem ser analisados por ESI-MS diretamente no extrato devido a presença de compostos de alta massa molecular na matriz, que também suprimem o sinal. Além disso, a identificação confiável de um metabólito desconhecido requer, além do uso de MS molecular, a síntese da estrutura proposta, demonstração de espectros de massa idênticos e padrões de fracionamento do composto sintetizado e do metabólito purificado (Gammelgaard *et al.*, 2011).

2.4. Conclusões

Pelo menos seis espécies de selênio podem ser encontradas em amostras de plâncton e quatro foram identificadas com base no tempo de retenção, selenocistina, selenometionina, Se(IV) e Se(VI). O Se(IV) foi a principal espécie extraída com água. Usando o método HPLC-ICP-MS para determinação de Se(IV), Se(VI), selenocistina e selenometionina, em plâncton (BCR-414), foi obtido um bom balanço de massa, com uma recuperação de 91% do valor certificado.

As principais espécies identificadas na amostra de castanha-do-pará foram a selenometionina e selenocistina. As espécies inorgânicas (Se(IV) e Se(VI)) não foram observadas no extrato aquoso. Com base no teste de simulação gastrointestinal foi possível identificar que o composto bioacessível na castanha-do-pará é principalmente a selenometionina.

O estudo de especiação por HPLC-ICP-MS com troca aniônica, sugere a presença de SeCis2 em urina humana. Além disso, após ingestão de castanha-do-pará (1 castanha por dia, durante 15 dias) foram observadas diferenças significativas entre as amostras de urina de mulheres e homens. A dose administrada provocou um aumento na quantidade de SeCis2 excretada nas urinas de amostras do grupo feminino, enquanto que não houve alteração significativa para o grupo do sexo masculino, antes e após consumo de castanha-do-pará, sugerindo que quantidades diferentes devem ser adotadas para suprir a necessidade nutricional de homens e mulheres.

A planta de girassol cultivada com solução de selenito apresentou maior número de espécies de selênio nas folhas quando comparada a planta

controle. Aproximadamente, 12 espécies de selênio foram extraídas das folhas com água, cinco a mais do que as observadas no cromatograma da planta controle. Na análise por infusão direta do extrato aquoso de folhas de girassol por ESI-MS, três possíveis compostos de selênio foram identificados, por meio do padrão isotópico de selênio, com m/z 417, 453 e 555. Porém, não foi possível realizar, ainda, a elucidação estrutural dessas massas.

3. Conclusões Finais

O acoplamento de técnicas é cada vez mais utilizado, por resultar em métodos mais rápidos, seletivos e sensíveis, devido à combinação de suas características, fatores também essenciais em estudos de especiação.

O uso do acoplamento da técnica de SPME com o forno de grafite, inicialmente proposto por Lopes *et al.* (2011) para extração de compostos voláteis de estanho, foi refinado para extração de selênio como piazoselenol. Sua aplicação na determinação de Se(IV), utilizando GC-MS, foi bem sucedida em amostras de plâncton, água e medicamento. Além disso, este novo sistema SPME-GF, combinado com a GC-MS, levanta a possibilidade do uso dessa técnica para especiação de selênio inorgânico.

Esta Tese é, também, relevante para estudos de especiação de selênio em amostras biológicas usando o acoplamento HPLC-ICP-MS. A pesquisa pode contribuir com informações importantes para outras áreas, como nutricional, pois os efeitos benéficos e tóxicos do selênio são dependentes da espécie e concentração ingerida.

Ressalta-se, ainda, que a utilização da técnica HPLC-ICP-MS juntamente com a HPLC-ESI-MS, para identificação de compostos, muitas vezes se faz necessária em estudos de especiação de selênio, devido ao pequeno número de padrões disponíveis frente à quantidade de espécies existente, que limita a aplicação da técnica HPLC-ICP-MS. No caso das amostras de folhas de girassol, as espécies de selênio não identificadas por HPLC-ICP-MS deverão ser elucidadas realizando a separação por outros

mecanismos cromatográficos com fases móveis que permitam a análise por ESI-MS.

Referências Bibliográficas

Al-Attar, A. F.; Nickless, G. 1,2-diaminobenzene derivatives for the determination of selenium by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 440 (1988) 333.

Alpendurada, M. de F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 3.

