



**ALEXANDRE BOARI DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE SELÊNIO EM  
GRÃOS DE ARROZ BIOFORTIFICADOS PELA APLICAÇÃO  
VIA SOLO OU FOLIAR DE ESPÉCIES INORGÂNICAS DO  
ELEMENTO**

**LAVRAS – MG**

**2022**

**ALEXANDRE BOARI DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE SELÊNIO EM GRÃOS DE ARROZ  
BIOFORTIFICADOS PELA APLICAÇÃO VIA SOLO OU FOLIAR DE ESPÉCIES  
INORGÂNICAS DO ELEMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Aplicada à Agricultura Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lima, Alexandre Boari de.

Avaliação da bioacessibilidade de selênio em grãos de arroz  
biofortificados pela aplicação via solo ou foliar de espécies  
inorgânicas do elemento / Alexandre Boari de Lima. - 2022.

77 p. : il.

Orientador(a): Marcelo Braga Bueno Guerra.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Bioacessibilidade. 2. Biofortificação. 3. Selênio. I. Guerra,  
Marcelo Braga Bueno. II. Título.

**ALEXANDRE BOARI DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE SELÊNIO EM GRÃOS DE ARROZ  
BIOFORTIFICADOS PELA APLICAÇÃO VIA SOLO OU FOLIAR DE ESPÉCIES  
INORGÂNICAS DO ELEMENTO**

**ASSESSMENT OF SELENIUM BIOACCESSIBILITY IN RICE GRAINS  
BIOFORTIFIED BY SOIL OR FOLIAR APPLICATION OF INORGANIC SPECIES  
OF THE ELEMENT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Aplicada à Agricultura Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de março de 2022.

Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra UFLA

Dr. Cleiton Antônio Nunes UFLA

Dra. Catarinie Diniz Pereira UEM

Prof. Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2022**

*A Deus, a quem dou toda honra e glória, que esteve sempre ao meu redor e me deu forças para continuar nos momentos difíceis de mais esta etapa vivida.*

*Aos meus pais que sempre lutaram para que eu pudesse ter plenas condições de alcançar meus objetivos e por todo o suporte na minha trajetória.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela permissão para o afastamento e pela oportunidade de cursar este mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da UFLA pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos e crescer dentro da profissão.

Ao meu orientador, professor Marcelo Braga Bueno Guerra, pelo privilégio de ser seu primeiro orientado como professor na universidade, pelos ensinamentos e dedicação a este trabalho.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para avaliarem este trabalho.

Aos professores do Departamento de Química (DQI) pelos ensinamentos e dedicação nas disciplinas cursadas.

Ao Departamento de Ciência do Solo (DCS) e especialmente ao Laboratório Central de Química Ambiental (LCQA) pelas condições de execução dos trabalhos.

Ao professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme pela ajuda na conceitualização deste trabalho.

Ao Josimar e professor Guilherme Lopes, por cederem as amostras para este trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa, Fapemig, CNPq, Capes e Finep pelos recursos investidos no laboratório e na pesquisa brasileira.

À minha namorada, companheira e parceira, Bethânia pelo incentivo a buscar mais esta etapa da minha vida e pelo suporte durante os tempos difíceis enfrentados.

Aos alunos de mestrado e iniciação científica pelo auxílio na execução do projeto, em especial à Thaís que mostrou grande empenho em todas as atividades no laboratório.

Aos colegas técnicos, em especial Livia e Mariene, e alunos do DCS pelo suporte e direcionamento durante todo o período do curso.

**Muito obrigado!**

## RESUMO

O selênio é um micronutriente para os seres humanos que ganhou destaque no âmbito acadêmico mundial, pois a sua deficiência está relacionada à algumas patologias do organismo. Estudos recentes não trouxeram apenas uma melhor compreensão das funções do Se no corpo humano, mas também propuseram estratégias para incremento da sua ingestão, especialmente através da alimentação. Estudos de biofortificação de selênio em alimentos-base foram realizados nas últimas décadas. Diversos destes estudos conseguiram elevar os teores deste nutriente nos alimentos por meio de biofortificação. No entanto, ainda são escassos os estudos para a avaliação das espécies químicas deste elemento que são acumuladas nos grãos de cereais. Pesquisas relacionadas à avaliação da fração de selênio potencialmente biodisponível nesses alimentos biofortificados são ainda mais escassas. Ensaio de bioacessibilidade nos alimentos biofortificados para avaliar a eficiência da biofortificação do alimento com espécies inorgânicas de selênio, como selenato e selenito são indispensáveis. O arroz, por exemplo, é um dos alimentos básicos mais consumidos no Brasil. A biofortificação, que aumentará o teor do elemento no grão, pode mitigar o problema de baixa ingestão de selênio pela maior parte da população que o tem como base alimentar. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a fração bioacessível de Se em grãos de arroz, cujas plantas foram biofortificadas com espécies inorgânicas do elemento aplicadas via solo ou foliar. Para isto, foi utilizado um método de extração sequencial *in vitro* que simula o trato gastrointestinal humano. As amostras e extratos passaram por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. As determinações de teores totais e bioacessíveis foram feitas por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) com câmara de reação dinâmica (DRC) utilizando gás oxigênio (O<sub>2</sub>). Este estudo permitiu concluir que a biofortificação via foliar com selenito e selenato de sódio foram mais eficazes na produção de grãos com maiores teores de selênio na fração bioacessível. O teor bioacessível de selênio nos grãos de arroz foi, em média, de  $61 \pm 5$  % do teor total sendo que  $44 \pm 4$  % do teor total de selênio é extraído na etapa gástrica da digestão. Estes resultados permitem concluir que a biofortificação de grãos de arroz, com formas inorgânicas de selênio, é eficaz também para aumento do teor bioacessível deste elemento no alimento, mas a quantidade a ser aplicada via solo ou via foliar deve considerar que a fração eficiente é inferior à quantidade total com base na dose aplicada.

**Palavras-chave:** Bioacessibilidade. Biofortificação. ICP-MS. Selênio.

## ABSTRACT

Selenium is a micronutrient for human nutrition that has gained distinction in the world scientific scenario, because its deficiency is related to some human diseases. Recent studies have not only brought a better understanding of the functions of the Se in the human body, but also proposed strategies to increase its intake, especially through food. Selenium biofortification studies in staple foods have been performed in recent decades. Several of these studies were successful in attaining to higher levels of this nutrient in food through biofortification. However, there are still few studies towards the evaluation of chemical species of this element that are accumulated in cereal grains. Research related to the assessment of the potentially bioavailable selenium fraction in these biofortified foods is even more scarce. It is important to perform bioaccessibility assays on biofortified foods to evaluate the efficiency of food biofortification using inorganic selenium species, such as selenate and selenite. Rice, for example, is one of the most consumed staple foods in Brazil. Its biofortification, which will increase the content of the nutrient in the grain, can mitigate the problem of low selenium intake by most of the population that chooses rice as a staple food. Thus, the objective of this work was to determine the bioaccessible fraction of selenium in rice grains biofortified via soil or foliar with inorganic species of the element. For this purpose, an *in vitro* sequential extraction method was used to simulate the human gastrointestinal tract. The samples and extracts were submitted to microwave-assisted acid digestion. The determinations of total and bioaccessible levels were performed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) with dynamic reaction cell (DRC) using oxygen gas (O<sub>2</sub>). This study allowed us to conclude that the biofortification via leaf with sodium selenate and selenite were more effective in producing grains with higher selenium levels in the bioaccessible fraction. These content in rice grains were, on average,  $61 \pm 5$  % of the total content and  $44 \pm 4$  % of the total were extracted in the gastric stage of digestion. These results allow to conclude that the biofortification of rice grains, with inorganic forms of selenium, is also effective to increase the bioaccessible content of this element in food, but the amount to be applied to the soils or plant leaves must consider that the efficient fraction would be lower than the total amount based on the applied dose.

**Keywords:** Bioaccessibility. Biofortification. ICP-MS. Selenium.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de artigos publicados entre 2013 e 2021 que estudaram cada alimento..	15
Figura 2 – Elementos avaliados em artigos publicados entre 2013 e 2021 no Brasil sobre biofortificação.....	16
Figura 3 – Fluxograma da parte experimental .....	38
Figura 4 – Otimização do fluxo de gás oxigênio na câmara de reação dinâmica (DRC) para determinação de selênio por ICP-MS .....	44
Figura 5 – Teor total de selênio em grãos de arroz por método de aplicação e por região.....	47
Figura 6 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz após biofortificação com selenato via solo.....	49
Figura 7 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz após biofortificação com selenato via foliar.....	50
Figura 8 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz após biofortificação com selenito via foliar.....	51
Figura 9 – Bioacessibilidade de selênio em grãos de arroz para os três tipos de aplicação para o experimento de Lambari – MG.....	52
Figura 10 – Bioacessibilidade de selênio em grãos de arroz para os três tipos de aplicação para o experimento de Patos de Minas – MG.....	53
Figura 11 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz extraído em cada fase do teste <i>in vitro</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de selênio em alimentos consumidos no Brasil .....	14
Tabela 2 – Isótopos estáveis de selênio e respectivas massas atômicas e abundâncias relativas .....	18
Tabela 3 – Teor total de Se ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para a maior dose aplicada ( $480 \text{ mg kg}^{-1}$ ) .....	33
Tabela 4 – Condições operacionais para a quantificação de Se por ICP-MS.....	35
Tabela 5 – Parâmetros analíticos de desempenho para a determinação quantitativa de selênio por ICP-MS.....	43
Tabela 6 – Comparação da soma dos teores extraídos pelo método sequencial e o teor total de selênio nas amostras de arroz .....	45
Tabela 7 – Teor de selênio extraído em cada etapa da digestão simulada .....	57
Tabela 8 – Artigos brasileiros sobre biofortificação (2013-2022) (continua).....	71
Tabela 9 – Comparação do teor total de selênio nas amostras de arroz biofortificadas em Lambari – MG com o somatório das fases do ensaio de bioacessibilidade.....	74
Tabela 10 – Comparação do teor total de selênio nas amostras de arroz biofortificadas em Patos de Minas – MG com o somatório das fases do ensaio de bioacessibilidade .....	75
Tabela 11 – Teste ANOVA de fator duplo (Região x Dose) (selenato via solo) .....	76
Tabela 12 – Teste de Tukey (valores de p) (selenato de sódio via solo).....	76
Tabela 13 – Teste ANOVA de fator duplo (Região x Dose) (selenato via foliar) .....	76
Tabela 14 – Teste de Tukey (valores de p) (selenato de sódio via foliar).....	76
Tabela 15 – ANOVA – Região x Dose (selenito de sódio via foliar) .....	76
Tabela 16 – Teste de Tukey (valores de p) (selenito de sódio via foliar).....	77
Tabela 17 – ANOVA – Aplicação x Dose (Experimento completo) .....	77
Tabela 18 – Teste de Tukey (valores de p) (Experimento completo) .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

GPx	Glutathione peroxidase
LA	Lambari-MG
PT	Patos de Minas-MG
SeCys	Selenocisteína

SeMet Selenometionina

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BEC	Concentração Equivalente ao Fundo, do inglês <i>Background Equivalent Concentration</i>
CRM	Material de referência certificado, do inglês <i>Certified Reference Material</i>
CV	Coefficiente de Variação
DRC	Câmara de reação dinâmica, do inglês <i>Dynamic Reaction Cell</i>
EDXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia, do inglês <i>Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry</i>
ETV	Vaporização Eletrotérmica, do inglês <i>Electrothermal Vaporization</i>
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FAES	Espectrometria de Emissão Atômica em Chama, do inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i>
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FIA	Análise por Injeção em Fluxo, do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama, do inglês <i>Gas Chromatography Flame Ionization Detector</i>
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HGAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, do inglês <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IVG	Método gastrointestinal <i>in vitro</i> , do inglês, <i>in vitro gastrointestinal</i>

KED	Modo de discriminação por energia cinética, do inglês <i>kinetic energy discrimination mode</i>
LA-ICP-MS	Ablação a <i>laser</i> associada à Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
LC	Cromatografia em fase líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LCQA	Laboratório Central de Química Ambiental
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Induzido por Micro-ondas, do inglês <i>Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
MSEP	Erro quadrado médio de previsão, do inglês <i>mean square error of prediction</i>
RCC	Teor de carbono residual, do inglês <i>Residual Carbon Content</i>
RF	Radiofrequência
RMSEP	Raiz do erro quadrático médio de previsão, do inglês, <i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
SBET	Teste de Bioacessibilidade de Extração Simples, do inglês <i>Simplified Bioaccessibility Extraction Test</i>
SEIV	Selenito aplicado via foliar
SES	Selenato aplicado via solo
SEVI	Selenato aplicado via foliar
SHIME	Simulador do Ecossistema Microbiano do Intestino Humano, do inglês <i>Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem</i>
TXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total, do inglês <i>Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry</i>
US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América, do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>
$\mu$ -XRF	Espectrometria de microfluorescência de raios X, do inglês <i>micro-X-ray fluorescence spectrometry</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Selênio .....	18
2.2	Avaliação da bioacessibilidade .....	19
2.2.1	Avaliação da bioacessibilidade de selênio .....	21
2.3	Principais compostos orgânicos de selênio de importância nutricional .....	23
2.4	Preparo de amostras para determinação de níveis traço de espécies inorgânicas .....	24
2.5	Principais métodos de determinação de selênio .....	27
2.6	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) .....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1	Amostras de grãos de arroz biofortificados utilizadas .....	33
3.2	Determinação do teor total de selênio .....	34
3.3	Avaliação da bioacessibilidade de selênio .....	35
3.4	Otimização dos métodos de determinação de selênio total e bioacessível.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1	Otimização e parâmetros analíticos de desempenho do método de quantificação de selênio por ICP-MS .....	41
4.2	Teores totais de selênio .....	46
4.3	Teores de selênio bioacessível .....	48
5	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS .....	60
	ANEXOS.....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento que ganhou visibilidade no âmbito científico nas últimas décadas devido aos seus efeitos nos sistemas biológicos, especialmente para o ser humano. Estudos começaram a ser realizados para determinar os efeitos da deficiência e do excesso de selênio no organismo humano. O intervalo entre os níveis máximo e mínimo recomendados de ingestão deste micronutriente é estreito, especialmente para crianças de até 1 ano de vida, fazendo com que o alcance do consumo ótimo seja complexo (THOMSON, 2004; NAVARRO-ALARCÓN; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000, NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH – NIH, 2021). Os teores de Se no solo são bastante variáveis, especialmente nas regiões tropicais. Gabos *et al.* (2014) determinaram os teores basais de selênio em várias amostras de solos do Brasil (n = 58) englobando diversas classes e materiais de origem. Esses autores encontraram uma ampla faixa de concentração do elemento (de teores menores que 0,08 a 1,61 mg kg<sup>-1</sup>, com uma média de 0,19 mg kg<sup>-1</sup>). Os baixos teores encontrados na maior parte dos solos brasileiros, limitam que os produtos agrícolas produzidos apresentem naturalmente, concentrações mais adequadas de selênio (MORAES *et al.*, 2009; FERREIRA, 2002).

