

Avaliação dos principais parâmetros que afetam a precisão do método HPLC-ICP-MS para determinação de selenometionina em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Evaluation of the main parameters that affect the HPLC-ICP-MS method precision to determine selenomethionine in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

Lilian da Silva¹, Rosana Barreto Pinto¹, Marcelo D. Almeida¹ e Márcia Silva da Rocha¹.

¹ Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

E-mail: msrocha@inmetro.gov.br

Resumo: O selênio é um micronutriente essencial e sua ingestão tem sido cada vez mais incentivada. Porém, a falta de controle na produção e comercialização tem preocupado os Órgãos Governamentais, uma vez que casos de envenenamento têm sido reportados na literatura. Sendo assim, este trabalho objetiva reduzir a incerteza da medição na determinação de selenometionina (SeMet) em levedura por HPLC-ICP-MS. O método foi desenvolvido e validado. A investigação das variáveis que afetam a precisão do método (procedimento de extração e instrumental) possibilitou a redução da incerteza em até 78%.

Palavras-chave: selenometionina, levedura e HPLC-ICP-MS

Abstract: Selenium is an essential micronutrient and its intake is recommended. The cases of poisoning reported in the literature, caused by the lack of control in the production, are a concern among the Governmental Agencies. This work aimed to reduce the measurement uncertainty of selenomethionine (SeMet) mass fraction determined in yeast by HPLC-ICP-MS. The method was developed and validated. The precision study (extraction procedure and instrumental) reduced the method uncertainty in 78 %.

Keywords: selenomethionine, yeast and HPLC-ICP-MS

1. INTRODUÇÃO

O selênio é um micronutriente essencial, uma vez que participa de diversos processos biológicos no organismo [1]; atua como agente antioxidante contra alterações oxidativas de lipídeos, proteínas e DNA por intermédio da glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase [2].

Em concentrações adequadas, o selênio é um elemento traço essencial. Porém, quando sua ingestão é superior a capacidade de absorção e excreção do organismo, o selênio pode tornar-se tóxico, sendo estreita a faixa entre a essencialidade e toxicidade. A deficiência de selênio no organismo tem sido associada a algumas doenças, tais como as Doenças de Keshan (cardiomeopatia)

e Kaschin-Beck (osteoartrópata), que ocorreram em áreas da China onde o solo é pobre nesse elemento [3].

Devido aos efeitos benéficos no organismo e as baixas concentrações encontradas na dieta de alguns países, a ingestão de selênio tem sido cada vez mais incentivada, seja pelo consumo de alimentos naturalmente ricos em selênio, seja pelo consumo de alimentos previamente enriquecidos ou pelo uso de suplementos alimentares na dieta (leveduras selenizadas, por exemplo) [4-6].

Porém, a falta de controle na produção e comercialização de suplementos alimentares tem preocupado os Órgãos Governamentais. Com relação ao selênio, vários casos de envenenamento estão descritos na literatura devido a suplementos mal formulados, contendo concentrações de selênio maiores que as descritas no rótulo [7-8].

Embora essencial, garantir a segurança de um alimento não é tarefa simples. Para isso, é necessário utilizar um sistema de medição e métodos de amostragem robustos e validados, materiais de referência certificados (MRCs), analistas especializados, métodos sistemáticos para avaliar a incerteza de medição, estabelecimento da cadeia de rastreabilidade, dentre outros [9]. Para desenvolver um sistema de medição com estas características, a cromatografia em fase reversa com pareamento iônico foi acoplada ao ICP-MS para determinação de selenometionina em levedura, candidata a MRC. Os parâmetros que afetam a repetibilidade da extração e do acoplamento HPLC-ICP-MS foram investigados, e seu desempenho avaliado mediante incerteza de medição.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentação

-Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência HPLC (Flexar, PerkinElmer, USA).

-Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer, USA). Software de especiação Chromera® (versão 4.0).

-Bomba peristáltica modelo Miniplus III (Gilson, França) e válvula Rheodyne modelo EV750-100-S2 (Cetac, Estados Unidos).

-Shaker NT 712 (Nova Ética, Brasil).