Al-Saad, K. A.; Amr, M. A.; Helal, A. I. Collision/reaction cell ICP-MS with shielded torch and sector field icp-ms for the simultaneous determination of selenium isotopes in biological matrices. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 140 (2011) 103.

Amoako, P. O.; Uden, P. C.; Tyson, J. F. Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. *Anal. Chim. Acta*, 652 (2009) 315.

Anan, Y.; Ishiwata, K.; Suzuki, N.; Tanabe, S.; Ogra, Y. Speciation and identification of low molecular weight selenium compounds in the liver of sea turtles. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 80.

Ashournia, M.; Aliakbar, A. Determination of Se(IV) in natural waters by adsorptive stripping voltammetry of 5-nitropiazselenol. *J. Hazard. Mater.* 174 (2010) 788.

B^o Hymer, C.; Caruso, J. A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry (review). *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 1.

Becker, J. S. *Inorganic mass spectrometry: principles and applications*. Chichester: Wiley, 2007, 496 p.

Bednar, A. J.; Kirgan, R. A.; Jones, W. T. Comparison of standard and reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry in the determination of chromium and selenium species by HPLC–ICP–MS. *Anal. Chim. Acta*, 632 (2009) 27.

Bidari, A.; Hemmatkhah, P.; Jafarvand, S.; Hosseini, M. R. M.; Assadi, Y. Selenium analysis in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on piazselenol formation and GC–ECD. *Microchim. Acta*, 163 (2008) 243.

Biarta, K.; Dernovies, M. Vacchina, V.; Szpunar, J.; Bertin, G.; Lobinski, R. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues

by size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP-MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 1789.

Bodó, E. T.; Stefánka, Z.; Ipolyi, I.; Sörös, C.; Dernovics, M.; Fodor, P. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 32.

Bueno, M.; Pannier, F. Quantitative analysis of volatile selenium metabolites in normal urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 78 (2009) 759.

Cai, X.; J Eric Block, J. E.; Uden, P. C.; Quimby, B. D.; Sullivan, J. J. *Allium* chemistry: Identification of natural abundance organoselenium compounds in human breath after ingestion of garlic using gas chromatography with atomic emission detection. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 7, 1751.

Campillo, N.; Aguinaga, N.; Viñas, P.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M. Gas chromatography with atomic emission detection for dimethylselenide and dimethyldiselenide determination in waters and plant materials using a purge-and-trap preconcentration system. *J. Chromatogr A*, 1095 (2005) 138.

Campillo, N.; Peñalver, R.; Hernández-Córdoba, M.; Pérez-Sirvent, C.; Martínez-Sánchez, M. Comparison of two derivatizing agents for the simultaneous determination of selenite and organoselenium species by gas chromatography and atomic emission detection after preconcentration using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1165 (2007) 191.

Campillo, N.; Penalver, R.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M. Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile organic sulphur and selenium compounds in beers, wines and spirits using gas chromatography and atomic emission detection. *J. Chrom. A*, 1216 (2009) 6735.

Casal, S. G.; Far, J.; Bierla, K.; Ouerdane, L.; Szpunar, J. Study of the Se-containing metabolomes in Se-rich yeast by size-exclusion—cation-exchange HPLC with the parallel ICP-MS and electrospray orbital ion trap detection. *Metallomics*, 2 (2010) 535.

Chan, Q.; Afton, S. E.; Caruso, J. A. Selenium speciation profiles in selenite-enriched soybean (Glycine Max) by HPLC-ICPMS and ESI-ITMS. *Metallomics*, 2 (2010) 147.

- Chang, J. C.; Gutenmann, W. H.; Reid, C. M.; Lisk, D. J. Selenium Content of Brazil Nuts from Two GeOgraphic Locations in Brazil. *Chemosphere*, 30 (1995) 801
- Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C. Sample preparation. *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 191.
- Chen, Z.; Wang, W.; Mallavarapu, M.; Naidu, R. Comparison of no gas and He/H₂ cell modes used for reduction of isobaric interferences in selenium speciation by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 63 (2008) 69.
- Chunhieng, T.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Brochier, J.; Goli, T.; Montet, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excels.* *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 4318.
- Clark, S.; Craig, P. J. The use of sodium tetraethylborate for the derivatization and analysis of selenium containing compounds. *Mikrochim. Acta*. 109 (1992) 141.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006, 453 p.
- Combs, G. F.; Gray, W. P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.*, 79 (1998) 3, 179.
- Correia, P. R. M.; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V. Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas. *Rev. Analytica*, (2003) 5, 52.
- Cubadda, F.; Aureli, F.; Ciardullo, S.; D'amato, M.; Raggi, A.; Acharya, R.; Reddy, R. A. V.; Prakash, N. T. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010) 2295.
- D'llio, S.; Violante, N.; Majorani, C.; Petrucci, F. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review. *Anal. Chim. Acta*, 698 (2011) 6.
- Dauchy, X. Point-Gautier, M. Astruc, A.; Astruc, M. Analytical methods for the speciation of selenium compounds: a review. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 792.
- Daun, C.; Lundh, T.; Önnings, G.; Akesson, B. Separation of soluble selenium compounds in muscle from seven animal species using size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 129.