A alimentação é a principal fonte de nutrientes do organismo. Sendo assim, a baixa ingestão de nutrientes é consequência direta do baixo teor nos alimentos ingeridos. A deficiência de micronutrientes causa o mau funcionamento do organismo que, com isso, torna-se susceptível a diversas doenças de cunho nutricional. Algumas delas estão relacionadas à baixa ingestão de selênio e isso impulsionou estudos, em diversos países, relacionados aos efeitos fisiológicos deste elemento (SCHRAUZER, 2000; YANG *et al.*, 2022; KURIA *et al.*, 2021). Constatou-se que o consumo regular de alimentos ricos em Se e/ou a sua suplementação estão relacionados à diminuição na prevalência de algumas patologias, tais como: câncer gastrointestinal e de próstata, doenças cardiovasculares e diabetes (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; NAVARRO-ALARCÓN; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000).

Apesar do baixo consumo diário recomendado (70 µg por dia para homens e 60 µg por dia para mulheres) (KIPP *et al.*, 2015), o selênio é muito importante para a saúde humana. É um componente essencial de importantes rotas metabólicas (BROWN; ARTHUR, 2001) e constituinte das selenoproteínas, como a glutathiona peroxidase (GPx). As selenoproteínas apresentam papel relevante como antioxidantes, na regulação da função da tireoide, assim como na prevenção do acidente vascular cerebral, na melhoria da fertilidade e da resposta imune (WEEKS; HANNA; COOPERSTEIN, 2012).

A média de consumo mundial de selênio é considerada baixa, embora existam exceções (DINH *et al.*, 2018). Esta variação se deve, principalmente, aos teores de Se no solo de cada região. Devido aos baixos teores nos solos brasileiros, como descrito acima, os teores de selênio nos alimentos produzidos a partir dos produtos agrícolas nacionais também são baixos (tabela 1). Desta forma, estudos de biofortificação procuram incrementar os teores de Se nestes alimentos a fim de aumentar a ingestão diária deste importante nutriente.

Tabela 1 – Teor de selênio em alimentos consumidos no Brasil

Alimento (número de amostras)	Selênio ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ de alimento cru)		
	Teor Médio	Faixa <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
Feijão <sup>c</sup> (7)	1,0	0,3-2,5	90
Arroz polido <sup>d</sup> (4)	0,8	0,1-1,3	63
Farinha de trigo <sup>e</sup> (9)	5,6	2,7-11,8	48
Farinha de mandioca <sup>f</sup> (6)	1,6	0,3-2,4	50
Fubá de milho <sup>g</sup> (6)	3,4	2,0-6,6	53

<sup>a</sup> Faixa de variação entre as amostras analisadas de cada produto.

<sup>b</sup> Coeficiente médio de variação entre as amostras analisadas.

<sup>c</sup> Amostras cultivadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Pernambuco. Quatro amostras de feijão preto, uma de vermelho, uma de roxo capixaba e uma de cariquinho.

<sup>d</sup> Amostras cultivadas nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais.

<sup>e</sup> Amostras das marcas comerciais Sonho Branco, Número Um, Dona Benta, Boa Sorte, Vilma, Santa Luzia, Boa Sorte Vitaminado, Celeste e Vilma Vitaminado.

<sup>f</sup> Amostras produzidas e embaladas nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo.

<sup>g</sup> Amostras produzidas nos estados do Paraná, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul.

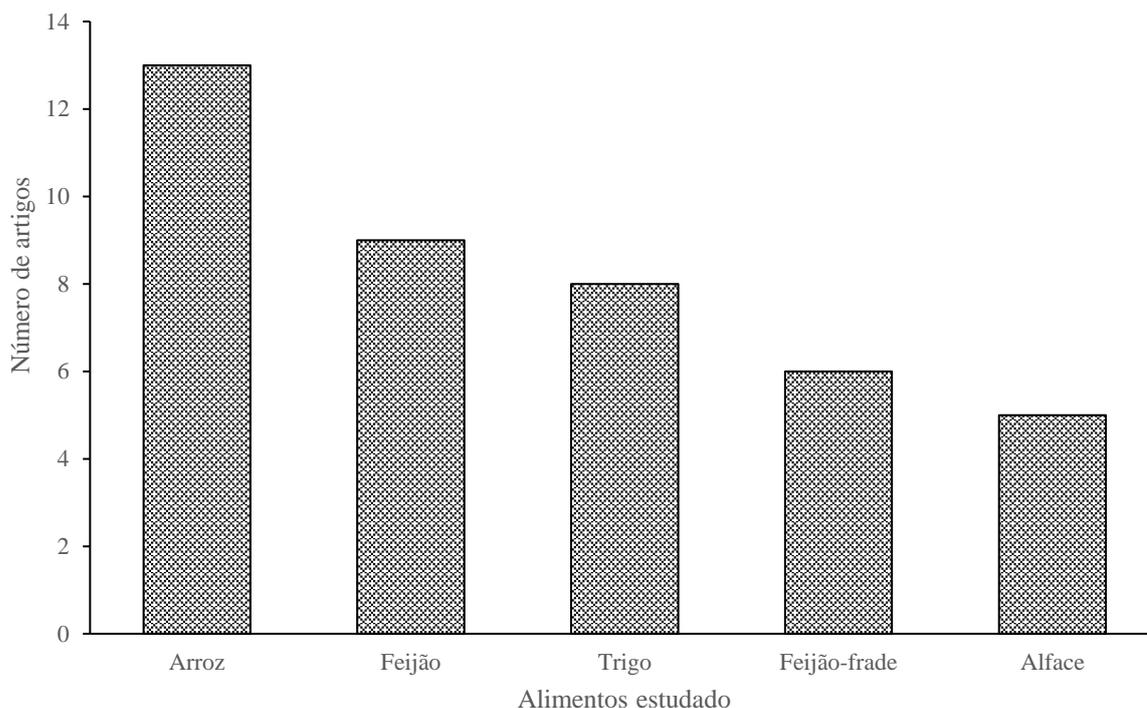
Fonte: (FERREIRA *et al.*, 2002)

Segundo Nascimento *et al.* (2011), em todas as macrorregiões brasileiras, com exceção da região Norte, os padrões de consumo incluem alimentos da dieta típica brasileira, ou seja, arroz, feijão e farinhas (trigo, mandioca e de milho) (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Portanto, devido à importância cultural e facilidade de acesso, acredita-se que a biofortificação desses alimentos possa gerar bons resultados quanto ao aumento da ingestão de nutrientes pela população.

No Brasil, diversas pesquisas avaliaram a biofortificação de vários alimentos amplamente consumidos no país com diversos elementos de interesse nutricional. Pesquisando a base de dados Scopus<sup>®</sup>, buscando o termo “*biofortification*” e restringindo a busca para trabalhos do Brasil de 2013 até o início de 2022, foram encontrados 51 artigos científicos que avaliaram de alguma forma a biofortificação de alimentos. Os artigos são listados na tabela 8

nos anexos. Destes artigos, os alimentos mais estudados foram arroz, feijão, trigo, feijão-frade e alface (figura 1), alimentos que são os mais comuns na dieta típica brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2021). A biofortificação destes alimentos, portanto, tem maior efeito sobre a nutrição popular devido ao maior consumo dos mesmos.

Figura 1 – Número de artigos publicados entre 2013 e 2021 que estudaram cada alimento

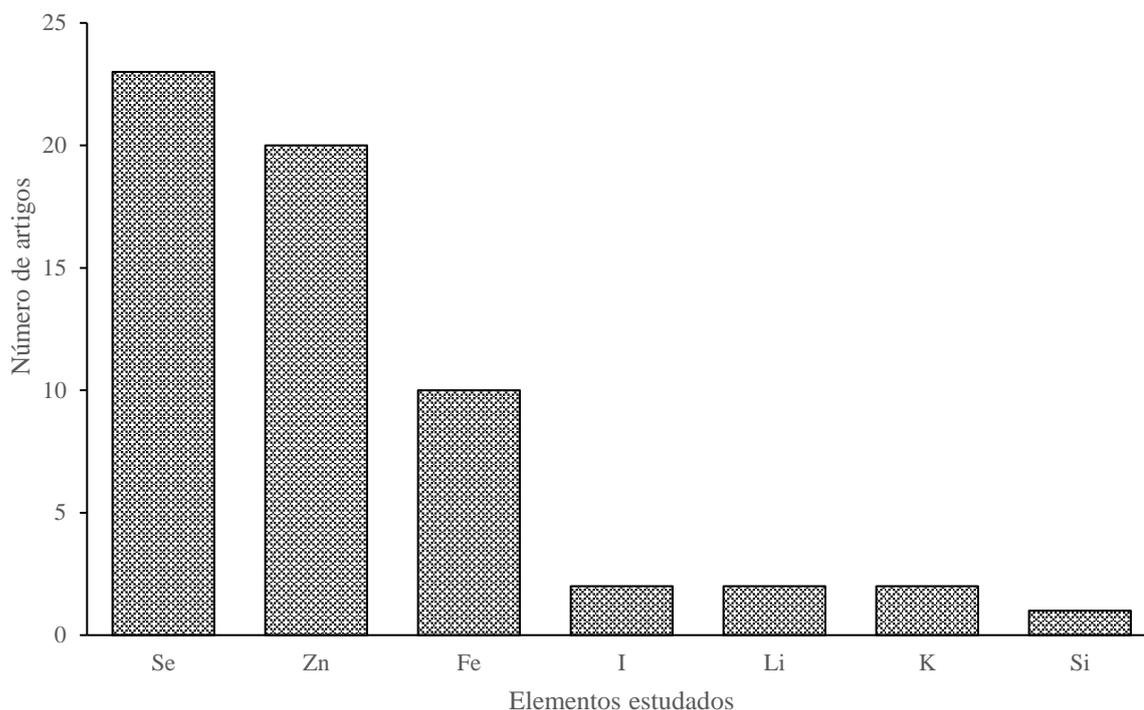


Fonte: Do autor (2022)

Segundo Dhaliwal *et al.* (2022), o arroz é um importante alimento base em todo o mundo, especialmente na Ásia, América Latina e partes da África. Além de serem os alimentos mais consumidos, os cereais têm a capacidade de acumular mais minerais em suas partes comestíveis (WHITE; BROADLEY, 2005). Portanto, a biofortificação destes grãos tem um impacto maior sobre a nutrição humana.

Os nutrientes de maior deficiência na nutrição humana são o zinco (Zn), ferro (Fe) e iodo (I), além da vitamina A e o ácido fólico (DHALIWAL, 2022). A pesquisa de trabalhos brasileiros apontou que o selênio é o elemento mais visado em pesquisas de biofortificação (23 dos 51 artigos encontrados no período de 2013 a 2021). O zinco também é um dos mais estudados (20 dos 51 artigos), seguido do ferro (10 dos 51 artigos). A figura 2 mostra o número de artigos que avaliaram cada elemento.

Figura 2 – Elementos avaliados em artigos publicados entre 2013 e 2021 no Brasil sobre biofortificação



Fonte: Do autor (2022)

Esses artigos publicados entre 2013 e 2022 também mostram que em apenas 6 dos 51 foi realizado um estudo de bioacessibilidade ou de biodisponibilidade do elemento avaliado no alimento biofortificado. Isto pode ser um indício de que a maior parte dos estudos de biofortificação realizados no país ainda carecem de refinamento com o uso de ensaios de bioacessibilidade de nutrientes nos alimentos.

O sucesso das estratégias de biofortificação é dependente de inúmeras variáveis, como a espécie química de selênio, o modo de aplicação do fertilizante contendo selênio e a espécie vegetal. A biofortificação agrônômica de Se, em vários estudos, é feita utilizando selenato ou selenito de sódio podendo ser aplicados junto aos fertilizantes (via solo) ou após o crescimento da planta aplicando a solução diretamente nas folhas (via foliar) (SCHIAVON, 2020). De forma geral, solos com mata nativa tendem a apresentar maior capacidade de retenção de selenato do que solos agrícolas. Este fato está relacionado com a presença de ânions competidores, especialmente fosfato, em áreas sob cultivo. Assim, a biofortificação pela adição de selenato ao solo é uma estratégia interessante em solos cultivados devido à maior mobilidade dessa espécie química, o que favorece a sua transferência para as plantas (ARAUJO; *et al.*, 2018; LESSA *et al.*, 2016). As formas inorgânicas do elemento, no entanto, são metabolizadas pelas plantas

gerando diferentes espécies químicas como selenoenzimas e selenoproteínas. O selênio pode ser encontrado em diversas formas químicas tanto nas folhas quanto nos grãos. Estas espécies químicas apresentam diferentes capacidades de serem metabolizadas pelo organismo humano. As espécies químicas orgânicas, por exemplo, são mais biodisponíveis do que as formas inorgânicas (selenato e selenito, por exemplo) (DUMONT; VANHAECKE; CORNELIS, 2006; RAYMAN, 2008). Desta forma, torna-se fundamental a proposição de estudos que visem, não somente a determinação do teor total de Se, mas também da avaliação da fração bioacessível deste nutriente (ARI *et al.*, 2022), ou seja, a realização de estudos que possam determinar a quantidade potencialmente disponível para ser absorvida pelo organismo.

Estudos de biofortificação de diversos alimentos mostram que é possível aumentar os teores totais de Se, mas a maior parte destas pesquisas não apresentam os dados referentes à bioacessibilidade. Portanto, não se pode determinar com precisão a efetividade da biofortificação sem que se proceda ensaios que avaliem a fração potencialmente biodisponível dos nutrientes (DELAQUA *et al.*, 2022). Para acessar tais informações, é necessária uma avaliação de bioacessibilidade do nutriente através de simulação do trato gastrointestinal humano. Estes testes de bioacessibilidade podem ser realizados *in vitro*, já que esta abordagem oferece adequada correlação com os ensaios *in vivo*, além de propiciar vantagens adicionais, tais como a elevada frequência analítica, possibilidade de automação e miniaturização, controle mais rigoroso dos parâmetros analíticos, baixo custo, alta precisão e exatidão e boa reprodutibilidade (MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P., 2017).

Os objetivos deste trabalho, portanto, são: i) validar um método analítico para a avaliação da fração bioacessível de selênio em amostras de grãos de arroz biofortificados com este elemento; ii) proposição de um fator de correção para a aplicação de selênio via solo e via foliar a fim de corrigir as doses aplicadas na produção de arroz com teores adequados para consumo humano. Para alcançar tais objetivos foram executados ensaios de bioacessibilidade *in vitro* pela simulação do trato gastrointestinal humano.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Selênio

O selênio foi isolado pela primeira vez em 1817 pelo químico sueco Jöns J. Berzelius. Seu número atômico é 34 e sua massa atômica é 78,971 u. Alocado na família 16 da tabela periódica entre o enxofre (S) e o telúrio (Te), possui várias propriedades semelhantes ou intermediárias a estes dois elementos (REILLY, 1996). O selênio pode ser encontrado na sua forma elementar, reduzido com carga -2 ( $\text{H}_2\text{Se}$ , seleneto de hidrogênio, por exemplo), ou nas formas oxidadas +4 ( $\text{SeO}_3^{-2}$ , selenito) e +6 ( $\text{SeO}_4^{-2}$ , selenato). Na tabela 2 é fornecida uma lista com os isótopos estáveis de selênio acompanhados das suas respectivas massas atômicas e abundâncias relativas.

