

DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM MATERIAIS BIOLÓGICOS POR ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS - COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE O USO DO ^{77m}Se ($t_{1/2} = 17,45\text{s}$) E ^{75}Se ($t_{1/2} = 119,8\text{d}$)

Marília G. M. Catharino e Marina B. A. Vasconcellos

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Av. Lineu Prestes 2.242
05508-000 Butantã, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Atualmente, o selênio é considerado como um elemento traço essencial na dieta humana. O papel bioquímico mais estudado desse elemento está ligado à sua participação na composição da enzima glutatona peroxidase. Essa enzima age como antioxidante para os radicais livres formados no organismo. No presente trabalho o selênio foi determinado em materiais de referência ("Human Hair" IAEA-085, "Human Hair" IAEA-086, "Dogfish Liver" DOLT-1 e "Dogfish Muscle" DORM-1) em amostras de unhas e suplemento vitamínico, por meio do radioisótopo ^{77m}Se (método desenvolvido). Foi utilizado também o radioisótopo ^{75}Se (método usual) para uma comparação entre os resultados obtidos. Foi aplicado um teste estatístico para a comparação entre os valores obtidos usando os dois radioisótopos. Verificou-se que as concentrações médias de selênio, nos materiais de referência e amostras, por meio dos radioisótopos ^{77m}Se e ^{75}Se não diferem estatisticamente a um nível de significância de 0,05. Isso indica que o uso do radioisótopo de meia-vida curta ^{77m}Se em AANI é bastante aplicável às matrizes estudadas.

Keywords: selenium, biological materials, INAA

I. INTRODUÇÃO

O interesse no selênio concentrou-se inicialmente na sua toxicidade, pois o envenenamento por selênio foi identificado em animais que pastavam em terras com altos níveis deste elemento. Mas foi em 1957 que um papel positivo foi identificado quando o selênio foi evidenciado como protetor de danos provocados a ratos deficientes em vitamina E contra necrose do fígado e perda capilar[1].

Alguns anos mais tarde, em 1973, o papel bioquímico do selênio foi parcialmente esclarecido, quando descobriu-se que a glutatona peroxidase GSH-Px era uma selenoenzima e era considerada a principal forma ativa do selênio nos tecidos.

Mais recentemente, os papéis bioquímicos e fisiológicos para o selênio não associados com esta enzima foram identificados. O selênio está presente no organismo como selenometionina ou selenocisteína nas proteínas. A glutatona peroxidase celular cGSH-Px é encontrada em quase todas as células. É na realidade uma família de proteínas e mais provavelmente representa uma reserva de selênio. A glutatona peroxidase extracelular eGSH-Px está presente no leite e no plasma. A glutatona peroxidase hidropéroxido fosfolipídeo phGSH-Px tem uma distribuição

diferente da cGSH-Px, age na regulação do ácido araquidônico e peroxidação dos lipídeos[1].

Nos últimos 15 anos, o reconhecimento da importância do selênio no metabolismo cresceu quando foi provado que uma cardiomiopatia fatal, proveniente de deficiências de selênio na dieta, a chamada doença de Keshan, poderia ser prevenida com a suplementação de selênio[2].

Atualmente, considera-se que o selênio é um elemento traço essencial na dieta humana. O papel bioquímico mais estudado do selênio é a sua participação na formação da enzima glutatona peroxidase[3]. Esta enzima, presente no citosol e na matriz das mitocôndrias, é formada por quatro subunidades idênticas, cada uma contendo um átomo de selênio na forma de selenocisteína. As funções metabólicas da selenoenzima são vitais para a célula, como parte do mecanismo responsável pela detoxificação do oxigênio no organismo. Em outras palavras essa enzima age como antioxidante para os radicais livres formados.

Um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres, envolve a enzima glutatona peroxidase, entre outras. A deficiência de selênio no organismo provoca uma diminuição na atividade dessa enzima, mas com o suplemento de selênio essa atividade pode ser normalizada.

A análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) é um dos métodos analíticos que têm sido bastante aplicados para a análise de selênio, ao lado de outros, como AAS, ICP-AES e ICP-MS.

O radioisótopo mais utilizado, em AANI, para as análises de selênio é o ^{75}Se , que possui uma meia-vida longa, de 119,8 dias. O uso do radionuclídeo ^{75}Se permite boas determinações de selênio, mas requer irradiações longas, sob altos fluxos de nêutrons, assim como longos tempos de contagem e decaimento, o que pode levar a um tempo de análise total de duas a três semanas.

Uma outra alternativa para a determinação de selênio, por AANI é a utilização do radioisótopo $^{77\text{m}}\text{Se}$ de meia-vida curta, 17,45s. A utilização deste radioisótopo para a determinação de selênio é bastante rápida reduzindo assim consideravelmente o tempo de análise, porém a sua utilização requer muita atenção nos seguintes parâmetros: tempo de irradiação e principalmente tempo de decaimento, devido a meia-vida do radioisótopo ser muito curta.

No presente trabalho, o teor de selênio foi determinado por AANI, por meio do radioisótopo de meia-vida curta $^{77\text{m}}\text{Se}$. O radioisótopo de meia-vida longa ^{75}Se foi utilizado para avaliar os resultados obtidos por irradiações curtas, uma vez que o método utilizando este radioisótopo já está validado. O selênio foi determinado em materiais de referência de cabelos e peixes (“Human hair” IAEA-085, “Human hair” IAEA-086, “Dogfish Liver” DOLT-1 e “Dogfish Muscle” DORM-1) e em amostras de unhas e suplemento vitamínico.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Materiais de Referência. A Tabela 1 apresenta os materiais de referência que foram utilizados para a otimização do método para a análise de selênio, por meio do radioisótopo $^{77\text{m}}\text{Se}$.

TABELA 1. Materiais de referência

Material de Referência	Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$)
“Human Hair” IAEA-085	1,07 ^a (0,96-1,17)
“Human Hair” IAEA-086	1,0 ^a (0,8-1,2)
“Dogfish Liver” DOLT-1	7,34±0,42 ^b
“Dogfish Muscle” DORM-1	1,62±0,12 ^b

a. Valores informativos

b. Valores certificados

Determinação de Se nos Materiais de Referência. Para a otimização do método proposto, primeiramente foram analisados os materiais de referência afim de se obter a exatidão e precisão do procedimento analítico

desenvolvido. As condições adotadas para a análise de selênio nos materiais de referência IAEA-085 e IAEA-086 foram as seguintes: para cada material de referência irradiou-se, no reator IEA-R1, por seis vezes a mesma alíquota de cerca de 200 mg da amostra, por um período de 30 segundos e sob um fluxo de nêutrons térmicos de $0,5 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Juntamente com o material de referência foi irradiada uma alíquota do padrão de selênio pipetado sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 40.

Para a análise dos materiais de referência DOLT-1 e DORM-1 as condições foram as mesmas, porém o tempo de irradiação foi de 15 segundos. Essa variação do tempo de irradiação ocorre devido à composição do material de referência que está sendo analisado.

Imediatamente após a irradiação, as atividades do padrão e do material de referência foram medidas, por 90 segundos cada, em um espectrômetro de raios gama constituído de um detector de germânio hiperpuro CANBERRA modelo GX2020, acoplado a um sistema multicanal e eletrônica associada, também da mesma marca CANBERRA. Ao término da medida das atividades os espectros foram analisados por um programa chamado VERSÃO 2, que fornece as energias da radiação gama dos radioisótopos de interesse e as respectivas áreas dos picos. A energia da radiação gama foi de 161,9 keV. Por fim a concentração de selênio foi calculada usando-se o programa PAKI, desenvolvido no Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN.

Para as irradiações longas, o procedimento analítico já estava estabelecido. Cerca de 200 mg do material de referência e padrão de selênio foram irradiados no reator IEA-R1 por um período de 8 horas, sob um fluxo de nêutrons térmicos de aproximadamente $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após um período de decaimento de 15 dias, as atividades do padrão e do material de referência foram medidas, por 50000 segundos cada, no mesmo sistema de espectrometria gama. A energia da radiação gama foi de 264 keV.