Dernovics, M.; Far, J.; Lobinski, R. Identification of anionic selenium species in Se-rich yeast by electrospray QTOF MS/MS and hybrid linear ion trap/orbitrap MSⁿ. *Metallomics*, 1 (2009) 317.

Dernovics, M.; Lobinski, R. Speciation analysis of selenium metabolites in yeast-based food supplements by ICPMS-assisted hydrophilic interaction HPLC-hybrid linear ion trap/orbitrap MSⁿ. *Anal. Chem.*, 80 (2008) 3975.

Dernovics, M.; Vass, A.; Németh, A.; Magyar, A. Synthesis and application of a Sec₂-containing oligopeptide for method evaluation purposes in selenium speciation. *Talanta*, Article in press (<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.038>).

Dietz, C.; Landaluze, J. S.; Ximénez-Embún, P.; Madrid-Albarrán, Y.; Cámara, C. SPME–multicapillary GC coupled to different detection systems and applied to volatile organo-selenium speciation in yeast. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004a) 260.

Dietz, C.; Landaluze, J. S.; Ximénez-Embún, P.; Madrid-Albarrán, Y.; Cámara C. Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction–moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta*, 501 (2004b) 157.

Dietz, C.; Pérez-Corona, T.; Madrid-Albarrán, Y.; Cámara, C. SPME for on-line volatile organo-selenium speciation. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 467.

Dietz, C.; Sanz, J.; Câmara, C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *J. Chromatogr. A*, 1103 (2006) 183.

Dimitrakakis, E.; Haberhauer-Troyer, C.; Abe, Y.; Ochsenkuhn-Petropoulou, M.; Rosenberg, E. Solid-phase microextraction–capillary gas chromatography combined with microwave-induced plasma atomic-emission spectrometry for selenite determination. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 842.

Dressler, V. L.; Antes, F. G.; Moreira, C. M.; Pozebon, D.; Duarte, F. A. As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review. *Inter. J. Mass Spec.*, 307 (2011) 149.

Duan, J.; Hu, B. Separation and determination of seleno amino acids using gas chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry after hollow fiber liquid phase microextraction. *J. Mass. Spectrom.*, 44 (2009a) 605.

- Duan, J.; Hu, B. Speciation of selenomethionine and selenocystine using online micro-column containing Cu(II) loaded nanometer-sized Al₂O₃ coupled with ICP-MS detection. *Talanta*, 79 (2009b) 734.
- Dumont, E.; Pauw, L. D.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? *Food Chem.*, 95 (2006a) 684.
- Dumont, E.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006b)1304.
- Erickson, B. E. Graphite furnace AAS. *Anal. Chem.*, 72(2000) 543A.
- Ettre, L. S. Nomenclature for Chromatography. *Pure & Appl. Chem.*, 65 (1993) 819.
- Fairweather-Tait, S. J.; Collings, R.; Hurst, R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am. J. Clin. Nutr.*, 91 (2010) 1484S.
- Fang, Y.; Zhang, Y.; Catron, B.; Chan, Q.; Hu, Q.; Caruso, J. A. Identification of selenium compounds using HPLC-ICPMS and nano-ESI-MS in selenium-enriched rice via foliar application. *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 1657.
- Far, J.; Preud'homme, H.; Lobinski, R. Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion–microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP–MS and electrospray Q-TOF-MS detection. *Anal. Chim. Acta*, 657 (2010) 175.
- Fernanda Inda de Albuquerque, F. I.; Duyck, C. B.; Fonseca, T. C. O.; Saint'Pierre, T. D. Determination of As and Se in crude oil diluted in xylene by inductively coupled plasma mass spectrometry using a dynamic reaction cell for interference correction on ⁸⁰Se. *Spectrochim. Acta B*, 71-72 (2012) 112.
- Floor, G. H.; Iglesias, M.; Román-Ross, G.; Corvini, P. F. X.; Lenz, M. Selenium speciation in acidic environmental samples: Application to acid rain-soil interaction at Mount Etna volcano. *Chemosphere*, 84 (2011) 1664.
- Food and Nutrition Board Institute of Medicine. *Dietary References Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. Washington (DC): National Academy Press, 2000.
- Gabel-Jensen, C.; Lunøe, K.; Madsen, K. G.; Bendix, J.; Cornett, C.; Stürup, S.; Hansen, H. R.; Gammelgaard, B. Separation and identification of the selenium-sulfur amino acid S-(methylseleno)cysteine in intestinal epithelial