Tabela 2 – Isótopos estáveis de selênio e respectivas massas atômicas e abundâncias relativas

Isótopo	Massa Atômica	Abundância (%)
$^{74}\text{Se}$	73,922	0,89
$^{76}\text{Se}$	75,919	9,37
$^{77}\text{Se}$	76,920	7,63
$^{78}\text{Se}$	77,917	23,77
$^{80}\text{Se}$	79,917	49,61
$^{82}\text{Se}$	81,917	8,73

Fonte: (DE LAETER *et al.*, 2003)

Em 1957 foi reconhecida a essencialidade do selênio (SCHWARZ; FOLTZ, 1957) e em 1973 (FLOHE; GÜNZLER; SCHOCK, 1973), foi identificada a primeira selenoproteína, a glutathiona peroxidase (GPx), considerada uma das maiores responsáveis pela redução catalítica do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos (LEI; CHENG; MCCLUNG, 2007). Cabe também mencionar que já foi demonstrado o importante papel desempenhado pelo selênio como antioxidante celular (BATTIN; BRUMAGHIM, 2009). O selênio está ligado, direta ou indiretamente, a funções críticas na via metabólica e nos sistemas imune e endócrino humano, além de auxiliar no combate a inflamações e infecções (WILLIAMS; HARRISON, 2010; DUNTAS, 2009; HOFFMANN; BERRY, 2008; BECKETT; ARTHUR, 2005).

A deficiência de selênio no organismo está, indiretamente, relacionada às baixas concentrações do elemento no solo, uma vez que sua maior absorção é consequência direta da ingestão de alimentos enriquecidos no elemento (LOPES; ÁVILA; GUILHERME, 2017). Isto está relacionado ao fenômeno conhecido como fome oculta, definido pela deficiência de micronutrientes na alimentação mesmo com a abundância de alimentos (BURCHI; FANZO; FRIZON, 2011; LENAERTS; DEMONT, 2021).

Devido às suas características semelhantes ao enxofre (S), o selênio pode substituí-lo em moléculas que contém este elemento, como os aminoácidos. Este fator pode significar o acúmulo de Se em alimentos com altos teores de proteínas, como ovos e carnes, por exemplo (SIGRIST *et al.*, 2012; SAGER, M., 2006; KLAPEC *et al.*, 2004).

## **2.2 Avaliação da bioaccessibilidade**

Diversas pesquisas visam melhorar a alimentação humana seja em quantidade de alimentos ou a qualidade deles. A quantidade de alimentos é, sem dúvida, de suma importância para a humanidade, especialmente observando o aumento da população mundial. O fenômeno conhecido como fome oculta, no entanto, mostra que somente a quantidade de alimentos não é suficiente para uma boa nutrição, é preciso, também, que os alimentos tenham nutrientes em quantidade suficiente para o bom funcionamento do organismo (BURCHI; FANZO; FRIZON, 2011; LENAERTS; DEMONT, 2021).

Frequentemente, o alimento pode não conter quantidades adequadas de nutrientes, pois foi produzido em solo com baixos teores destes elementos essenciais. Se o solo agrícola não possui estes componentes em concentrações fitodisponíveis adequadas, o alimento colhido não conterá os teores apropriados dos nutrientes. Várias pesquisas, portanto, visam aumentar o teor de nutrientes nos alimentos aplicando-os diretamente ao solo ou sobre as plantas (VELU *et al.*, 2014; CAKMAK; KUTMAN, 2018; WHITE; BROADLEY, 2009).

Bovell-Benjamin e Bromfield (2010) asseveram que as informações nutricionais presentes nos rótulos dos alimentos auxiliam aos consumidores em suas escolhas nutricionais, o que contribui diretamente na prevenção de doenças crônicas, como alguns tipos de câncer, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares. As autoras também afirmam que os consumidores ao lerem uma informação nutricional no rótulo com o dado referente à porcentagem do valor diário recomendado atendida por porção, têm uma falsa percepção de que todo o teor do nutriente presente na porção será efetivamente utilizado pelo corpo humano,

o que não é correto. Portanto, há um caminho longo a ser seguido para a exigência de uma rotulagem nutricional mais completa que forneça dados de biodisponibilidade e que propicie aos consumidores escolhas alimentares mais saudáveis. Para o caso do selênio, a FDA (*Food and Drug Administration*), agência federal dos Estados Unidos da América, não requer nem que se informe nos rótulos dos alimentos os teores totais do elemento, a menos que o mesmo tenha sido adicionado ao alimento (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH - NIH, 2021).

Além de aumentar o teor total do nutriente no alimento colhido, também é importante garantir que uma fração significativa seja disponível para o organismo. Desta forma, é necessária uma abordagem elucidativa acerca dos conceitos de biodisponibilidade e bioacessibilidade de nutrientes. O conceito de biodisponibilidade varia de acordo com a área de pesquisa. Para a área de nutrição, a definição comumente aceita para biodisponibilidade é a fração do analito ingerido que foi efetivamente digerida, absorvida e metabolizada e está disponível para ser usada pelo organismo no cumprimento de suas funções fisiológicas ou para ser armazenada (FAIRWEATHER-TAIT, 1993; SRINIVASAN, 2001). A bioacessibilidade, por outro lado, pode ser definida como a fração de um composto que é removido da sua matriz no trato digestivo e se torna disponível para absorção pelo organismo (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Uma das estratégias de determinação *in vivo* da absorção de nutrientes, é o balanço de massa entre a quantidade fornecida ao organismo (notadamente através da alimentação) e a quantidade excretada por ele. A diferença equivale à fração absorvida do composto estudado. Os resultados obtidos por estes métodos são muito exatos, pois a análise é feita utilizando o próprio organismo, então o teor absorvido encontrado no estudo é, de fato, o que estava biodisponível. No entanto, tal metodologia exige a utilização de seres vivos, humanos ou outros animais, o que torna a execução do experimento muito mais complexa, seja por impedimentos éticos e legais, ou por questões de reprodutibilidade, que pode ser menor devido às diferenças intrínsecas entre os indivíduos monitorados. Outra estratégia *in vivo* é determinar a concentração do analito nos tecidos do organismo durante um tempo determinado (DALTO, MATTE, 2022).

Os estudos *in vitro*, por sua vez, buscam simular as condições fisiológicas e a sequência de reações químicas que ocorrem na digestão considerando os compartimentos do trato digestivo (boca, estômago e intestino) (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). Não é possível, porém, simular totalmente o ambiente digestivo, devido à sua complexidade, mas apenas com as espécies químicas que fazem parte de algumas

das reações envolvidas na digestão. Assim sendo, os métodos *in vitro* exigem uma validação via correlação com os métodos *in vivo* (COLES *et al.*, 2013).

A avaliação pode ser feita *in vivo* ou *in vitro* sendo que a primeira mede a biodisponibilidade enquanto a segunda mede a bioacessibilidade. Uma das possibilidades para o ensaio *in vitro*, é o método em batelada proposto por Horner e Beauchemin (2013), no qual a amostra moída de alimento é colocada em contato com uma solução de saliva artificial por 10 min a 37 °C, em seguida com solução de suco gástrico simulado por 2 h e, finalmente com fluido intestinal simulado, também por 2 h. Por fim, o resíduo passa por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Os tempos e temperaturas de extração simulam as condições da digestão realizadas pelo corpo humano.

Outros métodos, listados por Vasques, *et al.* (2020), consistem na simulação *in vitro* da digestão do corpo humano para a extração de elementos potencialmente tóxicos presentes no solo e são estratégias interessantes para a avaliação de risco à saúde humana em áreas contaminadas (YIN, *et al.*, 2022). O método desenvolvido por Rodriguez e Basta (1999) foi validado com um ensaio *in vivo*, obtendo-se elevada correlação. O método é conhecido como gastrointestinal *in vitro* (IVG, do inglês, *in vitro gastrointestinal*). Este método consiste na simulação da fase gástrica, em meio ácido, e da fase intestinal, em meio alcalino, para estimar a biodisponibilidade de arsênio em solo contaminado. A maior fração dos elementos é extraída na etapa gástrica, portanto, alguns pesquisadores optam por um método de etapa única como o teste de bioacessibilidade de extração simples (SBET, do inglês *Simplified Bioaccessibility Extraction Test*), que simula a condição gástrica (LI, *et al.*, 2014; NING, *et al.*, 2021; OOMEN, *et al.*, 2002).

### **2.2.1 Avaliação da bioacessibilidade de selênio**

O selênio se tornou alvo de estudos em diversos países pela sua importância no organismo humano como micronutriente. Devido a estes estudos, a validação de métodos analíticos para a determinação deste elemento e seus compostos orgânicos e inorgânicos foi muito discutida visando à obtenção de resultados mais confiáveis. As formas orgânicas são melhor absorvidas pelo organismo, ou seja, têm maior biodisponibilidade em relação às espécies inorgânicas (DUMONT; VANHAECKE; CORNELIS, 2006).

Delaqua *et al.* (2022) avaliaram a bioacessibilidade e biodisponibilidade de selênio em grãos de trigo biofortificados agronomicamente. Foi aplicado o selenato de sódio via foliar, em

3 doses diferentes (5, 10 e 20 g de Se por hectare). As amostras de grãos, após secagem, foram moídas e submetidas a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. O teor total de selênio nos grãos foi determinado por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O teor bioacessível foi determinado pela simulação do trato gastrointestinal utilizando soluções enzimáticas para simular as reações bioquímicas do organismo. Os extratos do teste *in vitro* foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS). O teor bioacessível foi calculado pela razão entre o teor de selênio extraído na digestão simulada e o teor total. Os autores encontraram frações bioacessíveis entre 63,3 e 93,8% do teor total de selênio.

O método utilizado por Delaqua *et al.* (2022), como descrito acima, e outros trabalhos publicados encontrados na literatura, utilizam o método descrito por Minekus *et al.* (2014) que detalha uma simulação de digestão *in vitro*. Este método, além das enzimas  $\alpha$ -amilase, pepsina e pancreatina, utiliza também a bile, tripsina, lipase pancreática, entre outras enzimas e ainda soluções eletrolíticas para controle da força iônica das soluções em cada etapa da digestão simulada. Segundo os autores, estes reagentes melhoram a simulação do trato digestivo, porém, algumas das enzimas, por exemplo, possuem atividades secundárias ou de menor influência na digestão, outras enzimas têm suas concentrações controladas pelo organismo de forma individual, ou seja, cada organismo controla o teor dessas enzimas de forma específica, portanto, dificultando uma generalização das concentrações necessárias de cada uma na simulação. Desta forma, é compreensível a utilização de métodos mais simples para a simulação *in vitro* do trato digestivo.

Os resultados obtidos pela análise destes extratos são comparados com os de teor total ou com a soma da fração extraída com a residual obtida com o método, após digestão ácida, para determinação da fração bioacessível do selênio nos grãos analisados.

A digestão das amostras para determinação dos teores totais dos elementos e também para a quantificação da fração residual utilizando a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, em comparação com outros métodos clássicos, é mais rápida, mais precisa, utiliza menor quantidade de reagentes e, portanto, tem menor risco de contaminação (BIZZI *et al.*, 2017). Outra possibilidade para a determinação de teores totais dos analitos, seria a decomposição por calcinação, no entanto, pode ocasionar perda de analitos voláteis, devido ao aquecimento a elevadas temperaturas em frasco aberto. Digestão com ácidos, em frascos fechados, pode evitar a perda de Se, mas é necessária a otimização da extração para evitar que o poder de detecção seja deteriorado devido à diluição do extrato final (AMARAL *et al.*, 2016; GHOLAMI *et al.*, 2016).

Sun, *et al.* (2017) avaliaram a bioacessibilidade do selênio em arroz cozido utilizando um sistema *in vitro* chamado de SHIME (simulador do ecossistema microbiano intestinal humano, do inglês *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*). Este método difere dos demais ensaios *in vitro* de bioacessibilidade, pois incorpora à simulação a comunidade microbiana presente no cólon humano. Foram utilizados dois tipos de amostra diferentes, o arroz branco polido comercializado nas províncias chinesas de Guangzhou e de Hunan, ambas com teor de Se maior que  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ . As amostras foram secas e passaram por etapas de beneficiamento até a obtenção do arroz branco e polido. As amostras foram cozidas seguindo o método de cozimento de 1 parte de arroz para 3 partes de água ultrapura, proporção comumente utilizada na China. Após o cozimento, as amostras foram liofilizadas e moídas. As amostras foram submetidas ao teste SHIME com a simulação do trato intestinal e da microbiota intestinal e, posteriormente os extratos, a amostra cozida e a amostra crua foram submetidas à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. As determinações quantitativas foram feitas por ICP-MS. Os autores utilizaram selenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) para preparar os padrões para análise e para adição às amostras. Utilizaram uma mistura da solução gástrica e intestinal para preparar a curva analítica para minimizar a interferência na análise. A análise de especiação química do selênio foi conduzida por HPLC-ICP-MS. O teor total de selênio encontrado nas amostras cruas foi de 1,03 e  $0,67 \text{ mg kg}^{-1}$  para as amostras avaliadas de cada uma das regiões. Não foram observadas diferenças significativas entre o teor total nas amostras cruas e cozidas, mostrando que o processamento não altera o teor total. O teor bioacessível de selênio encontrado no experimento foi de 67 a 76% do teor total na amostra. Os autores discutem que o pH baixo do suco gástrico desnatura as proteínas do arroz, consequentemente liberando o selênio ligado às mesmas. Portanto, a fase gástrica é a maior responsável pela extração do selênio do arroz. Os autores também observaram que a espécie presente em maior quantidade no arroz é a selenometionina (SeMet). A maior quantidade de selênio orgânico no arroz em comparação com o inorgânico está relacionada à maior fração bioacessível de selênio no alimento.

### **2.3 Principais compostos orgânicos de selênio de importância nutricional**

O selênio inorgânico, ao ser metabolizado pelas plantas, é transformado em diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Dentre os compostos orgânicos formados, destacam-se a selenometionina (SeMet) e a selenocisteína (SeCys). Ambas são variações dos aminoácidos

metionina (ácido (S)-2-amino-4-metiltiobutanóico) e cisteína (ácido (R)-2-amino-3-sulfanilpropanóico). A substituição do enxofre por selênio nas moléculas ocorre devido à similaridade destes elementos (PILON *et al.*, 2003). Selênio nas formas SeMet e SeCys é absorvido pelo organismo através dos mecanismos ativos de transporte de aminoácidos e são mais biodisponíveis do que selenito ou selenato (MCCONNELL; CHO, 1967; VENDELAND *et al.*, 1994).

A SeMet (ácido 2-amino-4metilselenilbutanóico) é uma variação do aminoácido metionina substituindo o enxofre da molécula pelo átomo de Se. Possui massa molar equivalente a 196,12 g mol<sup>-1</sup>. A SeCys (ácido (R)-2-amino-3-selenil-propanóico) é a variação da cisteína substituindo o átomo de enxofre por Se. Possui massa molecular de 167,06 g mol<sup>-1</sup>.

