

DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM FÍGADO BOVINO PELA TÉCNICA DE GERAÇÃO DE HIDRETOS ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA¹

SHEILA DA SILVA MORAES², HAROLD RÜSSEL SINN³, GERHARD HABERMEHL³,
WALDEMAR TERNES⁴ e REINALDO CALIXTO DE CAMPOS⁵

RESUMO - Tendo em vista os baixos teores de selênio (Se) normalmente encontrados no fígado bovino, sua determinação neste tecido requer um método de alta sensibilidade. A espectrofotometria de absorção atômica utilizando a técnica de geração de hidretos responde a este requisito, sendo ainda reconhecida por sua simplicidade e exatidão. A dissolução da amostra faz-se necessária, devendo haver a decomposição tão completa quanto possível da matéria orgânica, sem perda do elemento de interesse. No presente trabalho, até 10 mg de amostra seca e pulverizada foram deixados em contato com uma mistura nítrico-perclórica (10:1) por doze horas, e a digestão foi completada por aquecimento, em bloco digestor, a 140°C (60') e, posteriormente, a 210°C. O teor de Se na solução resultante foi, então, determinado por espectrofotometria de absorção atômica, pela técnica de geração de hidretos. O limite de detecção do procedimento analítico foi de 0,5 ng (n=10, k=3). Excelente concordância entre os valores obtidos e certificados foi encontrada na análise do material certificado de referência NIST (National Institute of Standard and Technology) 1577a, bovine liver. O procedimento permitiu a determinação de Se em fígado bovino em concentrações acima de 0,1 µg/g.

Termos para indexação: tecido animal, alta sensibilidade, dissolução da amostra.

SELENIUM DETERMINATION IN BOVINE LIVER BY HYDRIDE GENERATION ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

ABSTRACT - The determination of selenium (Se) in bovine liver requires a sensitive method due to the low content of this element in such tissue. The hydride generation-atomic absorption technique responds to this requirement, and is also recognized for its simplicity and accuracy. The sample dissolution is required. The organic matrix must be completely destroyed, but without analyte losses. In this work, a simple procedure for the Se determination in bovine liver is presented: a 10:1 nitric-perchloric (mixture) is added to 10 mg of the powdered and dried sample, in quartz open tubes. The mixture is allowed to stand overnight and then heated, stepwise, to 140°C (60') and 210°C. Selenium was determined in the resulting solution by hydride-generation-AAS. The detection limit of the whole analytical procedure was 0,5 ng (n=10, k=3). A very good concordance between found and certified values was observed in the analysis of a standard reference material - NIST 1577a, bovine liver. The procedure permitted the determination of Se concentration above 0,1 µg/g in the dried material.

Index terms: animal tissue, high sensitive method, sample dissolution.

INTRODUÇÃO

Embora o selênio não seja um elemento essencial às plantas, sua importância é reconhecida para animais e seres humanos. A função específica do Se no organismo animal é ativar a enzima glutatona peroxidase. Esta enzima protege o citoplasma celular da ação destruidora de radicais livres oxidantes (peróxidos e hidro-peróxidos). Os radicais livres são oriundos do metabolismo basal, como também dos mecanismos de defesa contra processos infecciosos.

¹ Aceito para publicação em 29 de setembro de 1995.

² Méd. Vet., Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS.

³ Quím., Ph.D., Chemisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Hannover Bischofsholer Damm, 85, 3000 Hannover 1, Alemanha.

⁴ Eng. Quím., Ph.D., Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität, Hannover. Herrenhouser Str. 2 3000 Hannover 21, Alemanha.

⁵ Eng. Quím., Ph.D., Dep. de Química, PUC-Rio, Rua M.S. Vicente, 225, CEP 22453-900 Rio de Janeiro, RJ e Dep. de Química, UFRRJ, Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Km 47, CEP 23851-970 Itaguaí, RJ.