cell homogenates by LC-ICP-MS and LC-ESI-MS after incubation with methylseleninic acid. *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 727.

Gammelgaard, B.; Bendahl, L. Selenium speciation in human urine samples by LC- and CEICP-MS – separation and identification of selenosugars. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 135.

Gammelgaard, B.; Jackson, M. I.; Gabel-Jensen, C. Surveying selenium speciation from soil to cell - forms and transformations. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 1743.

Gammelgaard, B.; Jessen, K. D.; Kristensen, F. H.; Jøns, O. Determination of trimethylselenonium ion in urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta*, 404 (2000) 47.

Ghasemi, E.; Sillanpää, M.; Najafi, N. M. Headspace hollow fiber protected liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectroscopy for speciation and determination of volatile organic compounds of selenium in environmental and biological samples. *J. Chrom. A*, 1218 (2011) 380.

Gómez, M. M.; Gasparic, T.; Palacios, M. A.; Camara, C. Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation-atomic absorption spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 374 (1998) 241.

Gómez-Ariza, J. L.; Pozas, J. A.; Giráldez, I.; Morales, E. Speciation of volatile forms of selenium and inorganic selenium in sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 823 (1998) 259.

Gómez-Ariza, J. L.; Pozas, J. A.; Giráldez, I.; Morales, E. Use of solid phase extraction for speciation of selenium compounds in aqueous environmental samples. *Analyst*, 124 (1999a) 75.

Gómez-Ariza, J.L.; Pozas, J.A.; Giráldez, I.; Morales, E. Comparison of three derivatization reagents for the analysis of Se(IV) based on piaseleol formation and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 49 (1999b) 285.

Gong, L.; Xu, Q.; Lee, C.; Zhang, H. Selenium speciation analysis of *Misgurnus anguillicaudatus* selenoprotein by HPLC–ICP–MS and HPLC–ESI–MS/MS. *Eur. Food Res. Technol.*, 235 (2012) 169.

Gontijo, L. C. *Estudo da formação do 4,5-benzopiazoselenol nas misturas homogêneas dos solventes água-etanol-clorofórmio (ou tolueno)* (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, **2006**.

Gosetti, F.; Frascarolo, P.; Polati, S.; Medana, C.; Gianotti, V.; Palma, P.; Aigotti, R.; Baiocchi, C.; Gennaro, M. C. Speciation of selenium in diet supplements by HPLC–MS/MS methods. *Food Chem.*, 105 (**2007**) 1738.

Güler, N.; Maden, M.; Bakirdere, S.; Ataman, O. Y.; Volkan, M. Speciation of selenium in vitamin tablets using spectrofluorometry following cloud point extraction. *Food Chem.*, 129 (**2011**) 1793.

Guidotti, M. Determination of Se⁴⁺ in drinkable water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Intern.*, 83 (**2000**) 5, 1082.

Guidotti, M.; Ravaioli, G.; Vitali, M. Selective determination of Se⁴⁺ and Se⁶⁺ using SPME and GC/MS. *J. High Resol. Chromatogr.*, 22 (**1999**) 7, 414.

Guntinas, M. B. de la C.; Lobinski, R.; Adams, F. Interference-free determination of selenium(IV) by capillary gas chromatography–microwave-induced plasma atomic emission spectrometry after volatilization with sodium tetraethylborate. *J. Anal. At. Spectrom.*, 10 (**1995**) 111.