A concentração de selênio foi calculada usando-se o programa ESPECTRO.

Determinação de Se nas Amostras. As amostras de unhas foram coletadas de indivíduos saudáveis, pertencentes a funcionários e estagiários da Supervisão de Radioquímica do IPEN, dentistas, professores e outros. A coleta das amostras de unhas foi feita de todos os dedos dos pés, utilizando-se cortador de unha ou tesouras de aço inox. As amostras de unhas foram cortadas em segmentos menores, e a seguir foram lavadas de acordo com o protocolo recomendado pela IAEA[4]. Para as irradiações curtas, cada amostra de unha foi irradiada, no reator IEA-R1, por duas vezes a mesma alíquota de cerca de 200 mg da amostra, por um período de 20 segundos e sob um fluxo de nêutrons térmicos de $0,5 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Juntamente com a amostra foi irradiada uma alíquota do padrão de selênio. As contagens das atividades, análises dos espectros gama e cálculo da concentração foram procedidas da mesma forma que os materiais de referência, já citadas anteriormente.

Para as análises de selênio por meio de irradiações curtas nas amostras de suplemento vitamínico, primeiramente foram selecionados aleatoriamente dez

comprimidos de um frasco contendo cem unidades da marca Vitamin World. Após a seleção dos comprimidos estes foram pesados um a um, a fim de se obter a massa individual, já que o objetivo dessa análise é determinar a massa de selênio por comprimido. Ao término da pesagem os comprimidos foram triturados e homogeneizados um a um em almofariz de ágata, previamente limpo com ácido nítrico 10% e água destilada. Cada comprimido foi dividido em duas partes de cerca de 200 mg, para se obter resultados em duplicata. Foram feitas irradiações, no reator IEA - R1 por um período de 20 segundos e sob um fluxo de nêutrons térmicos de $0,5 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para cada uma das alíquotas. Juntamente com a amostra foi irradiada uma alíquota do padrão de selênio. As contagens das atividades, análises dos espectros gama e cálculo da concentração foram procedidas da mesma forma que os materiais de referência, já descrita anteriormente.

Para a determinação do teor de selênio, nas amostras, utilizando-se irradiações longas o procedimento analítico foi o mesmo utilizado para as análises de selênio nos materiais de referência, já citado anteriormente.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 apresenta as concentrações médias para o teor de selênio ($\mu\text{g g}^{-1}$), limite de detecção (LD, $\mu\text{g g}^{-1}$) e erro relativo (Er, %) nos materiais de referência, obtidos por meio dos radioisótopos $^{77\text{m}}\text{Se}$ e ^{75}Se .

TABELA 2. Resumo dos Resultados Obtidos para Concentração de Selênio nos Materiais de Referência Analisados

Materiais de referência	Conc. Se ($^{77\text{m}}\text{Se}$)		Conc. Se (^{75}Se)		Er	LD
	Conc.	Er	Conc.	Er		
IAEA-085	1,05±0,08	1,9	1,06±0,05	0,9	0,1	0,2
IAEA-086	1,04±0,16	4,0	1,16±0,10	16	0,1	0,3
DOLT-1	7,68±0,83	4,6	7,23±0,41	1,5	0,2	1,0
DORM-1	1,58±0,10	2,5	1,66±0,05	2,5	0,3	0,9

De acordo com os resultados apresentados acima podemos observar que para os quatro materiais de referência analisados, por meio de irradiações curtas, os resultados mostraram-se bastante adequados, apresentando erros relativos de até 4,6% e desvios padrão relativos de até 15%. Esses resultados foram comparados com os resultados obtidos por meio de irradiações longas (método usual), e verificou-se que a exatidão e a precisão do método desenvolvido por meio de irradiações curtas ($^{77\text{m}}\text{Se}$) é tão boa quanto a do método usual (^{75}Se), onde os erros relativos foram de até 16% e desvios padrão relativos foram de até 8,6%. Pode-se observar também que os limites de detecção alcançados, para todos os materiais de referência utilizados, foram menores quando se usou o radioisótopo de meia-vida longa ^{75}Se .