## 2.4 Preparo de amostras para determinação de níveis traço de espécies inorgânicas

A análise química não está restrita somente à quantificação ou identificação de analitos em uma determinada amostra a partir do emprego de um instrumento analítico. Nos estudos da química analítica é notório que a análise química se inicia na etapa de amostragem. A amostra pode ser definida como uma parcela de uma população, ou seja, um grupo de unidades pertencentes a um conjunto maior. Ela deve ser representativa, ou seja, possuir características semelhantes à sua população de origem de forma a permitir a caracterização fidedigna da população original. A análise química sempre gera dados após sua realização, porém, estes dados poderão ser adequadamente atribuídos ao objeto em estudo somente se a amostra analisada for representativa daquele objeto. Portanto, é crucial que a amostragem seja feita de forma a permitir a inferência sobre a população analisada (MATUSIEWICZ, 2017).

Uma população pode ser homogênea, nas quais as unidades que a integram possuem características similares, ou heterogênea, que possui diferenças significativas entre as unidades. No primeiro caso, qualquer amostra removida da população original será representativa, mas se a população é heterogênea, a representatividade da amostra depende das unidades escolhidas e, portanto, a análise de uma amostra não representativa pode gerar uma inferência errônea sobre o objeto em estudo. Alguns métodos de amostragem são utilizados visando à maior representatividade da amostra. A amostragem aleatória permite que cada unidade dentro da população tenha a mesma probabilidade de pertencer à amostra. A amostragem representativa considera as diferenças entre as unidades a fim de obter um conjunto com características médias próximas à população original. Portanto, é necessária a análise de múltiplas amostras para

garantir representatividade. Na amostra composta, porém, é feita a mistura de amostras heterogêneas para obtenção de uma única amostra homogênea com características que representem melhor a população de origem. A obtenção de uma amostra composta permite diminuir o esforço necessário ao custo de um menor detalhamento da análise sobre o objeto de estudo em comparação com a análise de diversas amostras separadamente (MATUSIEWICZ, 2017).

Vários processos podem ser necessários para a análise química entre a amostragem e a determinação por um equipamento analítico. Estes processos podem ter a função de modificar a amostra para uma forma específica para introdução no equipamento, como a solubilização ou digestão de amostras sólidas para a obtenção de soluções líquidas que podem ser injetadas em equipamentos como espectrômetros ou cromatógrafos líquidos, ou até mesmo a extração de uma fase gasosa para análise por cromatografia em fase gasosa. Podem também ser aplicados processos de remoção de interferentes de matriz. Estes processos, conhecidos como preparo de amostra, porém, podem também ocasionar em um aumento da ocorrência de erros sistemáticos, como, por exemplo a adição de interferentes ou contaminantes no processo de digestão ácida ou na perda de analito ao remover interferentes de matriz. Há ainda a contaminação pelo ambiente como por componentes dos instrumentos utilizados. Todas essas possibilidades devem ser consideradas ao se escolher o método analítico utilizado para obtenção dos dados desejados (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016)

A maior parte das análises químicas em amostras sólidas necessitam que estas sejam transformadas em uma solução antes da análise. Sólidos inorgânicos solúveis podem ser dissolvidos em água ou outro reagente para obtenção de uma solução límpida e sem interferentes de matriz. Amostras orgânicas ou de matriz mista, como amostras de solo, sedimentos e material vegetal, possuem matrizes mais complexas e, portanto, a decomposição completa da matriz não é garantida (WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2011). Amostras sólidas normalmente passam por processos de digestão por via úmida ou calcinação para posterior solubilização. A calcinação é mais utilizada para remoção de interferentes orgânicos da amostra, que é colocada em uma mufla sob aquecimento a uma temperatura entre 450-550 °C. Devido à temperatura relativamente alta, este processo não é indicado para determinação de elementos voláteis. Outra possibilidade é a digestão ácida da amostra em sistema aberto. A amostra é colocada em um recipiente com ácido e o sistema é aquecido. Os problemas mais comuns atrelados a este processo são o longo tempo necessário para digestão da amostra, a contaminação da amostra pelo ambiente devido à abertura do sistema, uso de grandes quantidades de reagentes, presença de impurezas do reagente e perda de analito por

volatilização. Também pode ser utilizado o método de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Este método é empregado para decomposição de diversas matrizes orgânicas e inorgânicas. O método utiliza ácido ou mistura de ácidos que são aquecidos pela interação com radiação micro-ondas. O sistema é fechado evitando volatilização de analitos, utiliza baixo volume de reagentes, causando menor contaminação da amostra, e o processo é mais rápido, com duração de alguns minutos (WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2011). Os extratos produzidos também possuem baixos teores de carbono residual (RCC) e de sólidos dissolvidos (NÓBREGA *et al.*, 2012).

Um dos desafios da digestão ácida de amostras sólidas para determinação de elementos em níveis traço é a diluição necessária do digerido obtido antes de sua introdução no equipamento para evitar danos ao mesmo. A diluição do extrato para obtenção de teores aceitáveis de acidez final faz com que haja uma diminuição substancial do teor final do analito a ponto de não ser possível quantificá-lo. Alguns desenvolvimentos na técnica de digestão ácida foram feitos a fim de contornar este problema, como o uso de ácidos diluídos em oposição ao uso de ácidos concentrados e outros reagentes, como o peróxido de hidrogênio, que auxiliam na decomposição da amostra. Bizzi *et al.* (2011) obtiveram digestão eficaz de amostras de leite em pó integral utilizando ácido nítrico  $7 \text{ mol L}^{-1}$  na proporção de 500 mg de amostra para 6 mL de ácido diluído. A digestão foi completa, sem necessidade de pressurizar o sistema com gás oxigênio. O equipamento foi ajustado para uma rampa de aquecimento de 5 min a 1000 W de potência seguido de 10 min de estabilização com potência de 1000 W com posterior etapa de resfriamento. Os autores confirmaram que a pressurização com gás oxigênio ( $\text{O}_2$ ) aumenta a eficiência de decomposição da amostra devido à regeneração do ácido nítrico dentro do frasco reacional. O peróxido de hidrogênio, ao reagir com a amostra, auxilia na decomposição desta e libera moléculas de oxigênio no sistema que podem auxiliar também na regeneração do ácido nítrico.

O desempenho do preparo de amostra pode ser avaliado por alguns parâmetros analíticos. A exatidão é definida pela proximidade do resultado obtido na análise em relação ao teor verdadeiro na amostra. São utilizados materiais de referência certificados (CRM), com teores conhecidos do analito, que são processados da mesma forma que as amostras do experimento, e devem apresentar concentrações determinadas similares aos valores certificados. A precisão do método é obtida pela medida da variação dos resultados obtidos na análise para as réplicas do experimento, mais precisamente através do coeficiente de variação (CV). Para obtê-lo, cada amostra é processada múltiplas vezes e cada réplica é analisada separadamente obtendo um valor para a concentração do analito. Quanto menor o CV obtido,

maior a precisão do método. A exatidão do método também pode ser avaliada pela adição de padrão em amostras que devem apresentar teor final referente à soma do teor natural do elemento na amostra e o teor adicionado. Isto permite detectar interferências no método de quantificação. O erro analítico causado pela contaminação das amostras durante os processos de preparo também pode ser corrigido pelo uso de brancos, amostras sem o analito, nas quais são aplicados todos os processos utilizados nas amostras estudadas podendo também ser adicionados componentes da matriz da amostra (tudo da amostra que não é o analito) para se aproximar ao máximo da matriz real da amostra (SKOOG *et al.* 2004). Com estes parâmetros é possível avaliar a qualidade do método utilizado na análise química das amostras (WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2011).

## 2.5 Principais métodos de determinação de selênio

O selênio é um elemento, em geral, presente em pequenas quantidades no solo (em grande parte das regiões no mundo) (REIS, 2017), nas plantas e no organismo humano. Considerando os baixos teores, em geral, as amostras a serem analisadas, sejam de digeridos de solo ou de plantas (folhas, frutos, etc.), possuem baixas concentrações deste elemento, com exceção de amostras provenientes de regiões ricas em selênio ou de experimentos com adição de altos teores. Sendo assim, o método de determinação de selênio deve apresentar um baixo limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*).

A escolha do método analítico se baseia no tipo de amostra e no tipo de analito que se deseja quantificar. Um dos parâmetros a ser considerado é se o analito é uma espécie química elementar ou um composto molecular.

As técnicas mais utilizadas para análise elementar em baixas concentrações são a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GFAAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) e também a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS, do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*) (MARTINS *et al.*, 2017; SIGRIST *et al.*, 2012). A HGAAS é uma técnica muito utilizada na determinação de Se pois, utilizando os procedimentos de extração e pré-redução adequados, a técnica permite uma alta sensibilidade e baixos níveis de interferências (FOSTER; SUMAR, 1996; KOS; VEBER; HUDNIK, 1998). No entanto, a etapa de pré-redução dos extratos pode aumentar muito o fator de diluição das

amostras e, se o teor na amostra original for muito baixo, pode impossibilitar a quantificação por HGAAS.

As três técnicas citadas acima, normalmente necessitam de uma etapa prévia de abertura de amostra para transformar uma amostra sólida em um extrato líquido para que possa ser inserido no equipamento que fará a quantificação, exceto quando há a possibilidade de análise direta de amostras sólidas. Cabe mencionar que o processo de abertura de amostra deve prezar pela menor diluição e menor perda de analito possíveis (NAVARRO-ALARCÓN; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000). A abertura de amostra por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas é uma técnica mais rápida e mais precisa por utilizar menor quantidade de reagentes se comparada a outros métodos convencionais, possuindo, também, menor risco de contaminação (KOS; VEBER; HUDNIK, 1998). O processo também ocorre em sistema fechado, evitando perda de analitos por volatilização, fator importante para determinação de elementos voláteis, como o selênio.

## **2.6 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)**

A Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) é uma técnica analítica multielementar capaz de quantificar mais de 70 elementos químicos em poucos minutos, com apenas uma injeção da amostra. É possível a análise de amostras gasosas por injeção direta, amostras líquidas utilizando um nebulizador e também amostras sólidas utilizando o sistema de ablação a *laser* (LA-ICP-MS, do inglês *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Sem este sistema, as amostras sólidas podem ser analisadas por ICP-MS utilizando técnicas de abertura de amostras como solubilização direta da amostra ou decomposição ácida da mesma (SKOOG, 2004; THOMAS, 2008).

O plasma é um atomizador contínuo e permite o acoplamento com outras técnicas de análise como o sistema de injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) e a cromatografia em fase líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*). Outra técnica pode ser utilizada para substituição do nebulizador, o gerador de hidretos que utiliza a propriedade de alguns elementos em formar hidretos, que na forma gasosa, são introduzidos diretamente no plasma. A análise por ICP-MS de amostras líquidas utiliza um sistema de nebulização da amostra para misturar a solução com um gás de arraste na forma de um aerossol. O gás de arraste é, em geral, um gás inerte para evitar a sua interferência na análise. Usualmente é utilizado o argônio (Ar) (SKOOG, 2004; THOMAS, 2008).

O plasma pode ser definido como um gás parcialmente ionizado com concentração significativa de cátions e elétrons. Além de ser um gás inerte, o argônio também é utilizado no ICP pela capacidade dos íons argônio formados no plasma de absorverem potência de uma fonte externa suficiente para manter o plasma em temperaturas elevadas (10.000 K). O ICP utiliza uma fonte de radiofrequência (RF) devido às vantagens como sensibilidade e menor efeito de interferências. A RF atua sobre a tocha, uma tubulação de quartzo envolvida por uma bobina de indução e por onde passa o argônio e onde se forma o plasma. Quando as gotículas da amostra chegam ao plasma, em uma temperatura entre 6000 e 8000 K, ocorrem a dessolvatação e a vaporização de forma muito eficiente e a atomização do analito é muito alta, sendo assim, a sua eficiência muito maior do que em chamas (SKOOG, 2004; THOMAS, 2008).

Após a atomização e ionização no plasma, os íons gerados passam por uma interface antes de chegar ao analisador de massas. A interface é responsável por fazer a transição entre o plasma, que opera em pressão atmosférica, e o analisador de massas, que funciona à uma pressão de  $10^{-6}$  Torr. A interface é crucial para que uma grande fração dos íons formados no plasma cheguem até o analisador de massas. É formada por dois ou três cones, normalmente de níquel ou platina, conhecidos como amostrador (sampler), skimmer e hiper skimmer (SKOOG, 2004; THOMAS, 2008).

Durante o processo de atomização, até a nuvem de íons chegar ao analisador de massas, são gerados íons de fundo que também serão arrastados juntamente com os íons da amostra como o  $\text{Ar}^+$ ,  $\text{ArO}^+$ ,  $\text{ArH}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{O}^+$ , entre outros. Também podem ser gerados íons a partir de componentes da matriz amostral, do gás auxiliar, dos ácidos e solventes utilizados. Estes íons ainda podem reagir entre si formando íons poliatômicos que podem interferir na quantificação dos analitos de interesse (LUM; LEUNG, 2016; SKOOG, 2004). Os analisadores de massas são dispositivos que separam os íons do analito daqueles não desejados e dos íons interferentes. Existem vários tipos de analisadores de massa que utilizam diferentes métodos para a separação dos íons. Os mais utilizados em ICP-MS são os quadrupolos, de setor magnético e tempo de voo.

O quadrupolo é formado por 4 barras cilíndricas que são paralelas entre e si e ligadas a corrente contínua ou radiofrequência, formando um campo elétrico por onde os íons provenientes do plasma passam de forma a selecionar aqueles com razão massa/carga ( $m/z$ ) desejada, os demais, são dispersos. O quadrupolo possui resolução baixa e, portanto, não consegue separar os íons monoatômicos dos poliatômicos de razão massa/carga similares, o que pode gerar severas interferências e inexatidão nos resultados analíticos (SKOOG, 2004).

A análise por ICP-MS pode sofrer com algumas interferências que modificam os resultados obtidos. Lum e Leung (2016) discutem sobre as possíveis interferências que ocorrem e quais os métodos para se remover ou, ao menos, mitigar tais interferências. A interferência espectral se refere ao sinal gerado por íons monoatômicos ou poliatômicos isobáricos, ou seja, com a mesma razão massa/carga do analito de interesse. As espécies poliatômicas são formadas pela reação de elementos presentes no plasma, na matriz amostral ou nos reagentes utilizados no preparo de amostra como ácidos e solventes. Estes íons podem reagir após a atomização no plasma formando espécies poliatômicas com a mesma razão  $m/z$  dos analitos, causando a sobreposição do sinal. É difícil prever os interferentes da análise, especialmente aqueles provenientes da matriz da amostra.

Um exemplo clássico de interferência isobárica ocorre na determinação de selênio. O isótopo do selênio mais abundante naturalmente é o de massa 80 ( $^{80}\text{Se}$ ) com 49,82 % de abundância natural. Este isótopo tem interferência de  $^{79}\text{Br}^1\text{H}^+$ ,  $^{160}\text{Gd}^{++}$ ,  $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{64}\text{Ni}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}_2^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$  e  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{K}^+$ . Neste caso, o argônio proveniente do próprio plasma, assim como o cálcio e potássio naturalmente presentes em grandes quantidades em matrizes biológicas são os maiores contribuintes para formar os interferentes mencionados (LUM; LEUNG, 2016; SKOOG, 2004).