Hart, D. J.; Fairweather-Tait, S. J.; Broadley, M.R.; Dickinson, S. J.; Foot, I.; Knott, P.; McGrath, S. P.; Mowat, H.; Norman, K.; Scott, P. R.; Stroud, J. L.; Tucker, M.; White, P. J.; Zhao, F. J.; Hurst, R. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chem.*, 126 (**2011**) 1771.

Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S.R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6^a ed. Porto Alegre: Bookman, **2009**.

Hunter, W. J.; Kuykendall, L. D. Determination of dimethylselenide and dimethyldiselenide by gas chromatography–photoionization detection. *J. Chromatogr. A*, 1038 (**2004**) 295.

Infante, H. G.; Hearn, R.; Catterick, T. Current mass spectrometry strategies for selenium speciation in dietary sources of high-selenium. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (**2005**) 957.

Infante, H. G.; O'Connor, G.; Rayman, M.; Hearn, R.; Cook, K. Simultaneous identification of selenium-containing glutathione species in selenised yeast by on-line HPLC with ICP-MS and electrospray ionisation

quadrupole time of flight (QTOF)-MS/MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 1256.

International Conference on Harmonization (ICH), in: ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74 (2002) 5, 835.

Kannamkumarath, S. S.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Vonderheide, A.; Caruso, J. A. HPLC–ICP–MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 454.

Kannamkumaratha, S. S.; Wrobel, K.; Wuilloud, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. *Talanta*, 66 (2005) 153.

Kápolna, E.; Fodor, P. Bioavailability of selenium from selenium-enriched green onions (*Allium fistulosum*) and chives (*Allium schoenoprasum*) after ‘in vitro’ gastrointestinal digestion. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 58 (2007) 4, 282.

Kápolna, E.; Hillestrøma, P. R.; Laursen, K. H.; Husted, S.; Larsen, E. H. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chem.*, 115 (2009) 1357.

Kápolna, E.; Shah, M.; Caruso, J. A.; Fodor, P. Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP–MS. *Food Chem.*, 101 (2007) 1398.

Kapsimali, D. C.; Zachariadis, G. A. Comparison of tetraethylborate and tetraphenylborate for selenite determination in human urine by gas chromatography mass spectrometry, after headspace solid phase microextraction. *Talanta*, 80 (2010) 1311.

Kapsimali. D.C. ; Zachariadis, G. A. Headspace and direct immersion solid phase microextraction procedures for selenite determination in urine, saliva and milk by gas chromatography mass spectrometry. *J. Chrom. B*, 877 (2009) 3210.

Kehrig, H. A.; Seixas, T. G.; Palermo, E. A.; Baêta, A. P.; Castelo-Branco, C. W.; Malm, O.; Moreira, I. The relationships between mercury and selenium in plankton and fish from a tropical food web. *Environ Sci Pollut Res*, 16 (2009) 10.

Kuehnelt, D.; Juresa, D.; Francesconi, K. A.; Fakhri, M.; Reid, M. E. Selenium metabolites in urine of cancer patients receiving L-selenomethionine at high doses. *Toxic. Appl. Pharm.*, 220 (2007) 211.

Kuehnelt, D.; Juresa, D.; Kienzl, N.; Francesconi, K. A. Marked individual variability in the levels of trimethylselenonium ion in human urine determined by HPLC/ICPMS and HPLC/vapor generation/ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006a) 2207.

Kuehnelt, D.; Kienzl, N.; Juresa, D.; Francesconi, K. A. HPLC/vapor generation/ICPMS of selenium metabolites relevant to human urine – selective determination of trimethylselenonium ion. *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006b) 1264.

Kumar, A.; Gaurav; Malik, A. K.; Tewary, D. K.; Singh, B. A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications. *Anal. Chim. Acta*, 610 (2008) 1.

Lenz, M. Hullebusch, E. D. V.; Farges, F.; Nikitenko, S.; Corvini, P. F. X.; Lens, P. N. L. Combined speciation analysis by X-ray absorption near-edge structure spectroscopy, ion chromatography, and solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry to evaluate biotreatment of concentrated selenium wastewaters. *Environ. Sci. Technol.*, 45 (2011) 1067.

Letsiou, S.; Nischwitz, V.; Traar, P.; Francesconi, K. A.; Pergantis, S. A. Determination of selenosugars in crude human urine using high-performance liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 21 (2007) 343.