Como elemento essencial, o Se é exigido em pequenas concentrações. Na dieta de bovinos, os requisitos estão entre 0,05 e 0,3 mg/kg na matéria seca (National Research Council, 1984). Todavia, em concentrações superiores a 5 mg/kg na matéria seca, pode ser tóxico. A necessidade de se determinar o Se em tecidos animais vem se acentuando à medida que muitas doenças podem ocorrer em função da deficiência ou excesso deste elemento. Alguns métodos para a determinação de Se em material biológico, inicialmente desenvolvidos, exigiam grande manipulação da amostra, e consumo de tempo, apresentando interferências que comprometiam a acurácia dos resultados.

Mais recentemente, a espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos vem sendo a técnica mais utilizada para determinação de traços de Se em tecidos vegetais e animais. Isto se deve, sem dúvida, à sua simplicidade e sensibilidade; têm sido alcançados limites de detecção da ordem de 0,05 ng.mL⁻¹ na solução final de leitura, sem qualquer etapa de pré-concentração. A técnica é praticamente livre de interferência, uma vez que, por força da separação do hidreto formado, a matriz não está presente no processo de atomização-absorção. Estes limites de detecção podem ainda ser melhorados pela introdução de procedimentos de pré-concentração em linha, mas que também implicam maior tempo de análise. A técnica de geração de hidretos requer a dissolução da amostra e, nos níveis de concentração em questão, este pode ser o passo mais crítico da análise, pela necessidade de um ataque suficientemente vigoroso da amostra, para sua dissolução total, mas sem que haja contaminação ou perda do analito durante o processo. No caso de tecidos animais, como o fígado bovino, esta questão pode se tornar especialmente complexa, pelo fato de dois fenômenos opostos estarem envolvidos: (1) muitos compostos de Se estão ligados a proteínas mais solúveis e podem ser perdidos por volatilização se o processo de solubilização não for controlado (Raptis et al., 1983); e (2) compostos como a selenometionina e a selenocisteína e o íon trimetilselênio muitas vezes não são decompostos (Cox & Bibb, 1981).

No presente trabalho, é apresentado o desenvolvimento de um procedimento simples de abertura de amostras de fígado bovino com vistas à determinação de selênio por espectrofotometria de absorção atômica pela técnica de geração de hidretos.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

Para a decomposição da amostra foi utilizado um bloco digestor com controle de tempo e temperatura e tubos de quartzo de colo longo com capacidade de 40 ml (Tecator GmbH).

A dosagem de selênio foi feita por um sistema gerador de hidretos Berghof ML-75, acoplado a um espectrofotômetro de absorção atômica PYE-UNICAMP-SP-1900.

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza (Suprapur-MERCK): ácido nítrico 14 M, ácido perclórico 11,6 M, ácido sulfúrico 18,0 M, ácido clorídrico 5 M, mistura de ácido cloroso/percloroso (Merck, 10741), borohidreto de sódio 2,5% em hidróxido de sódio 0,5 M. A solução padrão 100 µg/ml de selênio foi preparada a partir de uma ampola titrisol-Merck (solução estoque).

Para avaliar a precisão e a exatidão do procedimento proposto, utilizou-se um material certificado de referência NIST (National Institute of Standard and Technology), 1577a, bovine liver, e padrões de laboratório A (fígado de bovino liofilizado) e B (fígado de bovino liofilizado com adição de 4,1 µg/g de selênio). Estes últimos foram preparados a partir de 500 g do fígado de um animal sadio. Após retirada da cápsula e dos tecidos mais fibrosos, o fígado foi homogeneizado em liquidificador, separado em duas amostras (A e B), as quais foram liofilizadas, a seguir pulverizadas em gral de ágata, e condicionadas em frascos herméticos.

A coleta, secagem e homogeneização das amostras de fígado de bovinos foram realizadas segundo a técnica descrita por Moraes et al. (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização dos parâmetros relativos à geração de hidretos

Na técnica de geração de hidretos-AAS, o selênio é separado da matriz por redução do selenito (SeIV) ao seleneto de hidrogênio (H₂Se), e este, sob forma gasosa, é transportado por meio de um gás inerte para a célula de quartzo aquecida, posicionada no caminho óptico do espectrofotômetro de absorção atômica, onde se dá a atomização (Fig. 1). A adição do