Algumas estratégias analíticas podem ser implementadas para eliminação de interferentes, como a escolha de um isótopo do analito que não tenha interferente. Esta opção, porém, pode não ser tão eficaz se o isótopo escolhido tiver abundância insignificante, o que afetaria diretamente os limites de detecção do analito. Outra opção é monitorar outro isótopo do íon interferente a fim de remover, matematicamente, a interferência a partir de uma equação matemática (LUM; LEUNG, 2016).

É possível, também, eliminar os interferentes utilizando etapas de preparo de amostra para separar o analito da matriz. Também podem ser adotadas estratégias como digestão da amostra, precipitação, separação cromatográfica, entre outras, incluindo a simples diluição da amostra. No entanto, processos adicionais no preparo de amostra podem ocasionar outros erros seja pela adição de novos interferentes ou perda de analito e, portanto, parâmetros como o nível de concentração e temperatura de ebulição do analito devem ser considerados para evitar a diluição excessiva e volatilização do analito, respectivamente (LUM; LEUNG, 2016).

Existem também técnicas de alteração no modo de introdução de amostra. Óxidos e hidróxidos podem ser interferentes difíceis de eliminar se tiverem origem na matriz da amostra. É possível, então, secar a amostra, removendo o solvente e introduzindo a amostra como um aerossol seco. Um dos métodos é a vaporização eletrotérmica (ETV, do inglês *Electrothermal*

*Vaporization*) que envolve etapas de secagem e formação do vapor da amostra. Além da remoção da água, que diminui a introdução dos óxidos e hidróxidos no plasma, o ETV também pode ser utilizado para remover as espécies com cloro e enxofre de amostras produzidas com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Além disso, a remoção do solvente também diminui o resfriamento do plasma causado por este. Além do ETV também pode ser utilizada a técnica de geração de hidretos, que remove os elementos de sua matriz. Este método, porém, pode ser utilizado somente para a determinação dos elementos formadores de hidretos. Por fim, pode ser também utilizada uma membrana de dessolvatação, que remove a água da amostra permitindo a redução da interferência por óxidos e hidróxidos (LUM; LEUNG, 2016).

Alguns analitos possuem interferentes provenientes do argônio utilizado no plasma. Estas espécies não podem ser eliminadas utilizando os métodos alternativos de introdução de amostra discutidos anteriormente. Portanto, são necessários outros métodos que corrijam esta fonte de erros sistemáticos. O primeiro deles é conhecido como plasma frio. Ao diminuir a potência da radiofrequência, a temperatura do plasma também é diminuída resultando na menor formação dos íons poliatômicos provenientes do plasma. A formação de outros interferentes também pode ser evitada, porém, este método funciona de maneira mais eficaz somente com analitos com primeira energia de ionização (EI) baixa (~ 7 eV). Analitos com EI maiores, como As (9,82 eV) e Se (9,75 eV) serão menos ionizados, diminuindo, portanto, a sensibilidade da análise para estes elementos (LUM; LEUNG, 2016).

Os equipamentos de ICP-MS dotados de quadrupolo, utilizam, também, uma câmara de colisão na qual é inserido um gás (hélio, por exemplo) que colide com os íons poliatômicos interferentes (normalmente são moléculas de maior volume molecular do que o analito). No entanto, as moléculas também irão colidir com o analito, diminuindo, portanto, a sensibilidade. A câmara também pode ser utilizada como câmara de reação, ou célula de reação dinâmica (DRC, do inglês *Dynamic Reaction Cell*), onde é inserido um gás (O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub> ou H<sub>2</sub>) que irá reagir seletivamente com o analito, formando espécies poliatômicas com razão m/z diferente, evitando assim a interferência, ou com as espécies interferentes para modificar a razão m/z destas. Na DRC, é possível remover as espécies interferentes modificando a vazão do gás de reação (LUM; LEUNG, 2016).

Todos os isótopos de selênio sofrem interferência de espécies poliatômicas, como ArAr<sup>+</sup> e ArCl<sup>+</sup>. Usualmente, a câmara de reação é utilizada para transformar os íons Se<sup>+</sup> em SeO<sup>+</sup>. Alternativamente, pode-se utilizar o CH<sub>4</sub> para reagir com as espécies interferentes modificando suas razões massa/carga. A câmara de colisão também pode ser utilizada com uma mistura dos gases H<sub>2</sub> e He que colidem com as espécies ArAr<sup>+</sup> e ArCl<sup>+</sup>. No entanto, em digestões que

possuem teor elevado de bromo, o uso de H<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub> pode favorecer a produção de BrH<sup>+</sup> que interfere na determinação dos íons <sup>80</sup>Se<sup>+</sup> e <sup>82</sup>Se<sup>+</sup> (LUM; LEUNG, 2016).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de grãos de arroz biofortificados utilizadas

As amostras utilizadas neste trabalho foram cedidas por Lessa e colaboradores. do trabalho intitulado “*Strategies for applying selenium for biofortification of rice in tropical soils and their effect on element accumulation and distribution in grains*” (LESSA, *et al.*, 2020). Este trabalho visou avaliar o efeito da adição de selenato de sódio ao solo (doravante denominado como SeS) e selenato (doravante denominado como SeVI) e selenito (doravante denominado como SeIV) de sódio aplicados via foliar para produção de grãos de arroz biofortificados. Foram avaliados os teores totais de Se no grão polido deste cereal, assim como atributos fisiológicos nas folhas e a distribuição espacial de Se e outros elementos nos grãos biofortificados. O plantio foi feito variando-se as doses de Se aplicadas (0, 5, 10, 20, 40 e 80 g ha<sup>-1</sup>). O ensaio foi executado em quadruplicata. O experimento foi executado em duas regiões diferentes, nos municípios de Lambari – MG (doravante denominado como LA) e Patos de Minas – MG (doravante denominado como PT). Foi realizado o beneficiamento e a moagem dos grãos de arroz e a determinação do teor total de Se foi feita nos extratos após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas usando-se 5,0 mL de ácido concentrado para a digestão de 0,5000 g de amostra previamente moída. O teor de Se nos extratos foi determinado por GFAAS com correção de fundo por efeito Zeeman. Os teores totais médios de selênio obtidos com a aplicação da maior dose do elemento nos grãos podem ser observados na tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Teor total de Se ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para a maior dose aplicada (480 mg kg<sup>-1</sup>)

<b>Tratamento</b>	<b>Lambari – MG</b>	<b>Patos de Minas – MG</b>
Selenato via solo	859 ± 81	577 ± 128
Selenato via foliar	2475 ± 173	1624 ± 69
Selenito via foliar	2221 ± 104	1312 ± 91

Fonte: LESSA *et al.* (2020)

Os autores (LESSA *et al.* 2020) utilizaram 4 amostras de plantas para cada tratamento e analisaram os grãos de arroz produzidos por cada uma das plantas. Para o presente estudo, foi produzida uma amostra composta a partir da mistura de partes iguais das quatro amostras originais a fim de obter uma porção representativa, o que também contribuiu para reduzir o esforço analítico na determinação das frações bioacessíveis. Foram utilizadas somente as amostras controle (sem aplicação de selênio, 0 mg kg<sup>-1</sup>), as de maiores doses de aplicação de

selênio ( $480 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e aquelas consideradas pelos autores como teor ótimo para consumo humano diário ( $240 \text{ mg kg}^{-1}$  para amostras SeS e  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  para SeVI e SeIV). As quatro amostras de cada tratamento foram misturadas formando uma amostra composta, para isso, foram utilizadas massas equivalentes, pesadas em balança semi-analítica de cada amostra, as quais foram homogeneizadas para obtenção de uma porção representativa das amostras originais. As amostras foram moídas em moinho analítico de bancada (IKA, A11 basic) com lâmina apropriada para moagem de grãos até obtenção de uma amostra totalmente pulverizada. Após este procedimento, massas equivalentes foram coletadas de cada amostra, transferidas para um tubo de centrífuga e homogeneizadas, formando, então, uma amostra composta para cada tratamento (método de aplicação, doses selecionadas e região de execução dos experimentos).

### 3.2 Determinação do teor total de selênio

Os experimentos do presente estudo foram executados no Laboratório Central de Química Ambiental (LCQA) da UFLA. Para a determinação do teor total de selênio nas amostras compostas de grão de arroz biofortificados,  $0,1000 \text{ g}$  de amostra previamente moída, em triplicata, foi pesado diretamente em tubos de digestão de teflon TFM<sup>®</sup>. Adicionou-se  $0,5 \text{ mL}$  de ácido nítrico (Vetec, RJ, Brasil) bidestilado em sistema de subdestilação (Distillacid, Berghof, Alemanha). As amostras ficaram em contato com o ácido à temperatura ambiente por  $15 \text{ h}$  consistindo em uma etapa de pré-digestão.

Após este tempo, foram adicionados  $0,5 \text{ mL}$  de água ultrapura (Milli-Q Integral 3, Merck, Alemanha) e  $2,0 \text{ mL}$  de peróxido de hidrogênio  $30 \text{ \% mm}^{-1}$  (Êxodo Científica, Brasil). Foi realizada uma digestão em um forno de micro-ondas (MARSxpress, CEM, EUA) utilizando-se o seguinte programa de aquecimento: i) rampa de aquecimento de  $10 \text{ minutos}$  até atingir a temperatura de  $175 \text{ }^\circ\text{C}$ ; ii) aquecimento por  $10 \text{ minutos}$  a  $175 \text{ }^\circ\text{C}$ ; iii) resfriamento. Os extratos foram, então, transferidos para tubos de centrífuga de  $50 \text{ mL}$  os quais foram diluídos com água ultrapura até o volume de  $50 \text{ mL}$  para obtenção de um extrato com acidez final e teor de sólidos dissolvidos aceitáveis para quantificação por ICP-MS (NexION 2000, Perkin-Elmer, EUA). As condições operacionais do ICP-MS são descritas na tabela 4.

Um material de referência certificado (BCR 402, *white clover*) contendo concentração certificada de selênio de  $6,70 \pm 0,25 \text{ mg kg}^{-1}$  foi digerido seguindo o mesmo procedimento acima mencionado e o digerido obtido foi analisado por ICP-MS juntamente com as amostras.

Para as análises por ICP-MS foi utilizada a câmara de reação dinâmica (DRC, do inglês *dynamic reaction cell*) com o objetivo de formar a espécie química  $\text{SeO}^+$  (razão massa/carga de 95,911) e realizar medidas analíticas em uma região espectral menos sujeita à presença de espécies poliatômicas que poderiam causar interferência isobárica na determinação de selênio em seus isótopos naturais. Para o uso da DRC, foi realizada uma otimização prévia do fluxo de gás oxigênio de alta pureza injetado na câmara. A otimização foi realizada segundo instruções da fabricante do aparelho utilizando a variação do fluxo de oxigênio entre  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$  e  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  com incrementos de  $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ . Os gráficos da otimização foram gerados usando a intensidade do sinal do analito monitorado ( $\text{SeO}^+$ ) e o limite de detecção estimado pelo equipamento pela análise de uma solução contendo de  $5,000 \mu\text{g L}^{-1}$  de selênio e do branco analítico, ambos preparados com  $1 \text{ \% vv}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  utilizando ácido concentrado e bidestilado.

Tabela 4 – Condições operacionais para a quantificação de Se por ICP-MS

Razão massa/carga monitorada:	96 ( $\text{SeO}^+$ )
Modo de scan:	<i>Peak hopping</i>
Canais de MCA:	1
Tempo de espera por AMV:	50 ms
Tempo de integração:	3000 ms
Correções:	---
Perfil:	Oxygen DRC
Fluxo de Oxigênio:	$1,2 \text{ mL min}^{-1}$
Fluxo de Argônio (plasma):	$15 \text{ L min}^{-1}$
Fluxo de Argônio (nebulizador):	$0,82 \text{ L min}^{-1}$
Fluxo de Argônio (auxiliar):	$1,2 \text{ L min}^{-1}$
RPa:	0
RPq:	0,7
Varreduras:	60
Medidas:	1
Repetições:	3

Fonte: Do autor (2022)

### 3.3 Avaliação da bioacessibilidade de selênio

O método utilizado para a avaliação de bioacessibilidade do selênio no arroz foi o método *in vitro* descrito por Horner e Beauchemin (2013) com algumas modificações. O

método *in vitro* foi escolhido devido à sua maior simplicidade, melhor reprodutibilidade devido ao maior controle sobre as variáveis do processo e por possibilitar a simulação separadamente de cada etapa da digestão, permitindo o estudo de cada uma ao invés de somente uma determinação que envolvesse todo o trato digestivo (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). O método adotado simula o sistema gastrointestinal de forma sequencial mimetizando as reações bioquímicas. O método proposto por Horner e Beauchemin simula a fase oral utilizando solução de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ). A fase gástrica é simulada utilizando uma solução de pepsina, cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ). E a fase intestinal com uma solução de pancreatina,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NaOH}$ . Em cada fase, a amostra fica em contato com a solução simuladora em temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$  durante o período de duas horas, com exceção da fase oral (10 minutos), a fim de simular a temperatura e o tempo de digestão no corpo humano. A proporção ( $\text{m v}^{-1}$ ) entre massa de amostra e solução extratora foi mantida em 1:6 utilizando 0,5 g de grão de arroz moído para 3 mL de cada solução.

Uma modificação foi feita no método proposto buscando aproximar ainda mais a simulação ao que ocorre no organismo humano. O arroz branco polido, utilizado no experimento, possui um teor médio de amido de aproximadamente 88 %  $\text{m m}^{-1}$  (WALTER; MARCHEZAN; DE AVILA, 2008). Sabe-se que a saliva possui amilase, que catalisa a decomposição do amido, ou seja, a digestão do amido do arroz se inicia na etapa oral da digestão devido a esta enzima. Considerando, então, o alto teor de amido na amostra utilizada, foi acrescentada à solução salivar simulada a enzima amilase, com atividade de 75 U/min (BRODKORB *et al.*, 2019; MINEKUS *et al.*, 2014). Para tanto, foram utilizados 2,15 g de  $\alpha$ -amilase (Sigma-Aldrich) para produção de 250 mL de solução salivar simulada (PRATES, 2018).

Foram preparados 250 mL de cada solução simulada utilizando água ultrapura. No preparo da solução salivar simulada foram utilizados 2,15 g de  $\alpha$ -amilase (Sigma-Aldrich), 1,7 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (99,5% de pureza, Merck, Alemanha) e 0,154 g de  $\text{NaOH}$  (99% de pureza, Vetec, Brasil). A solução gástrica simulada foi preparada utilizando 0,5 g de  $\text{NaCl}$  com 99% de pureza (Dinâmica, Brasil), 0,8 g de pepsina (CAS 9001-75-6, Sigma-Aldrich) e 1,75 mL de  $\text{HCl}$  concentrado (Êxodo, Brasil) destilado em sistema de subdestilação (DistillAcid, Berghof, Alemanha). A solução intestinal simulada foi produzida com 1,7 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (99,5% de pureza, Merck, Alemanha), 0,154 g de  $\text{NaOH}$  (99% de pureza, Vetec, Brasil) e 2,5 g de pancreatina (CAS 8049-47-6, Sigma-Aldrich). O método é apresentado na forma de um fluxograma na figura 3.