Li, Y.; Chen, C.; Li, B.; Wang, Q.; Wang, J.; Gao, Y.; Zhao, Y.; Chai, Z. Simultaneous speciation of selenium and mercury in human urine samples from long-term mercury-exposed populations with supplementation of selenium-enriched yeast by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 925.

Lindemann, T.; Hintelmann, H. Identification of selenium-containing glutathione s-conjugates in a yeast extract by two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma ms and nanoelectrospray MS/MS detection. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4602.

Lipiec, E.; Siara, G.; Bierla, K.; Ouerdane, L.; Szpunar, J. Determination of selenomethionine, selenocysteine, and inorganic selenium in eggs by HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 731.

Lopes, A. S. *Extração de espécies organoestânicas em sedimentos por micro extração em fase sólida acoplada ao forno de grafite e determinação de estanho total por amostragem em suspensão* (Tese de Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, **2009**.

Lopes, A. S.; Augusto, F.; Arruda, M. A. Z. The feasibility of the graphite furnace atomic absorption spectrometry-solid phase microextraction coupling focusing on chemical speciation of organotin compounds. *Br. J. Anal. Chem.*, **4** (2011) 201.

Lu, Y.; Rumpler, A.; Francesconi, K. A.; Pergantis, S. A. Quantitative selenium speciation in human urine by using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **731** (2012) 49.

Mataveli, L. R. V.; Pohl, P.; Mounicou, S.; Arruda, M. A. Z. A Szpunar, J. A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Metallomics*, **2** (2010) 800.

Marchante-Gayón, J. M.; Feldmann, I.; Thomas, C.; Jakubowski, N. Speciation of selenium in human urine by HPLC-ICP-MS with a collision and reaction cell. *J. Anal. At. Spectrom.*, **16** (2001) 457.

McShehy, S.; Szpunar, J.; Haldys, V. Tortajada, J. Identification of selenocompounds in yeast by electrospray quadrupole-time of flight mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **17** (2002) 507.

Meija, J.; Montes-Bayón, M.; Le Duc, D. L.; Terry, N.; Caruso, J. A. Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction. *Anal. Chem.*, **74** (2002) 5837.

Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Lam, J. W. Sampling and determination of metal hydrides by solid phase microextraction thermal desorption inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **15** (2000) 1461.

Mester, Z.; Sturgeon, R.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochim. Acta B*, **56** (2001) 233.

Meyer, V. R. *Practical high-performance liquid chromatography*. Chichester: WILEY, 4th ed., **2004**, 357 p.

Michaelke, B. Element speciation definitions, analytical methodology and some examples. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56** (2003) 122.

Montes-Bayón, M.; Molet, M. J. D.; González, E. B.; Sanz-Medel, A. Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination

in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 68 (2006) 1287.

Moreno, F.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J. L. Simultaneous analysis of mercury and selenium species including chiral forms of selenomethionine in human urine and serum by HPLC column-switching coupled to ICP-MS. *Analyst*, 135 (2010) 2700.

Moreno, M.E., Pérez-Conde, C., Cámara, C. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 666.

Mounicou, S.; Dernovics, M.; Bierla, K.; Szpunar, J. A sequential extraction procedure for an insight into selenium speciation in garlic. *Talanta*, 77 (2009) 1877.

Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R.; Andrey, D.; Blake, C. J. Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 880.

Muecke, R.; Schomburg, L.; Buentzel, J.; Kisters, K.; Micke, O. Selenium or No Selenium—That Is the Question in Tumor Patients: A New Controversy. *Integrative Cancer Therapies*, 9 (2010) 136.

Muscatello, J. R.; Belknap, A. M.; Janz, D.M. Accumulation of selenium in aquatic systems downstream of a uranium mining operation in northern Saskatchewan, Canada. *Environ. Pollut.*, 156 (2008) 387.

Muscatello, J. R.; Janz, D. M. Selenium accumulation in aquatic biota downstream of a uranium mining and milling operation. *Sci. Total Environ.*, 407 (2009) 1318.

Najafi, N. M.; Tavakoli, H.; Abdollahzadeh, Y.; Alizadeh, R. Comparison of ultrasound-assisted emulsification and dispersive liquid-liquid microextraction methods for the speciation of inorganic selenium in environmental water samples using low density extraction solvents. *Analytica Chimica Acta*, 714 (2012) 82.

Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.*, 400 (2008) 115.

Ochsenkühn-Petropoulou, M.; Michalke, B.; Kavouras, D.; Schramel, P. Selenium speciation analysis in a sediment using strong anion exchange and reversed phase chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 478 (2003) 219.