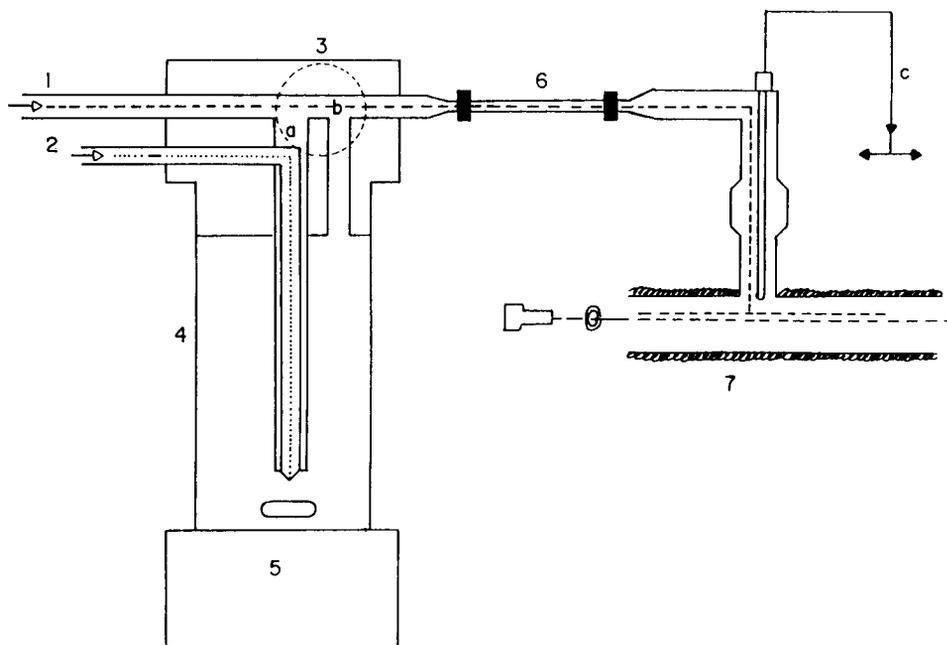


FIG. 1. Esquema do sistema de geração de hidreto utilizado: 1 - entrada do gás de arraste; 2 - entrada da solução de NaBH_4 ; 3 - chave controladora do trajeto do gás: (a) limpeza, (b) medição; 4 - frasco de reação; 5 - agitador; 6 - tubo condutor do hidreto formado e do gás de arraste; 7 - tubo T de quartzo com termômetro sensor.

borohidreto de sódio às soluções acidificadas leva à hidrólise ácida, formando-se hidrogênio muito reativo, que reduz o selenito a seleneto. Parâmetros como o fluxo do gás de arraste, a temperatura da cubeta de quartzo, a acidez do meio, a concentração dos concomitantes e a concentração da solução redutora têm grande influência na sensibilidade, devendo ser investigados. Nas Figs. 2 a 5 estão representadas as influências destes fatores no sinal de absorvância, no sistema utilizado. Estes experimentos foram realizados com padrões aquosos e permitiram a otimização dos parâmetros em questão. Os valores otimizados estão resumidos na Tabela 1.

Digestão das amostras

Vários procedimentos de abertura de material biológico com vistas à determinação de Se são sugeridos na literatura. Agemian & Thompson (1980) recomendam a digestão de cerca de 500 mg de amostra

com mistura dos ácidos nítrico, perclórico e sulfúrico (4:1:1), à temperatura de 190°C , por um período de 12 horas. Koh & Benson (1983) sugerem,

TABELA 1. Parâmetros instrumentais para a determinação de selênio em fígado bovino por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos.

Parâmetros	Especificação
Comprimento de onda (nm)	196,0
Fenda (nm)	0,3
Corrente da lâmpada (mA)	6
Correção de fundo	sim
Voltagem da fotomultiplicadora (v)	425
Fluxo do gás de arraste ($1.\text{min}^{-1}$)	0,5
Concentração do HCl no frasco de reação (M)	1,5
Concentração do redutor (NaBH_4 , g/l em NaOH 0,5 M):	2,5
Volume de solução no frasco de reação (ml)	10
Temperatura da célula de quartzo ($^\circ\text{C}$)	700