Para compararmos os métodos utilizados na determinação do teor de selênio foi utilizado o teste t de

student[5]. O teste t foi aplicado para verificar se as médias obtidas por meio de irradiação curta (método desenvolvido) e irradiação longa diferem ou não significativamente. Para isto o valor de $t_{\text{calculado}}$ deve ser menor do que o t_{tabelado} . Para proceder ao teste t primeiramente verificou-se se as variâncias S_x^2 e S_y^2 não diferem a um nível de significância de 0,05 uma da outra com (n_1-1) e (n_2-1) graus de liberdade, e para isto foi utilizado o teste F[6]. Após verificada a igualdade das variâncias ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) o teste t foi aplicado.

A tabela 3 apresenta os valores da aplicação dos critérios estatísticos utilizados para a comparação das médias para o teor de selênio nos materiais de referência analisados.

TABELA 3. Valores de F e t Calculados para as Concentrações Médias de Selênio ($\mu\text{g g}^{-1}$) Obtidas para os Materiais de Referência

Material de referência	Conc. Média		Variância		F		t	
	$^{77\text{m}}\text{Se}$	^{75}Se	$^{77\text{m}}\text{Se}$	^{75}Se	F_{calc}	F_{tab}	t_{calc}	t_{tab}
IAEA-085	1,05	1,06	0,0068	0,0029	2,34	5,05	0,21	1,81
IAEA-086	1,04	1,16	0,02483	0,00943	2,63	5,05	1,59	1,81
DOLT-1	7,68	7,23	0,6925	0,16586	4,18	5,05	1,18	1,81
DORM-1	1,58	1,66	0,00904	0,003	3,01	5,05	1,78	1,81

De acordo com a tabela acima as concentrações médias de selênio obtidas pelos dois métodos empregados para todos os materiais de referência analisados podem ser consideradas estatisticamente iguais a um nível de significância de 0,05, pois os valores de $t_{\text{calculados}} < t_{\text{tabelados}}$ [7]. Após a certificação do método este foi aplicado para a análise das amostras de unhas e suplementos vitamínicos. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas a seguir.

TABELA 4. Resultados das Análises de Selênio nas Amostras de Unhas, pelo Método de Análise por Ativação com Nêutrons - Radioisótopos $^{77\text{m}}\text{Se}$ e ^{75}Se

Amostra	Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) ($^{77\text{m}}\text{Se}$)	Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) (^{75}Se)
U1	0,59±0,05	0,50±0,04
U2	0,487±0,004	0,51±0,04
U3	0,403±0,001	0,45±0,01
U4	0,42±0,05	0,44±0,01
U5	0,45±0,02	0,44±0,01
U6	0,66±0,02	0,61±0,03

Comparando os resultados obtidos para o teor de selênio nas amostras de unhas, por meio do método de AANI utilizando-se o radioisótopo de meia-vida curta com os resultados obtidos por meio de irradiações longas

podemos dizer que o método utilizado é bastante aplicável nessa matriz. Esses resultados foram confirmados aplicando-se o teste t apresentado na tabela 5.

TABELA 5. Valores de F e t Calculados para as Concentrações Médias de Selênio ($\mu\text{g g}^{-1}$) Obtidas para as Amostras de Unhas

Matriz	Conc. Média		Variância		F		t	
	^{77m}Se	^{75}Se	^{77m}Se	^{75}Se	F_{calc}	F_{tab}	t_{calc}	t_{tab}
Unhas	0,50	0,49	0,01043	0,0043	2,42	5,05	0,20	1,81

De acordo com a tabela acima as concentrações médias de selênio obtidas pelos dois métodos empregados nas amostras de unhas podem ser consideradas estatisticamente iguais a um nível de significância de 0,05, pois os valores de t calculados são menores do que os tabelados, confirmando assim a aplicabilidade do método desenvolvido para esse tipo de matriz.