2.2. Métodos

A extração da SeMet foi realizada mediante a suspensão de 0,25 g de amostra em 5 mL de solução de protease (4 mg g⁻¹) e lipase (2 mg g⁻¹). As amostras foram incubadas em shaker (200 rpm, 16 h, 37 °C). Após, foram centrifugadas (2489 g por 30 min) e filtradas (0,45 µm). As condições instrumentais encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Condições instrumentais HPLC-ICP-MS [10] com algumas modificações.

HPLC	
Coluna analítica C18 Luna, Phenomenex	150 mm x 2 mm x 3 µm
Coluna de guarda C18; Phenomenex	4 mm x 2 mm
Fase móvel	TBAOH (0,05 mmol L ⁻¹); NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,5 mmol L ⁻¹); ACN (1 %)
Modo de eluição	Isocrático
Vazão da fase móvel	0,20 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Temperatura da coluna	35 °C
Interface	
Vazão do make-up	1,3 mL min ⁻¹
Padrão interno	Rh; 0,5 µg kg ⁻¹
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
ICP-MS	
Potência de RF	1350 W
Vazão do gás nebulizador	0,96 L min ⁻¹
Vazão do gás principal	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1 L min ⁻¹
Scan mode, Sweep	Peak-hopping, 1
Readings, Replicatas	3183, 1
Dwell time (ms)	250
Modo de operação detector	Dual
Isótopo monitorado	⁸² Se
Aquisição de sinal	Área de pico

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento de extração e as condições do acoplamento HPLC-ICP-MS são fatores que impactam a precisão do método usado na determinação da SeMet em levedura.

A precisão do **procedimento de extração (shaker)** em função das posições (figura 1) foi avaliada submetendo as amostras à extração. Observou-se menor variação da concentração de SeMet (n=12) para as amostras colocadas nas posições que possuem eficiências de extração de 81 % a 84 %, variando de 3115 mg kg⁻¹ a 3478 mg kg⁻¹ (RSD de 3,8 %).

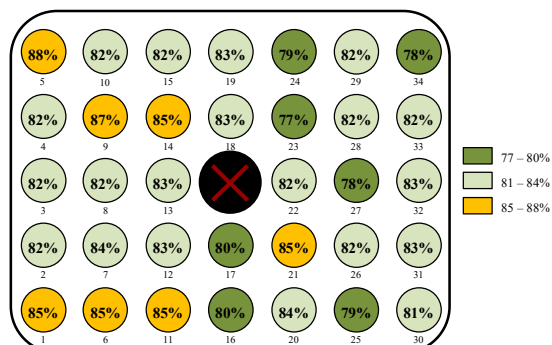


Figura 1 – Eficiência de extração das amostras em função das posições no *shaker*, n=7.

As variáveis instrumentais que afetam a precisão do acoplamento HPLC-ICP-MS foram otimizadas (figura 2). A precisão do método foi estimado como o RSD da área do pico para 6 injeções da solução padrão de SeMet (300 µg kg⁻¹), totalizando 12 experimentos. As variáveis instrumentais investigadas e selecionadas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis utilizadas na avaliação da precisão instrumental

Parâmetros	Varáveis	Selecionados
Volume de injeção	5 – 20 (µL)	10
Isótopos	⁷⁷ Se ⁸² Se; ⁸⁰ Se;	⁸² Se;
Uso do DRC	Sim, Não	Não
Vazão do <i>make-up</i>	0,6 - 1,5 (mL min ⁻¹)	1,3
Câmara de nebulização	<i>Iso Mist</i> , ciclônica	ciclônica
Nebulizador	<i>Mira Mist</i> , <i>Meinhard</i>	<i>Meinhard</i>
RSD (%)	1,4 – 8,9	0,8

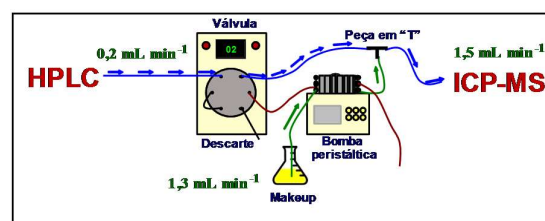


Figura 2 – Acoplamento HPLC-ICP-MS

A Figura 3 apresenta um cromatograma típico da amostra (2 mg kg⁻¹) nas condições selecionadas.