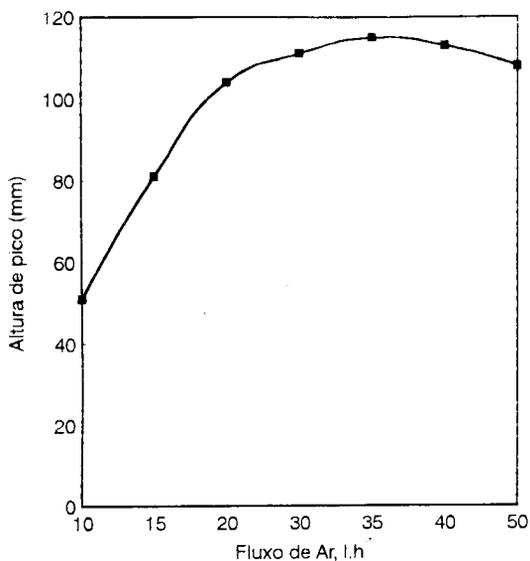


FIG. 2. Variação do sinal de absorvância em função do fluxo do gás de arraste. Massa de selênio: 100 ng; volume no frasco de reação: 10 ml; concentração de HCl no frasco de reação: 0,5 M; concentração da solução de borohidreto em NaOH 0,5%: 3%; temperatura da célula de quartzo: 70°C.

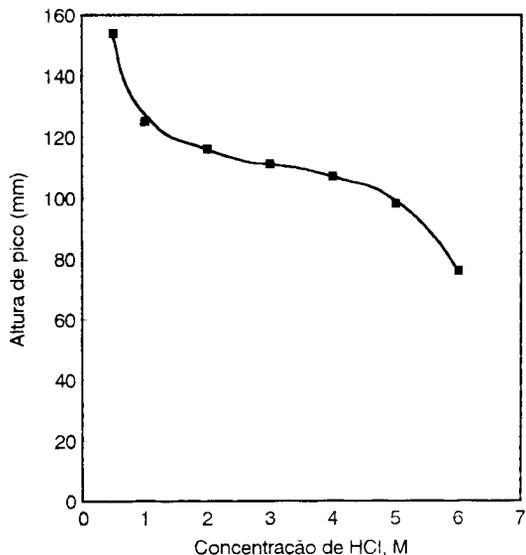


FIG. 4. Variação do sinal de absorvância em função da concentração de HCl no frasco de reação. Massa de selênio, 100 ng. Outros parâmetros, conforme legenda das figuras anteriores.

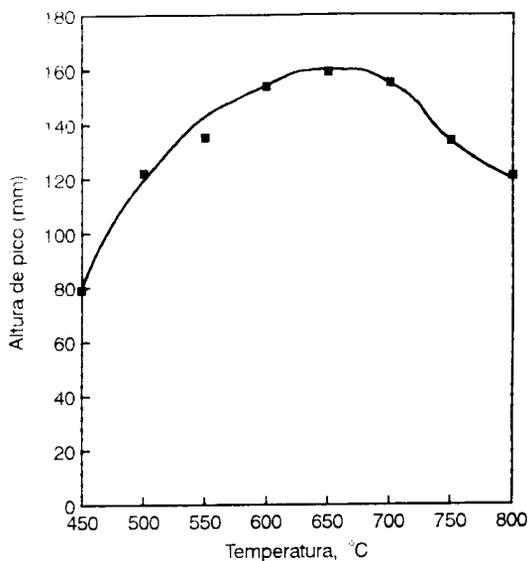


FIG. 3. Variação do sinal de absorvância em função da temperatura do tubo T de quartzo. Massa de selênio: 100 ng; fluxo do gás de arraste: 38 l.h⁻¹. Outros parâmetros conforme legenda da Fig. 2.