A tabela 6 apresenta os resultados das análise de selênio no suplemento vitamínico.

TABELA 6. Resultados das Análises de Selênio em Suplemento Vitamínico Contendo Selênio, pelo Método de Análise por Ativação com Nêutrons

Massa média Se/comprimido (μg) (^{77m}Se)	Massa média Se/comprimido (μg) (^{75}Se)	Massa Se/comprimido (μg) (Fabricante)
190,4 \pm 9,6	187,4 \pm 9,0	200

Os resultados obtidos para selênio nas amostras de suplemento vitamínico apresentaram uma diferença percentual do valor declarado pelo fabricante de 4,8 e 6,3 para o método por meio de irradiação curta e irradiação longa, respectivamente. A tabela abaixo apresenta os valores de F e t calculados para as concentrações médias de selênio nas amostras de suplemento vitamínico.

TABELA 7. Valores de F e t Calculados para as Concentrações Médias de Selênio ($\mu\text{g g}^{-1}$) Obtidas para as Amostras de Suplemento Vitamínico

Matriz	Conc. Média		Variância		F		t	
	^{77m}Se	^{75}Se	^{77m}Se	^{75}Se	F_{calc}	F_{tab}	t_{calc}	t_{tab}
S. Vit.	190,4	187,4	91,34011	81,35289	1,12	3,18	0,72	1,73

As concentrações médias de selênio obtidas nessa matriz, por meio de irradiação curta e longa, podem ser consideradas estatisticamente iguais, a um nível de

significância de 0,05, de acordo com o teste t aplicado, confirmando assim a aplicabilidade do método desenvolvido (^{77m}Se).

IV. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, por meio de irradiação curta, para o teor de selênio nos materiais de referência podem ser considerados adequados demonstrando a aplicabilidade do método desenvolvido, bem como para as amostras estudadas.

Com isso o método estabelecido torna-se bastante competitivo em relação a outros métodos analíticos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] Mahan, L. K. and S. Escott-Stump, **Krause: Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**, Roca, São Paulo, 1998.
- [2] ZHANG, W., CHATT, A. A quality assurance programme for the determination of selenium in food by instrumental activation analysis. In: **International Symposium Harmonization of Health-Related Environmental Measurements Using Nuclear and Isotopic Techniques**, November 4-7, 1996, Hyderabad, India. Proceedings... Viena: IAEA, 1997, p. 421-433.
- [3] TADJIKI, S., ERTEN, H. N., ERTEN, J. **Instrumental Neutron Activation Analysis of Blood Serum**, J. Radioanal. Nucl. Chem., Letters, v. 199, n. 4, p. 309-316, 1995.
- [4] IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Reference Methods for Marine Pollution Studies**, Vienna: 1987, IAEA, (IAEA-MEL-46).
- [5] Triola, M. F., **Introdução à Estatística**, LTC Editora, Rio de Janeiro, 1999.
- [6] Vieira, S., **Introdução à Bioestatística**, Campus, Rio de Janeiro, 1997.
- [7] Spiegel, M. R., **Estatística**, Makron Books, São Paulo, 1993.

ABSTRACT

Selenium is nowadays considered to be an essential trace element in human diet. The most extensively studied

biochemical role of this element is related to its participation in the composition of glutathione peroxidase. This enzyme acts as an antioxidant for the free radicals formed in the human body. In the present work, selenium was determined by INAA in reference materials (“Human hair” IAEA-085, “Human hair” IAEA-086, “Dogfish Liver” DOLT-1 e “Dogfish Muscle” DORM-1) and in toenails and vitamin supplement, using the short-lived radioisotope ^{77m}Se . The usual method, which utilizes long-lived ^{75}Se , was also employed, in order to make a comparative study. A statistical test was applied for this comparison. It was verified that the average concentrations of selenium, in the reference materials and in the samples analyzed, do not differ statistically at a significance level of 0.05, which indicates the applicability of the short-lived ^{77m}Se for INAA of the matrixes studied.