- Ochsenkühn-Petropoulou, M.; Tsopelas, F. Speciation analysis of selenium voltammetric techniques. *Anal. Chim. Acta*, 467 (2002) 167.
- Olivas, R. M.; Donard, O. F. X.; Gilon, N.; Potin-Gaijtier, M. Speciation of Organic Selenium Compounds by High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Natural Samples. . *J. Anal. At. Spectrom.*, 11 (1996) 1171.
- Padovani, R. M.; Amaya-Farfán, J.; Colugnati, F. A. B.; Domene, S. M. A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Rev. Nutr.*, 19 (2006) 6, 741.
- Papp, L. V.; Holmgren, A.; Khanna, K. K. Selenium and Selenoproteins in Health and Disease. *Antioxid. Redox Signaling*, 12 (2010) 793.
- Papp, L. V.; Lu, J.; Holmgren, A.; Khanna, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health (Comprehensive Invited Review). *Antioxid. Redox Signaling*, 9 (2007) 775.
- Parreira, F. V.; Cardeal, Z. de L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. *Quim. Nova*, 28 (2005) 646.
- Pawliszyn, J. *Application of solid phase microextraction*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999.
- Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: Theory and practice*, Canadá: WILEY-VCH, 1997.
- Peachey, E.; Cook, K.; Castles, A.; Hopley, C.; Goenaga-Infante, H. Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium. *J. Chrom. A*, 1216 (2009) 7001.
- Pedrero, Z.; Madrid, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodtuffs and biological specimens: A review. *Anal. Chim. Acta*, 634 (2009) 135.
- Pilon-Smits, E. A.; LeDuc, D. Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr. Opin. in Biotechnol.*, 20 (2009) 207.
- Polatajko, A.; Jakubowski, N.; Szpunar, J. State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 639.
- Poole, C. F. *The essence of chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2003, 924 p.
- Popp, M.; Hann, S.; Koellensperger, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography

hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry-A review. *Anal. Chim. Acta*, 668 (2010) 114.

Preud'homme, H.; Far, J.; Gil-Casal, S.; Lobinski, R. Large-scale identification of selenium metabolites by online size-exclusion-reversed phase liquid chromatography with combined inductively coupled plasma (ICP-MS) and electrospray ionization linear trap-Orbitrap mass spectrometry (ESI-MSⁿ). *Metallomics*, 4 (2012) 422

Pyrznska, K. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem.*, 114 (2009) 1183.

Pyrznska, K. Speciation analysis of some organic selenium compounds: A review. *Analyst*, 121 (1996) 77R.

Rayman, M. P.; Infante, H. G.; Sargent, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation (review article). *Br. J. Nutr.*, 100 (2008) 238.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, 27 (2004) 771.

Ruby, M.V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois M.; Mosby, D. E.; Casteel, S. W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D.; Chappell, W. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999), 3697.

Saleh, A.; Yamini, Y.; Faraji, M.; Shariati, S.; Rezaee, M. Hollow fiber liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of ultra-trace levels of Se(IV) after derivatization in urine, plasma and natural water samples. *J. Chrom. B*, 877 (2009) 1758.

Sánchez-Martínez, M.; da Silva, E. G.; Pérez-Corona, T.; Cámara, C.; Ferreira, S. L. C.; Madrid, Y. Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 88 (2012) 272.

Sarkouhi, M.; Yamini, Y.; Zanjani, M. R. K.; Afsharnaderi, A. Liquid-phase microextraction and gas-chromatographic determination of selenium(IV) in aqueous samples. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 87 (2007) 603.

Schaumlöffel, D.; Tholey, A. Recent directions of electrospray mass spectrometry for elemental speciation analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2011) 1645.

SciFinder Scholar versão 2007.