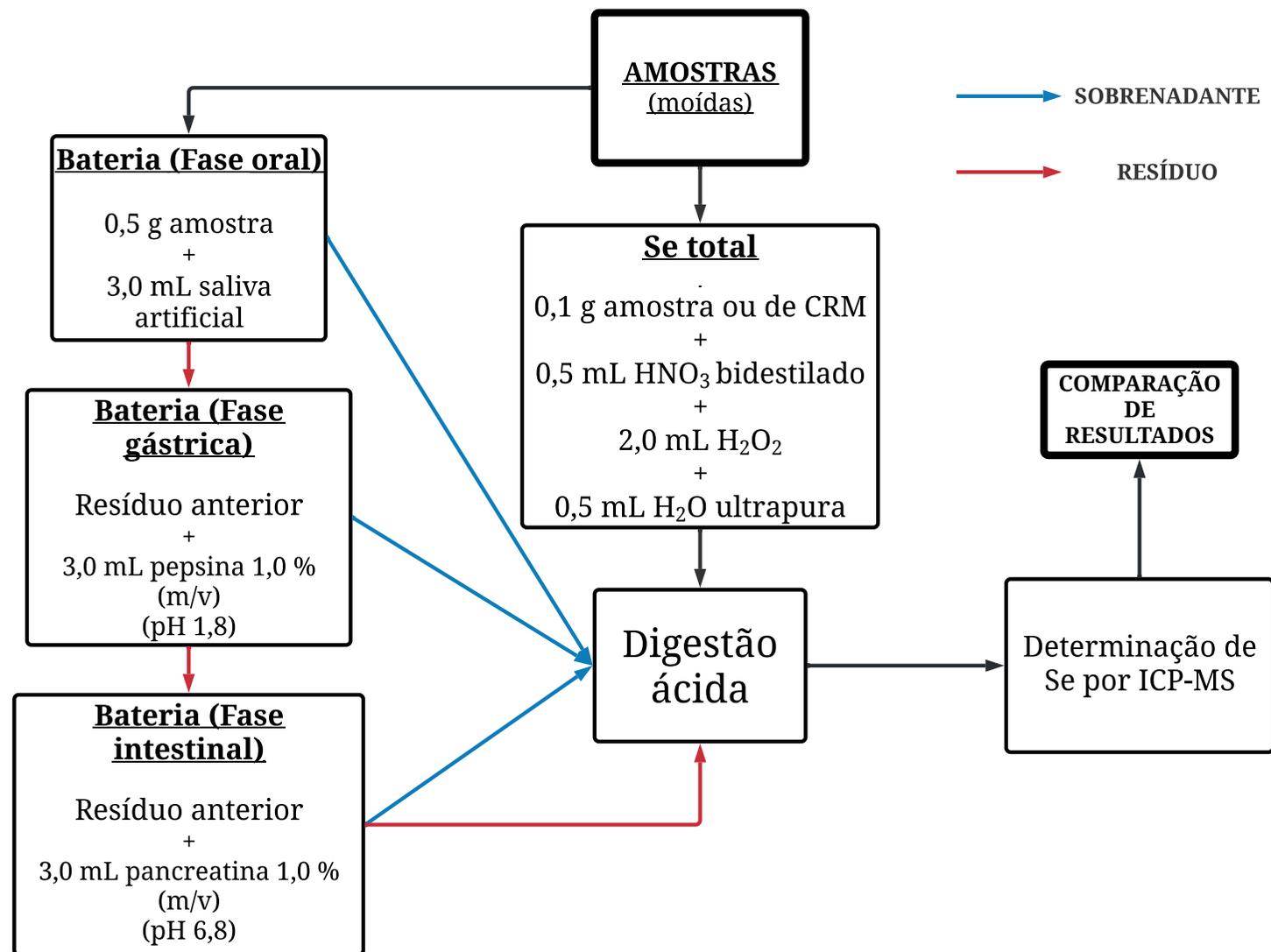
Para o controle preciso de temperatura em 37 °C em cada uma das etapas do ensaio de bioacessibilidade, um banho-maria com agitação orbital tipo Dubnoff (Nova técnica, Brasil) foi utilizado. Para a separação do sobrenadante em cada uma das fases da extração, uma centrífuga (C312, Jouan, Thermo Scientific, EUA) foi utilizada com rotação de 3000 rpm por 15 minutos. Após a simulação da fase intestinal, os resíduos sólidos foram secos em estufa (NL80/180, New Lab, Brasil) à temperatura de 60 °C para, posteriormente, ser feita a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas dos resíduos obtidos.

O teor de Se bioacessível foi calculado pela equação 1:

$$Se_{\text{bioacessível}} = \frac{(Se_{\text{oral}} + Se_{\text{gástrico}} + Se_{\text{intestinal}})}{Se_{\text{total}}} \times 100 \quad (1)$$

A figura 3 mostra a sequência analítica adotada neste trabalho. As setas azuis e vermelhas representam respectivamente o sobrenadante e o resíduo sólido obtidos em cada etapa após a centrifugação e separação. O resíduo final de cada método foi digerido e analisado para obtenção da soma das frações que representa o teor total de selênio na amostra. Os extratos de cada etapa simulada da digestão também passaram por digestão ácida antes de serem analisadas por ICP-MS, como visto no fluxograma da figura 3. Portanto, após o tempo previsto de extração para cada etapa da digestão, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro frasco e 1,0 mL de extrato foi digerido em forno micro-ondas com 1,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado bidestilado e mais 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % mm<sup>-1</sup>. O programa de aquecimento foi o mesmo descrito anteriormente para as amostras sólidas. Posteriormente, os digeridos foram avolumados para 50 mL com água ultrapura.

Figura 3 – Fluxograma da parte experimental



Fonte: Do autor (2022)

### 3.4 Otimização dos métodos de determinação de selênio total e bioacessível

A seleção do valor de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para a vazão de oxigênio na DRC foi feita após a etapa de otimização em que se observou simultaneamente a maior intensidade para a razão massa/carga correspondente ao íon SeO<sup>+</sup> e o menor limite de detecção estimado pelo software do equipamento (Syngistix™, Perkin-Elmer). As curvas referentes aos dados obtidos com o ensaio de otimização podem ser visualizadas na figura 4.

No presente estudo, o limite de detecção (LOD) para a determinação de Se no ICP-MS foi calculado por 3,3 vezes o valor do BEC (*Background Equivalent Concentration*) multiplicado pelo CV da medida de 10 brancos e dividido por 100 (equação 2). O valor de BEC representa a concentração do analito que produz uma razão sinal-ruído equivalente a um (THOMSEN, 2012). O valor de BEC é calculado segundo a equação 3.

$$\text{LOD} = (3,3 \times \text{BEC} \times \text{CV}_{\text{brancos}}) / 100 \quad (2)$$

$$\text{BEC} = (C_H - I_B) / (I_H - I_B) \quad (3)$$

Onde C<sub>H</sub> corresponde à concentração do maior ponto da curva analítica, I<sub>B</sub> é a intensidade média dos sinais obtidos pelas medidas dos brancos e I<sub>H</sub> é a intensidade do sinal do maior ponto da curva analítica. O limite de quantificação (LOQ) foi calculado conforme a equação 4.

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD} \quad (4)$$

Um parâmetro estatístico importante, o erro quadrático médio de predição (MSEP, do inglês *mean square error of prediction*) foi proposto por Allen (1971). Tal critério foi originalmente concebido para a seleção de variáveis e vem sendo usado atualmente em um grande número de abordagens de tratamento estatístico de dados. Ao se obter a raiz quadrada de MSEP, obtém-se um número (RMSEP, *root mean square error of prediction*) que detém a mesma unidade do mensurando. O valor de RMSEP é calculado segundo a equação 5.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (5)$$

Onde  $y_i$  é a concentração real de selênio determinada por ICP-MS,  $\hat{y}_i$  é a concentração de selênio teórica e  $n$  é o número de pontos da curva analítica.

Também foi avaliada a precisão dos resultados através do coeficiente de variação (CV) de 10 medidas consecutivas de um padrão analítico na concentração de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de selênio. A avaliação foi realizada em cada um dos meios investigados (determinação do teor total, extração da fase oral, gástrica e intestinal) sendo feita a adição do padrão antes da digestão ácida das soluções extratoras.

Foi utilizado, também, o material de referência certificado (BCR-402, *white clover*) cujo teor total de selênio é de  $6,7 \pm 0,25 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $n = 15$ ) para avaliação da exatidão do método utilizado para determinação do teor total de selênio nas amostras de arroz. O valor obtido na determinação foi de  $6,3 \pm 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $n = 6$ ), o que representa  $94 \pm 7 \%$  do valor certificado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização e parâmetros analíticos de desempenho do método de quantificação de selênio por ICP-MS

Há várias publicações científicas em que abordagens analíticas modernas são adotadas para minimizar a interferência espectral na determinação de Se em amostras de materiais biológicos por ICP-MS. Zhang *et al.* (2020) utilizaram HPLC-ICP-MS para a análise de especiação química de selênio em amostras de músculo de porcos tratados com diferentes doses do elemento. Foi utilizado o gás He (modo colisional) como forma de minimizar interferências nas medidas das razões  $m/z$  correspondentes aos íons dos isótopos  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{80}\text{Se}$  e  $^{82}\text{Se}$ . Os autores calcularam o limite de detecção para o teor total de selênio e o limite de quantificação como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão do menor valor da curva analítica de calibração. Encontraram os valores de  $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$  (LOD) e  $0,12 \mu\text{g kg}^{-1}$  (LOQ). LeBlanc, Ruzicka e Wallschläger (2016) utilizaram HPLC-ICP-MS para a análise de especiação química de selênio em água e obtiveram um limite de detecção de  $5 \text{ ng L}^{-1}$  para todas as espécies químicas. Wei *et al.* (2014) validaram um método para a determinação de Se, As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr e Zn por ICP-MS após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em amostras de arroz enriquecidas em selênio. A estratégia adotada para a redução de interferência para a determinação de selênio (na razão massa/carga = 80) foi o uso do metano na DRC para eliminar a interferência causada pelas espécies químicas  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$  e  $^{79}\text{Br}^1\text{H}^+$ . Ródio foi usado como padrão interno para a correção de efeitos matriciais. Um material de referência certificado de arroz (GBW 10010) foi utilizado para verificar a exatidão do método, obtendo-se recuperações entre 85 e 108 %. Os valores mínimo e máximo encontrados para selênio nas amostras analisadas foi de  $0,042$  e  $0,100 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente.

Hirtz e Günter (2020) avaliaram diferentes métodos comumente utilizados para a remoção de interferentes na determinação do teor total de selênio em amostras de suplementos dietéticos. As amostras foram digeridas com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em forno micro-ondas. A determinação do teor total de selênio foi realizada por ICP-MS com câmara de reação/colisão. Foi utilizada uma solução de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ge como padrão interno para correção do sinal do analito. Os autores compararam os métodos padrão (sem utilização da câmara de reação/colisão), DRC com gás  $\text{CH}_4$  ( $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ ) e KED com gás He ( $4 \text{ mL min}^{-1}$ ). Foram monitoradas as razões massa/carga correspondentes aos íons  $^{82}\text{Se}^+$ ,  $^{78}\text{Se}^+$  e  $^{80}\text{Se}^+$ , além do íon

$^{74}\text{Ge}^+$  como padrão interno. A determinação de selênio no material de referência certificado (levedura enriquecida com selênio, SELM-1, *Selenium enriched yeast*, valor certificado de  $2059 \pm 64 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Se}$ ) obteve resultados dentro da faixa tolerável (erro menor que 15 %) em todos os métodos, mas os autores concluíram que o modo de determinação mais robusto foi aquele em que foi monitorada a m/z referente ao íon  $^{78}\text{Se}^+$  com KED.

Sucharová (2011) otimizou um método para remoção de interferentes na determinação do teor de selênio em plantas. A autora utilizou diversos materiais de referência certificados para o controle de qualidade analítico. A digestão assistida por radiação micro-ondas envolveu o uso de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Foi utilizado o ródio (Rh) como padrão interno para o método padrão (ICP-MS) e o índio (In) para o método DRC-ICP-MS. Foram testados os gases de reação  $\text{NH}_3$  e  $\text{CH}_4$ . A reação com o metano foi eficaz na eliminação da interferência causada por íons poliatômicos como  $^{40}\text{Ar}_2^+$  e  $^{40}\text{Ca}^{40}\text{Ar}^+$  quando monitorado o íon  $^{80}\text{Se}^+$ . O método, porém, não obteve bons resultados na remoção da interferência de íons de carga dupla como  $^{160}\text{Dy}^{2+}$ ,  $^{161}\text{Dy}^{2+}$ ,  $^{160}\text{Gd}^{2+}$  e  $^{159}\text{Tb}^{2+}$ . A determinação de Se nos materiais certificados, monitorando o íon  $^{80}\text{Se}^+$ , ainda tiveram grande interferência do íon  $^1\text{H}^{79}\text{Br}^+$ . Monitorando o íon  $^{78}\text{Se}^+$  com gás  $\text{NH}_3$  na câmara de reação, a recuperação do teor determinado para o valor certificado foi entre 87 e 113 % para todos os materiais de referência certificados utilizados. Para este íon monitorado, ambos os gases de reação foram eficazes na remoção de interferentes poliatômicos de carga única, porém, o  $\text{CH}_4$  não foi eficiente na remoção dos íons interferentes para o íon  $^{78}\text{Se}^+$  também. O  $\text{CH}_4$  pode também interferir na determinação de  $\text{Se}^+$  devido à parcial conversão destes íons em  $\text{SeH}^+$ , diminuindo, portanto, o sinal produzido. Assim sendo, a reação com gás  $\text{NH}_3$  foi mais eficaz na remoção de interferentes de carga dupla, mas pode gerar também interferentes devido à formação de íons como  $^{61}\text{Ni}^{17}\text{NH}_3^+$ ,  $^{44}\text{Ca}^{34}(\text{NH}_3)_2^+$  e  $^{46}\text{Ti}^{32}\text{NH}(\text{NH}_3)^+$  dependendo da matriz da amostra analisada. O método pode então ser otimizado alterando o fluxo de gás na câmara de reação e os valores de RPa e RPq para evitar a formação de novos produtos. Ainda assim, a autora julga este método como adequado para determinação de rotina para selênio em plantas.