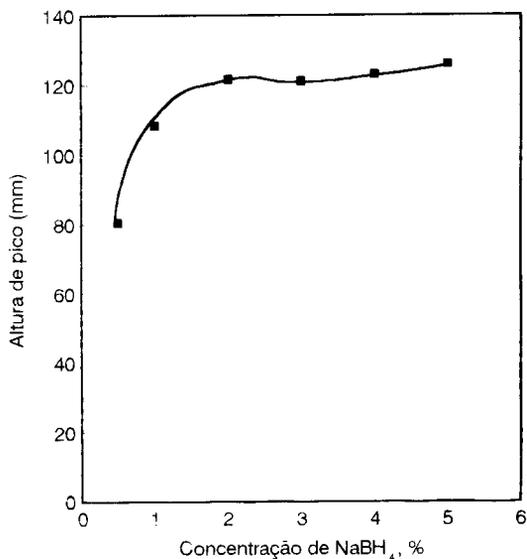


FIG. 5. Variação do sinal de absorvância em função da concentração do redutor NaBH₄. Massa de Se, 100 ng. Outros parâmetros, conforme legendas das figuras anteriores.

para uma massa de 500 mg da amostra, o ataque com uma mistura dos ácidos nítrico e perclórico (4:1) aquecendo-se, após repouso à temperatura ambiente, gradativamente a 210°C, por 12 horas. Já Irsch & Schaefer (1985) recomendam, para um peso de amostra entre 50 e 180 mg, a digestão com uma mistura de ácidos nítrico, clórico e perclórico (7:2:1), aquecendo-se a 120°C (40'), 140°C (60') e finalmente a 180°C (90'). Estes três procedimentos foram aplicados ao tipo de amostra em questão, utilizando-se o material certificado de referência NIST 1577a, bovine liver. Os resultados estão mostrados na Tabela 2. Desta tabela depreende-se que os resultados encontrados não se comparam favoravelmente com o valor certificado. Deve-se observar que estes procedimentos foram aplicados originalmente à análise de tecidos vegetais, sendo que a um deles (Koh & Benson, 1983) seguiu-se a determinação por fluorimetria e não por absorção atômica. Piwonka et al. (1985) sugeriram um procedimento muito próximo ao de Irsch & Schaefer (1985), porém utilizando um programa de aquecimento distinto: 140°C (60'), 180°C (90') e 210°C (15'). Os autores apontam ainda para a necessidade do uso de uma menor massa de amostra para o sucesso da análise. Os resultados encontrados por este procedimento, aplicado ao material certificado NIST 1577a, são também mostrados na Tabela 2 e foram os que apresentaram melhor concordância com o valor

TABELA 2. Determinação de selênio em material de referência NIST 1577a bovine liver(*) encontrados por diferentes procedimentos de digestão.

Procedimento	Massa de amostra (mg)	Fator de diluição	Teor encontrado µg/g
Agemian e Thompson	533	1:10	1,772
	533	1:10	1,281
Koh e Benson	475	1:10	0,314
	475	1:10	0,312
Irsch e Schaefer	233	1:10	0,951
	60	1:10	0,802
Piwonka et al.	13,4	-	0,592
	11,4	-	0,696

* Valor certificado: 0,71 ± 0,071 µg/g.

certificado. Esta influência da massa de amostra na acurácia da determinação de selênio em materiais biológicos por geração de hidretos já havia sido apontada por Raptis et al. (1980).

O procedimento finalmente adotado compreendeu uma síntese dos estudos de Piwonka et al. (1985) e de Raptis et al. (1980): cerca de 10 mg de fígado pulverizado e homogeneizado foram pesados e transferidos para o tubo digestor; 400 µl de ácido nítrico e 40 µl de ácido perclórico foram adicionados lentamente, cobrindo-se os tubos com parafilme e deixando em repouso durante a noite. Após este período, aqueceu-se o bloco digestor até atingir 140°C, após 60 a 70 minutos. Após a retirada dos tubos para resfriamento, foram adicionados mais 500 µl de ácido nítrico e 100 µl de ácido perclórico, aumentando-se gradativamente a temperatura num espaço de tempo de 70 a 90 minutos até atingir 210°C, mantendo-se o conjunto nesta temperatura por 45 minutos. Após este tempo, deixou-se resfriar à temperatura ambiente. Para completa redução de selenato (SeVI) a selenito (SeIV) foi adicionado 1 ml de ácido clorídrico 5 M, aquecido em banho-maria a 95°C, durante 15 minutos, para garantir a completa redução.

