



## Especificação de Se em sangue bovino empregando HPLC-UV-HG-ICP OES: avaliação de reação enzimática no preparo da amostra.

Gian P. G. Freschi<sup>1,2\*</sup>, Ana R. A. Nogueira<sup>2</sup>

*gianfreschi@ufgd.edu.br*

1. Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, PO Box 332, 79.825-070, Dourados-MS, Brazil. 2. Embrapa Pecuária Sudeste, P.O. Box 339, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

A especificação de selênio em amostras clínicas é essencial principalmente quando se trata da bioquímica do corpo, seja ele humano ou animal; isso porque o metabolismo deste elemento pode sofrer mudanças durante o transporte pelo sangue até os órgãos. O Se absorvido pelo organismo e transportado pelo plasma sanguíneo pode sofrer transformações químicas antes de ligar-se às proteínas plasmáticas e em todos os tecidos. O preparo de amostras visando à especificação necessita de um maior cuidado, uma vez que a estrutura analítica precisa ser mantida, necessidade que impossibilita o emprego de meios oxidantes para o preparo, os quais são, na maioria das vezes, empregados quando a se realiza a determinação total dos analitos.<sup>1</sup> Considerando os aspectos descritos acima relacionados à importância da especificação de Se em amostras clínicas e sua relevância do ponto de vista analítico e bioquímico, o desenvolvimento de um método eficiente e adequado empregando a hifenação entre as técnicas de separação e detecção (HPLC-HG-ICP OES) foi proposto para a especificação de Se em amostras de sangue bovino. As amostras de soro e plasma de sangue bovino foram coletadas em frascos adequados para esse fim, os quais continham heparina e foram colhidos na semana das análises, com o objetivo de preservação das amostras e injetadas no cromatógrafo após hidrólise enzimática. As amostras de sangue coletadas de animais submetidos a experimentos de reprodução e nutrição animais, na Embrapa Pecuária Sudeste, e foram preparadas por meio de uma reação enzimática com o emprego da enzima proteinase K (Sigma Aldrich) com a finalidade de liberação das diferentes espécies de Se sem o risco de degradação das mesmas, simulando processo biológico. A reação foi realizada, de acordo com a literatura,<sup>2</sup> em um sistema de incubação Thermomixer 5436 (Eppendorf®), o que possibilitou uma temperatura constante de 37°C por aproximadamente 24 horas. A cada 500 µL de amostra de sangue foi adicionada 1,21 mg da enzima. Após a incubação, os frascos contendo as amostras foram centrifugados em uma centrífuga para frascos Eppendorf® de 1 mL por 30 min, sob uma rotação de 2500 rpm.<sup>2</sup> O emprego de hidrólise enzimática tem mostrado bons resultados para a especificação de selênio em uma variedade de amostras e o tipo de enzima utilizada, na maioria das vezes, influencia na eficiência do processo de hidrólise. Essa eficiência do processo de preparo da amostra foi avaliada de maneira visual (cor da solução após a reação enzimática), pela eficiência do processo de separação/pré-redução/geração/determinação (avaliação da diminuição do sinal e aumento das interferências) e análise do sobrenadante, após a reação enzimática e a centrifugação, o qual apresentou menor viscosidade que o sangue, além de uma coloração acastanhada bem mais clara que a da amostra original. Além disso, no processo de separação nenhuma diferença foi observada para os padrões dos diferentes tipos de formas de selênio, adicionados antes da etapa de preparo das amostras, ou seja, nenhuma diferença nos picos foi observada quando comparado com os resultados para os mesmos padrões em meio HCl 20% (v/v). O tempo total do cromatograma foi praticamente o mesmo, o que informa um comportamento muito similar entre a especificação em água e na amostra "digerida" enzimaticamente, reforçando assim, a eficiência do processo de preparo da amostra.

[1] Dernovics, M.; Stefánka, Z. S.; Fodor, P. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 372, 473.

*Chrom. Acta B*, **2005**, 60, 1243.