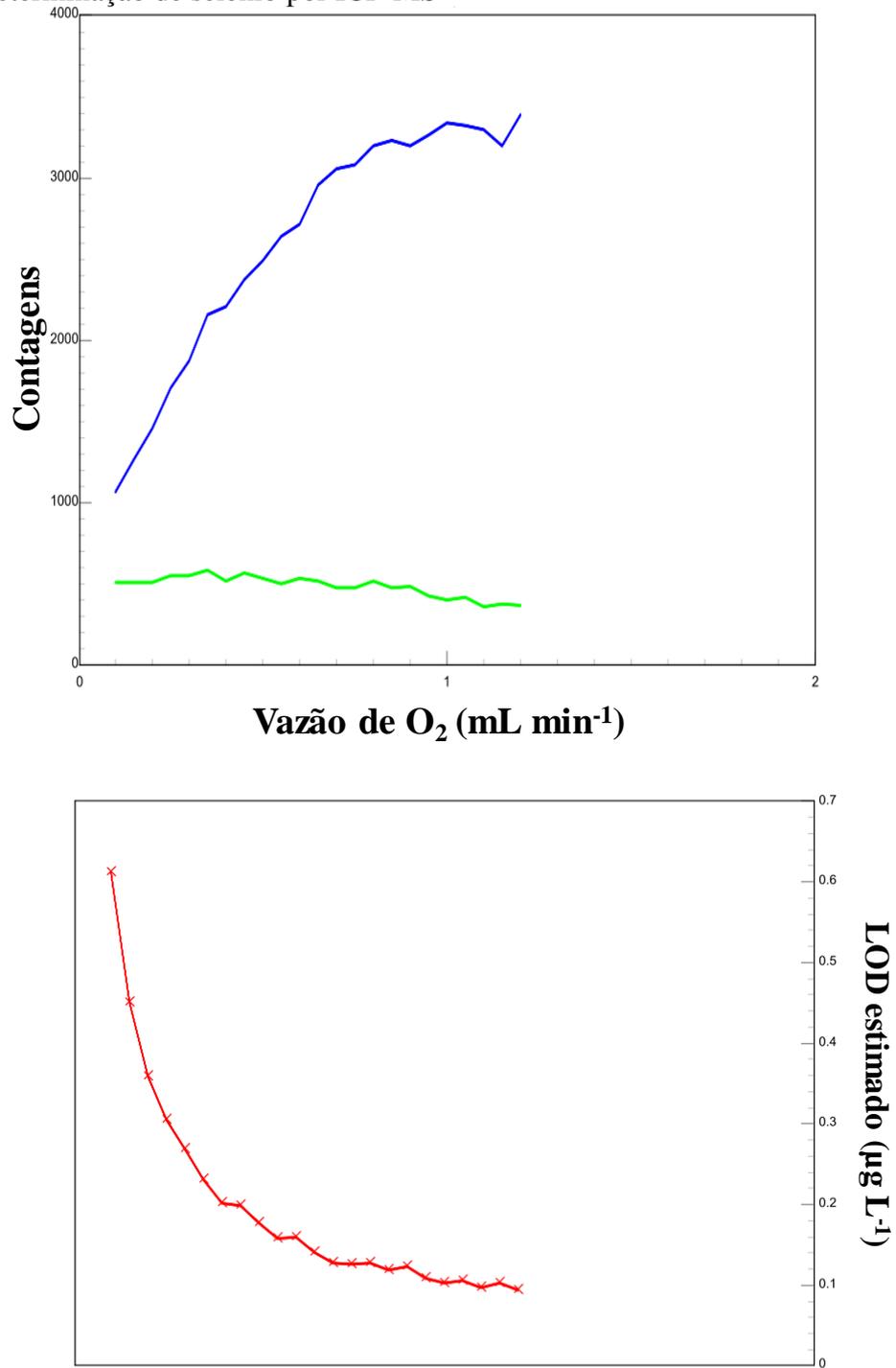
Os limites de detecção encontrados para a determinação de selênio em cada etapa do teste de bioacessibilidade pelo método sequencial são mostrados na tabela 5. Para o teor total, foi encontrado LOD de  $13,50 \text{ ng L}^{-1}$ , valor este, próximo ao encontrado na literatura.

Tabela 5 – Parâmetros analíticos de desempenho para a determinação quantitativa de selênio por ICP-MS

<b>Método</b>	<b>LOD (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>RMSEP</b>	<b>r</b>	<b>Faixa de calibração (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Equação da reta</b>
Teor total	13,50	40,49	19,82	1,0000	50 – 10000	1,11%	3,972 x + 86,641
Fase oral	19,77	59,31	24,03	1,0000	100 – 10000	1,23%	2,347 x - 5,664
Fase gástrica	31,95	95,84	48,79	0,9999	100 – 10000	1,02%	2,323 x + 59,746
Fase intestinal	31,50	94,49	33,77	0,9999	100 – 10000	1,01%	2,041 x + 33,510

Fonte: Do autor (2022)

Figura 4 – Otimização do fluxo de gás oxigênio na câmara de reação dinâmica (DRC) para determinação de selênio por ICP-MS



Legenda: Otimização do fluxo entre 0,1 e 1,2 mL min<sup>-1</sup> com variação de 0,05 mL min<sup>-1</sup> por etapa. A linha azul representa a intensidade do íon SeO<sup>+</sup>, a linha verde, a intensidade do íon na solução branco e a linha vermelha representa o limite de detecção estimado para cada valor de vazão de gás na DRC.

Fonte: Do autor (2022)

Os limites de detecção e quantificação obtidos para a determinação de selênio em cada etapa do ensaio de bioacessibilidade foram significativamente diferentes devido à composição química variada dos extratores utilizados em cada etapa do ensaio de bioacessibilidade. Isto mostra a importância da estratégia de compatibilização de matriz na construção das curvas de calibração geradas pela digestão ácida dos brancos analíticos correspondentes a cada um dos extratores utilizados nas etapas do ensaio. O efeito matricial também pôde ser constatado pelas diferentes inclinações observadas para as curvas analíticas de calibração (sensibilidade), especialmente a curva preparada em meio de  $\text{HNO}_3$  1 %  $\text{vv}^{-1}$  quando comparada com as demais.

Foram calculados os valores de RMSEP (Tabela 5) para cada uma das curvas de calibração: i) total; ii) oral; iii) gástrica e iv) intestinal. Os valores encontrados para o RMSEP para cada etapa do ensaio de bioacessibilidade estão próximos dos valores obtidos para os respectivos limites de detecção, o que é um indício de que as medidas realizadas acima do limite de quantificação estão sujeitas a erros de predição aceitáveis. Observou-se, também, que o CV das medidas ficou próximo de 1 % (tabela 5), o que atesta a adequada precisão das medidas.

O teste t de Student foi usado para verificar se a soma do teor de selênio nos extratos do método sequencial foi estatisticamente igual ao valor determinado para a determinação de selênio total (na amostra integral). Não foram observadas diferenças significativas com 95% de confiança entre o teor total de selênio e a somatória do teor extraído em cada etapa do método sequencial. Os valores são mostrados na tabela 6.

Tabela 6 – Comparação da soma dos teores extraídos pelo método sequencial e o teor total de selênio nas amostras de arroz

Aplicação <sup>1</sup>	Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	Região <sup>2</sup>	Soma sequencial (µg kg <sup>-1</sup> )	Se total (µg kg <sup>-1</sup> )	% Recuperação
SES	240	LA	360 ± 13	329 ± 14	110 %
SES	480	LA	830 ± 15	783 ± 14	106 %
SEVI	120	LA	557 ± 0,00	556 ± 63	100 %
SEVI	480	LA	2071 ± 257	1778 ± 231	116 %
SEIV	120	LA	596 ± 22	552 ± 62	108 %
SEIV	480	LA	2322 ± 54	2140 ± 200	109 %
SES	240	PT	288 ± 22	300 ± 24	96 %
SES	480	PT	581 ± 39	592 ± 34	98 %
SEVI	120	PT	570 ± 32	600 ± 66	95 %
SEVI	480	PT	2032 ± 37	2135 ± 228	95 %
SEIV	120	PT	614 ± 41	570 ± 81	108 %
SEIV	480	PT	2424 ± 13	2316 ± 27	105 %

<sup>1</sup> SES = Selenato via solo; SEVI = Selenato via foliar; SEIV = Selenito via foliar

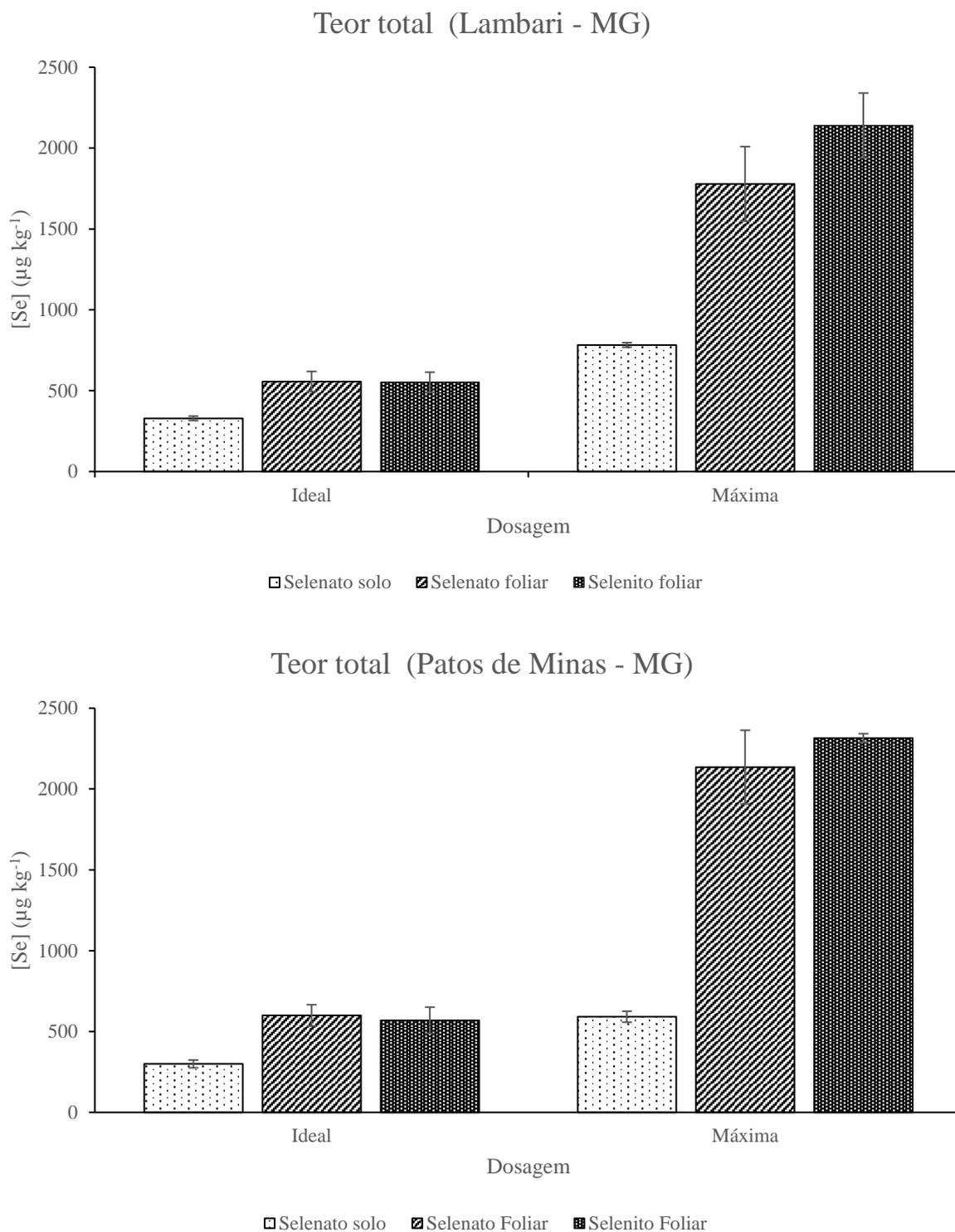
<sup>2</sup> LA = Lambari – MG; PT = Patos de Minas – MG

A proximidade entre os valores obtidos pela soma das etapas do método sequencial e do teor total de selênio nas amostras de arroz biofortificadas (tabelas 9 e 10) mostra que a estratégia de compatibilização de matriz foi eficaz na eliminação das interferências passíveis de serem causadas por concomitantes presentes nas soluções extratoras do ensaio de bioacessibilidade *in vitro*. Além disso, os parâmetros analíticos de desempenho calculados permitem concluir que o método proposto no presente estudo foi satisfatório para alcançar os objetivos deste trabalho.

#### **4.2 Teores totais de selênio**

Os resultados obtidos pela quantificação do teor total de selênio nos grãos de arroz por ICP-MS após digestão ácida das amostras foram condizentes com os resultados do trabalho de Lessa *et al.* (2020). É possível observar na figura 5 que a aplicação de selênio via foliar foi mais eficiente no acúmulo do elemento nas plantas. Não houve, no entanto, diferença estatística entre o teor acumulado após aplicação via foliar de selenito e selenato de sódio. Este resultado foi confirmado pela soma dos teores determinados no método sequencial.

Figura 5 – Teor total de selênio em grãos de arroz por método de aplicação e por região



Fonte: Do autor (2022)

A dosagem ideal, mostrada na figura 5, representa a aplicação de  $240 \text{ mg kg}^{-1}$  de selenato de sódio via solo e de  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  para os tratamentos com selenato e selenito de sódio

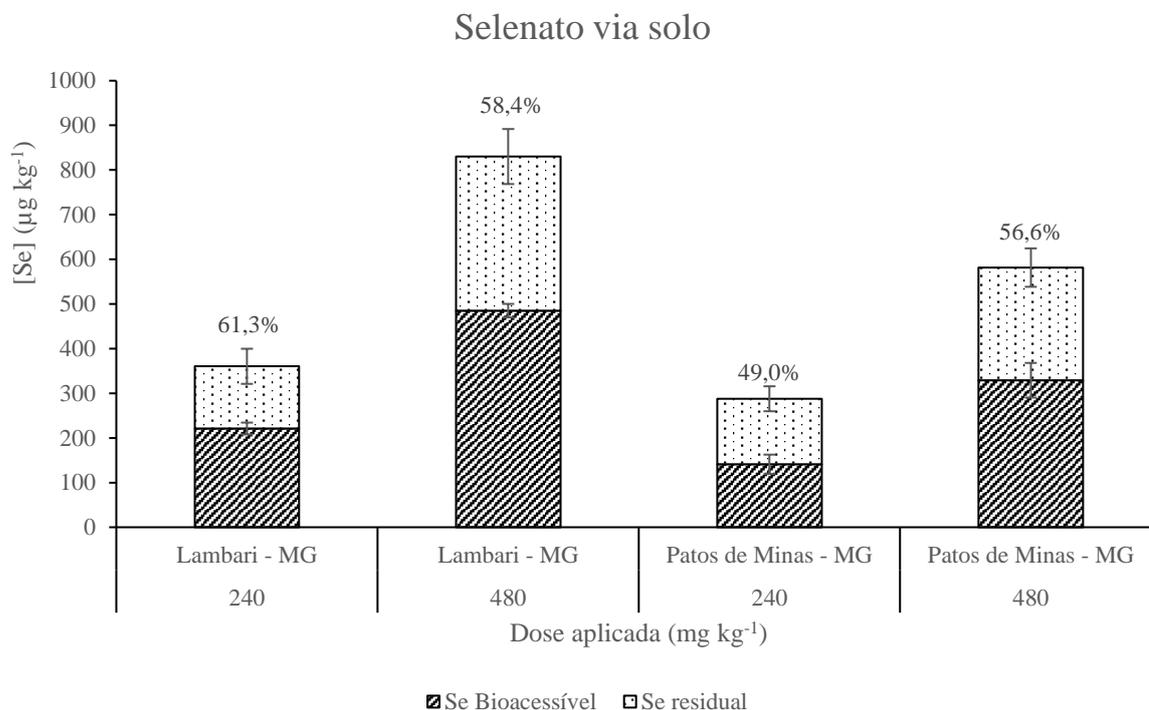
via foliar. É possível afirmar que o teor de selênio acumulado na planta é maior para os tratamentos via foliar em relação à aplicação via solo.