Tendo em vista a influência da massa digerida na acurácia da análise, aplicou-se o procedimento de digestão escolhido a diferentes massas de amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 3 e confirmam a necessidade do uso de massas em torno de 10 mg.

É interessante, ainda, observar que Agemian & Thompson (1980) desenvolveram seu procedimento

TABELA 3. Variação do teor de selênio encontrado no material de referência NIST 1577a em função da massa de amostra digerida pelo procedimento adotado.

Massa de amostra (mg)	Teor de Se encontrado (µg/g)	Desvio (%)
73,2	0,27	-62,4
52,4	0,26	-63,3
18,6	0,65	- 9,2
11,7	0,77	+ 8,9
10,1	0,66	- 6,4

para amostras de peixe, uma matriz bem diferente do fígado bovino e que Koh & Benson (1983) sugeriram sua abertura para posterior determinação por fluorimetria, onde os processos de interferência são outros. Assim, o insucesso aqui observado na aplicação destes procedimentos ao sistema fígado bovino - geração de hidretos não está em contradição com os bons resultados relatados por estes autores. O mesmo se aplica ao trabalho de Irsch & Schaeffer (1985), cuja proposta original referia-se a material vegetal, padrões de alimento e sangue.

Com vistas à determinação não só da acurácia, mas também da reprodutibilidade, o procedimento proposto foi aplicado não só ao material certificado de referência NIST 1577a, mas também a padrões laboratoriais e a amostras diversas de fígado bovino. Os resultados estão apresentados na Tabela 4 e mostram, além da excelente concordância entre o valor encontrado e o certificado para o material de referência, uma boa recuperação em relação aos padrões laboratoriais (92%). Os coeficientes de variação foram absolutamente aceitáveis, levando-se em consideração a pequena massa de amostra tomada, o que dá maior peso à questão da homogeneidade da amostra e ao nível de concentração em questão.

O limite de detecção, estimado pela leitura de 10 brancos corridos independentemente, foi de 0,5 ng

($k=3$), o que significa 0,05 mg/kg no tecido animal para amostras de 10 mg.

O limite de detecção alcançado pelo procedimento analítico total responde por completo às necessidades da determinação desejada, uma vez que o teor médio do selênio no fígado bovino é de 1,1 $\mu\text{g/g}$ na matéria seca (Doyle & Spaulding, 1978) e a variação normal vai de 0,1 a 1,1 $\mu\text{g/g}$, segundo Fraser & Reid (1977).

O procedimento de abertura, embora consuma um tempo razoável, é bastante simples e acessível, uma vez que não requer o uso de sistemas fechados. Mas, por se trabalhar em sistema aberto, o risco de contaminação ou perda faz-se presente durante a abertura. A boa concordância entre o valor encontrado e o certificado para o material de referência estudado indica que estes problemas puderam ser satisfatoriamente contornados.

A boa reprodutibilidade na análise de amostras reais confirma a boa homogeneização das amostras assim como a aplicabilidade do método.

A precisão encontrada compara-se com a relatada como associada à técnica de geração de hidretos na análise de material biológico, conforme a International Atomic Energy Agency (1980).

A pequena massa de amostra tomada certamente contribui para o aumento da dispersão dos resultados e também restringe o limite de detecção alcançável, sem prejuízo, porém, para a análise em questão. A interferência causada pela presença de excesso de matriz poderia ser minimizada realizando-se os estudos de otimização dos parâmetros instrumentais na presença da matriz. De acordo com Meyer et al. (1979), o concomitante que mais interfere é o cobre, e é possível que esta interferência possa ser minorada pelo aumento da concentração de HCl no frasco de reação. É possível também que bons resultados possam vir a ser alcançados com todos os tipos de digestão citados na Tabela 2, desde que a massa de amostra venha a ser menor. Estudo realizado por Raptis et al. (1980) já mostrava que as concentrações de selênio encontradas em materiais biológicos de referência (IAEA e NIST) melhor reproduziam os valores certificados quando se utilizavam amostras de peso reduzido.

TABELA 4. Teores de selênio encontrados em material certificado NIST 1577a, padrões laboratoriais e amostras diversas pelo procedimento de digestão otimizado.