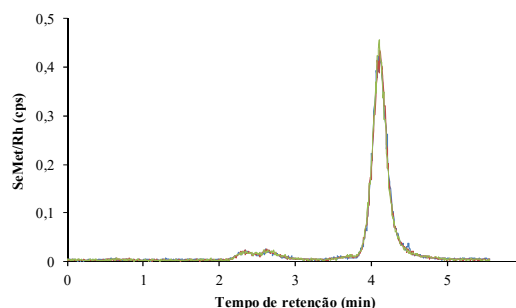


Figura 3 – Cromatograma HPLC-ICP-MS, n = 3

As incertezas de medição para o experimento selecionado (Experimento 12, parâmetros selecionados da Tabela 2) e para as condições iniciais (Experimento 1, 5µL, 3 isótopos, DRC, *make-up*: 1,3mL, *Isomist*, *Miramist*) estão na figura 4.

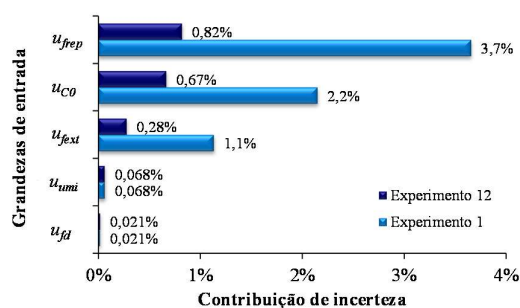


Figura 4 - Incertezas de medição associadas a: u_{frep} : repetibilidade instrumental; u_{CO} : concentração de SeMet na solução analítica; u_{ext} : extração da amostra; u_{umi} : umidade e u_{dil} : diluição da amostra.

O estudo dos parâmetros instrumentais reduziu a incerteza da repetibilidade (u_{frep}) de 3,7 % para 0,82 %, representando uma redução de 78 %. Com exceção das fontes de incerteza associadas à umidade (u_{umi}) e à diluição da amostra (u_{dil}), as quais não estão relacionadas com a instrumentação HPLC-ICP-MS, todas as demais incertezas foram reduzidas.

O limite de quantificação (LQ) nas condições selecionadas utilizando o isótopo ^{82}Se foi de $99 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4. CONCLUSÕES

A metodologia HPLC-ICP-MS foi otimizada e validada para futura produção do MRC de selênio e selenometionina em levedura.

A extração de SeMet em função das posições do *shaker* e o estudo do acoplamento permitiu reduzir a variabilidade da metodologia em até 78%,

o que contribuiu para aumentar a confiabilidade dos resultados do acoplamento, que já estão sendo utilizados para a produção do MRC.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Rayman M P 2000 *The Lancet* **356** 233.
- [2] Almondes K G S, Leal G V S, Cozzolino S M F, Philippi S T e Rondó P H C *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2010 **56** 484.
- [3] Ge K e Yang G *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* 1993 **57** 259S.
- [4] Thiry C e Ruttens A, Temmerman L D, Schneider Y e Pussemier L *Food Chemistry* **130** 767.
- [5] Dumont E, Vanhaecke F e Cornelis R *Anal. Bioanal. Chem.* 2006 **385** 1304.
- [6] Mounicou S, Szpunar J e Lobinski R *Chem. Soc. Rev.* 2009 **38** 1119.
- [7] Aldosary B M, Sutter M E, Schwartz M e Morgan B W *Clinical Toxicology* 2012 **50** 57.
- [8] MacFarquhar J K, Broussard D L, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C, Burk R F, Dunn J R, Green A L, Hammond R e Schaffner W, Jones T F *Arch. Intern. Med.* 2010 **170** 256.
- [9] Iyengar V J *Radioanal. Nucl. Chem.* 2013 **297** 451.
- [10] Silva L, Souza J R, Sánchez M L F, Araújo T O e Rocha M S *Br. J. Anal. Chem.* 2013 **12** 499.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsas. Processo Prometro 563105/2010-0.