- Serra, A. M.; Estela, J. M.; Coulomb, B.; Boudenne, J. L.; Cerdà, V. Solid phase extraction – Multisyringe flow injection system for the spectrophotometric determination of selenium with 2,3-diaminonaphthalene. *Talanta*, 81 (2010) 572.
- Shah, M.; Kannamkumarath, S. S.; Wuilloud, J. C. A.; Wuilloud, R. G.; Caruso, J. A. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 381.
- Shahdousti, P.; Alizadeh, N. Headspace-solid phase microextraction of selenium(IV) from human blood and water samples using polypyrrole film and analysis with ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 684 (2011) 67.
- Silva, M. A. O.; Andrade, S. A. L.; Mazzafera, P.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: A comparative metallomic study. *Inter. J. Mass Spec.*, 307 (2011) 55.
- Silva, M. A. O.; Arruda, M. Z. A. Identification of selenium in the leaf protein of sunflowers by a combination of 2D-PAGE and laser ablation ICP-MS. *Microchim. Acta*, 176 (2012) 131.
- Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Thomson Learning, 2007.
- Stahl, W.; Berg, H. V. D.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Faulks, R. M.; Gärtner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; Kelly, F. J.; Polidori, M. C.; Rice-Evans, C.; Southon, S.; Vliet, T. V.; Viña-Ribes, J.; Williamson, G.; Astley, S. B. Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.*, 23 (2002) 39.
- Stürup, S.; Bendahl, L.; Gammelgaard, B. Optimization of LC-DRC-ICP-MS for the speciation of selenotrisulfides with simultaneous detection of sulfur and selenium as oxides combined with determination of elemental and isotope ratios. *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 201.
- Sucharová, J. Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 1756.
- Szpunar, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, 130 (2005) 442.
- Szpunar, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, 125 (2000) 963.

- Tao, Z.; Yu-Xi, G.; Bai, L.; Yu-Feng, L.; Chun-Ying, C.; Gang, W. Study of selenium speciation in selenized rice using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometer. *Chin. J. Anal. Chem.*, 36 (2008) 2, 206.
- Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.; Muntau, H.; Leeuwen, H. P. V.; Lobinski, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 8, 1453.
- Theodoridis, G.; Koster, E. H. M.; Jong, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B*, 745 (2000) 49.
- Thiry, C.; Ruttens, A.; Temmerman, L. De; Schneider, Y.; Pussemier, L. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem.*, 130 (2012) 767.
- Thomson, C. D.; Chisholm, A.; McLachlan, S. K.; Campbell, J. M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr.*, 87 (2008) 379.
- Tinggi, U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*, 13 (2008) 102.
- Tolu, J.; Hécho, I. L.; Bueno, M.; Thiry, Y.; Potin-Gautier, M. Selenium speciation analysis at trace level in soils. *Anal. Chim. Acta*, 684 (2011) 126.
- Tyburska, A.; Jankowski, K.; Rodzik, A. Determination of arsenic and selenium by hydride generation and headspace solid phase microextraction coupled with optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 66 (2011) 517.
- Uden, P. C. Modern trends in the speciation of selenium by hyphenated techniques. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 422.
- Valdiglesias, V.; Pásaro, E.; Méndez, J.; Laffon, B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch Toxicol.*, 84 (2010) 337.
- Valente, A. L. P.; Augusto, F. Microextração por fase sólida. *Quim. Nova*, 23 (2000) 523.
- Vas, G.; Vékey, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, 39 (2004) 233.

Vonderheide, A. P.; Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; B'Hymer, C.; Montes-Bayon, M.; De Leon, C. P.; Caruso, J. A. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 5722.

Welz, B.; Sperling, M. *Atomic absorption spectrometry*. 3^a ed. Weinheim: WILEY-VCH, 1999.

Whanger, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br. J. Nutr.*, 91 (2004) 11.

Winkel, L.; Feldmann, J.; Meharg, A. Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Sci. Technol.*, 44 (2010) 382.

World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 1998.

Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003a) 133.

Wrobel, K.; Kannamkumarath, S.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. Environmentally friendly sample treatment for speciation analysis by hyphenated techniques (review). *Green Chem.*, 5 (2003b) 250.

Yu, Y.; Luo, L.; Yang, K.; Zhang, S. Influence of mycorrhizal inoculation on the accumulation and speciation of selenium in maize growing in selenite and selenate spiked soils. *Pedobiologia*, 54 (2011) 267.

Zambonin, C. G. Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. A review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 73.

Zhang, X.; Yang, L.; Mester, Z. Determination of amino acids in selenium-enriched yeast by gas chromatography-mass spectrometry after microwave assisted hydrolysis, *Anal. Chim. Acta*, (2012), doi:10.1016/j.aca.2012.07.011

Zhao, Y.; Zheng, J.; Yang, M.; Yang, G.; Wu, Y.; Fu, F. Speciation analysis of selenium in rice samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 84 (2011) 983.