Amostra	n	Massa \pm s (mg)	Teor de Se \pm s ($\mu\text{g/g}$)	Coeficiente de variação (%)
NIST 1577a	10	9,75 \pm 2,07	0,71 \pm 0,07	9,9
Padrão A	10	12,98 \pm 2,63	0,30 \pm 0,04	12,5
Padrão B	10	13,22 \pm 2,71	3,97 \pm 0,27	6,8
2693	4	11,47 \pm 1,11	0,28 \pm 0,04	15,1
2724	4	12,97 \pm 1,38	0,65 \pm 0,09	13,4
2738	4	13,92 \pm 1,90	0,42 \pm 0,02	5,7
2743	4	13,75 \pm 1,89	0,54 \pm 0,11	19,9
2748	4	12,85 \pm 0,95	0,48 \pm 0,01	2,9

CONCLUSÕES

1. O procedimento de abertura da amostra de fígado bovino para a dosagem de selênio é simples e acessível, quando as condições limitantes estão sob controle.

2. A análise das amostras reais mostrou boa reprodutibilidade, confirmando a boa homogeneização das amostras e a aplicabilidade da metodologia nas análises de rotina.

3. A precisão encontrada assegura a sua sensibilidade em diagnosticar níveis deficientes de selênio no fígado, comparando-se com aquelas encontradas na literatura para outros tipos de amostras.

REFERÊNCIAS

- AGEMIAN, H.; THOMPSON, R. Simple semi-automated atomic-absorption spectrometric method for the determination of arsenic and selenium in fish tissue. *Analyst*, v.105, p.902-907, 1980.
- COX, D.H.; BIBB, R. Hydrogen selenide evolution-electrothermal atomic absorption method for determining nanogram levels of total selenium. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.64, p.265-269, 1981.
- DOYLE, J.J.; SPAULDING, J.E. Toxic and essential trace elements in meats. A review. *Journal of Animal Science*, v.47, p.398-419, 1978.
- FRASER, A.J.; REID, T.C. Trace element diseases in animals in New Zealand - A veterinary diagnostic laboratory viewpoint. In: TRACE elements in human and animal health and disease in New Zealand. Hamilton: Waikato University Press, 1977. p.20-38.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (Vienna, Áustria). **Elemental analysis of biological materials - current problems and techniques with special reference to trace elements**. Viena, 1980. p.351-366. (IAEA. Technical Reports, 197).
- IRSCH, B.; SCHAEFER, K. Nassverraschung von Proben pflanzlicher und Herkunft fuer die vergleichende Bestimmung Selen mit dem Hydrid-AAS-Verfahren. *Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, v.320, p.37-40, 1985.
- KOH, T.S.; BENSON, T.H. Critical re-appraisal of fluorometric method for determination of selenium in biological materials. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v.66, n.4, p.918-926, 1983.
- MEYER, A.; HOFER, C.H.; TOELG, G.; RAPTIS, J.; KNAPP, G. Elementverstoerungen bei des spurenanalytischen Selen-Bestimmung nach dem Hydrid-AAS-Verfahren. *Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, v.296, p.337-344, 1979.
- MORAES, S.S.; SILVA, G.N.; DÖBEREINER, J. Microelementos minerais e a "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.4, p.25-33, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Beef Cattle Nutrition (Washington, D.C.). **Nutrient requirements of beef cattle**. 6.ed. Washington: National Academic Press, 1984. 90p. (Nutrient requirements of domestic animals).
- PIWONKA, J.; KAISER, G.; TOELG, G. Determination of selenium at ng/g and pg/g levels by hydride generation-atomic absorption spectrometry in biotic materials. *Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, v.321, p.225-234, 1985.
- RAPTIS, S.E.; KAISER, G.; TOELG, G. A survey of selenium in the environment and a critical review of its determination at trace levels. *Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, v.316, p.105-123, 1983.
- RAPTIS, S.E.; KNAPP, G.; MEYER, A.; TOELG, G. Systematische Fehler bei der Selenbestimmung in ng/g Bereich in biologischen Matrices nach dem Hydrid-AAS Verfahren. *Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, v.300, p.18-21, 1980.