Segundo a revisão de Galić *et al.* (2021), a biofortificação de selênio em cereais, como trigo, arroz e milho, tem maior eficiência quando utilizada a aplicação foliar quando comparada a aplicação via solo. A absorção de selênio pela planta é menos eficiente após a aplicação no solo devido à retenção do elemento neste, ficando menos acessível às plantas. Portanto, a aplicação de selênio via foliar utiliza menor quantidade de sais de selênio. A forma aplicada do elemento também influencia na absorção pelas plantas. O levantamento feito por Galić mostra que o selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ) tem melhor absorção em comparação com o selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), em geral, devido à maior translocação e transformação para a forma orgânica do elemento na planta na forma de  $\text{Se}^{+6}$ , outro motivo é a maior retenção de selenito quando utilizada a aplicação no solo.

### **4.3 Teores de selênio bioacessível**

As figuras 6, 7 e 8 mostram os teores de selênio extraídos da amostra nas três etapas simuladas da digestão, oral, gástrica e intestinal, comparados ao teor total de selênio no grão, calculado pela soma do teor extraído com o teor residual após digestão ácida do resíduo sólido posterior à extração para cada método de aplicação.

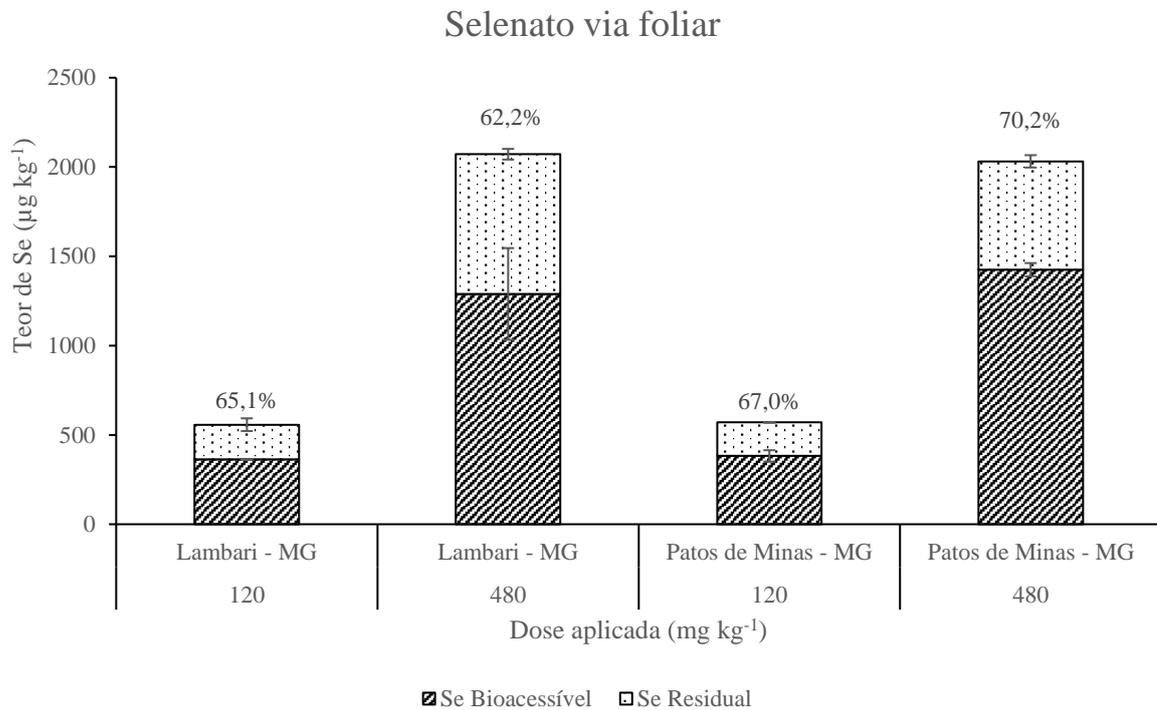
Figura 6 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz após biofortificação com selenato via solo



Fonte: Do autor (2022)

Observando os resultados para a aplicação de selenato de sódio via solo (figura 6), é possível notar que a bioacessibilidade do selênio foi de 56,33 % do teor total nos grãos, sendo que a média para o experimento de Lambari – MG foi de 59,85 % e de Patos de Minas – MG, de 52,80 %. Realizando a análise de variância (ANOVA) com dois fatores (tabela 11) e o teste de Tukey (tabela 12), foi verificada a diferença estatística com nível de confiança de 95 % entre os teores bioacessíveis entre os municípios de Lambari – MG e Patos de Minas – MG. O motivo para a diferença entre os teores bioacessíveis de cada região não foram estudados neste trabalho. Não há diferença estatística, com 95% de confiança, entre os teores bioacessíveis em relação às diferentes doses aplicadas.

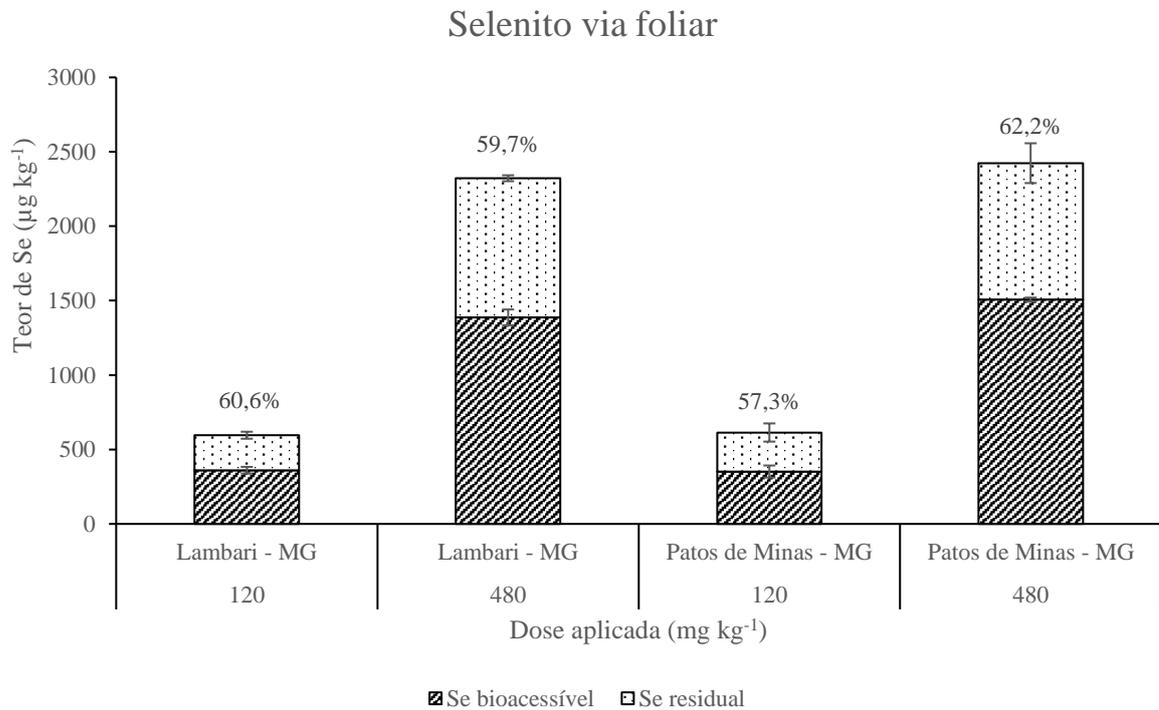
Figura 7 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz após biofortificação com selenato via foliar



Fonte: Do autor (2022)

O teor de selênio bioacessível após aplicação de selenato via foliar (figura 7) teve média de 66,13 %, sendo que no município de Lambari – MG a média foi de 63,65 % e em Patos de Minas – MG, 68,60 %. Utilizando a análise de variância (ANOVA) em dois fatores (tabela 13) e o teste de Tukey (tabela 14), foi observado que, para 95 % de confiança, não há diferença significativa entre os teores bioacessíveis entre doses e entre regiões de experimento para a aplicação de selenato de sódio via foliar.

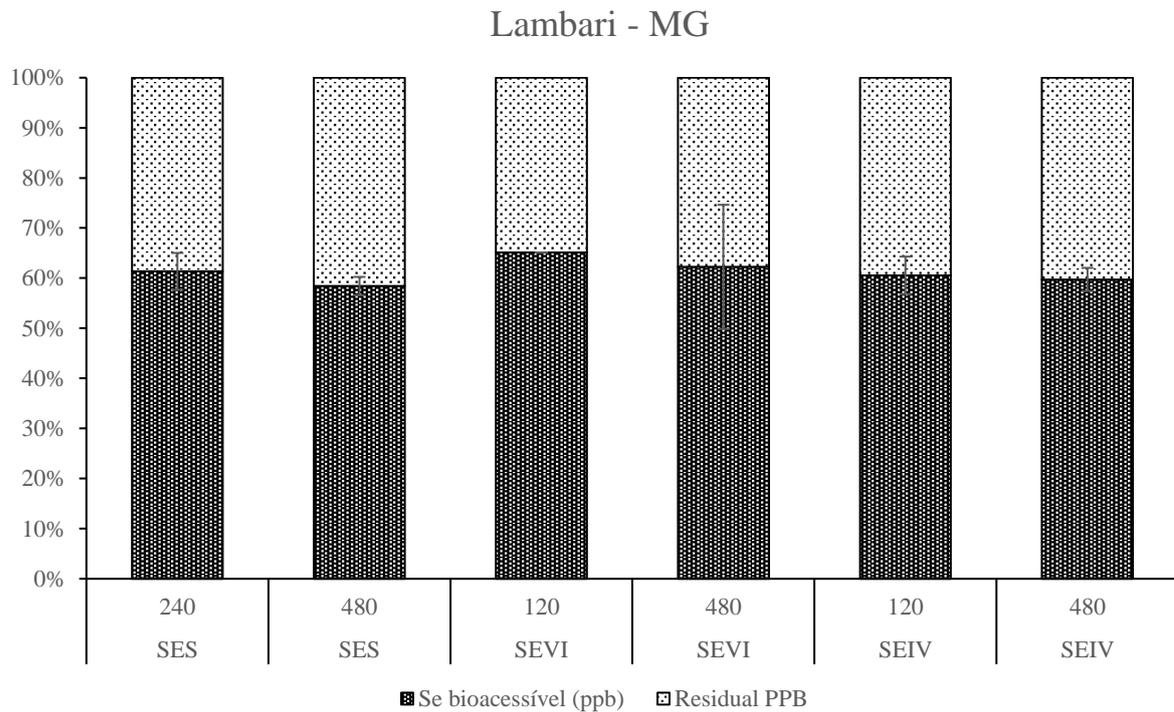
Figura 8 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz após biofortificação com selenito via foliar



Fonte: Do autor (2022)

O teor de selênio bioacessível após aplicação de selenito via foliar (figura 8) teve média de 59,95 %, sendo que no município de Lambari – MG a média foi de 60,15% e em Patos de Minas – MG, 59,75 %. Utilizando a análise de variância (ANOVA) em dois fatores (tabela 15) e o teste de Tukey (tabela 16), foi observado que, para 95% de confiança, não há diferença significativa entre os teores bioacessíveis entre doses e entre regiões de experimento para a aplicação de selenato de sódio via foliar.

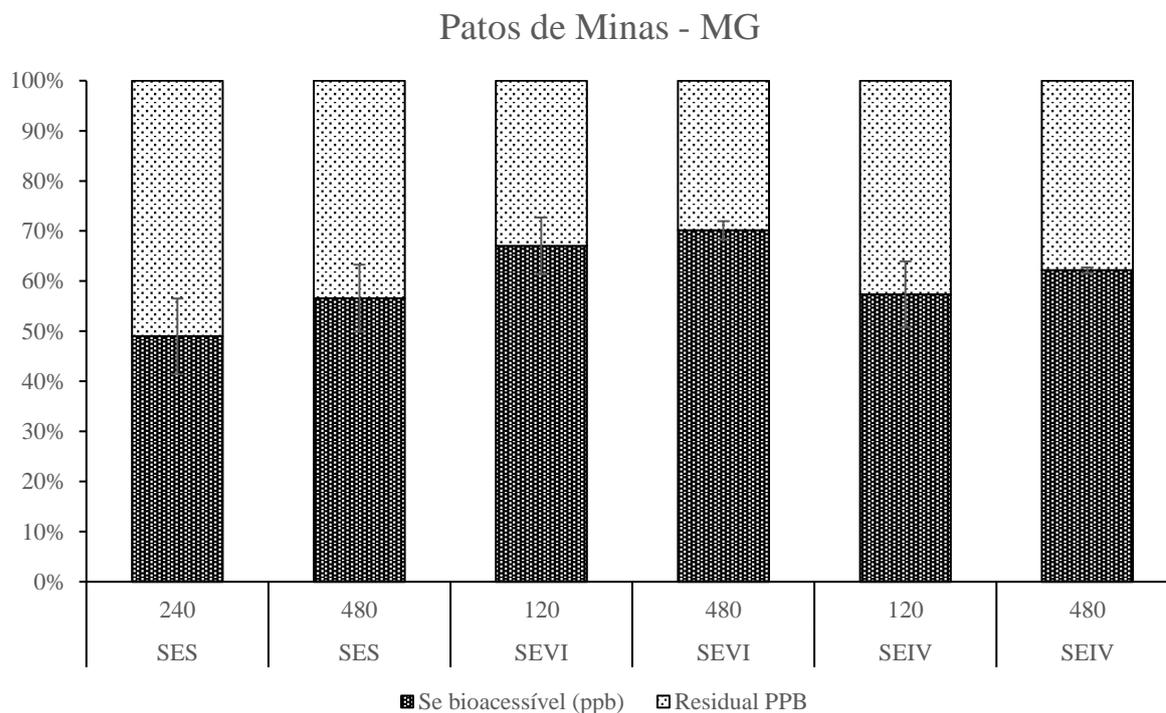
Figura 9 - Bioacessibilidade de selênio em grãos de arroz para os três tipos de aplicação para o experimento de Lambari – MG



Fonte: Do autor (2022)

Avaliando os teores bioacessíveis de selênio das três formas de aplicação no experimento conduzido no município de Lambari – MG (figura 9) é possível observar, pela aplicação da avaliação de variância (ANOVA) (tabela 17) e do teste de Tukey (tabela 18) que, para 95 % de confiança, não existe diferença significativa entre as doses aplicadas ou entre as formas de aplicação do selênio inorgânico à planta. O teor bioacessível médio de selênio nos grãos cultivados no experimento de Lambari – MG foi de  $61 \pm 5\%$ .

Figura 10 - Bioacessibilidade de selênio em grãos de arroz para os três tipos de aplicação para o experimento de Patos de Minas – MG



Fonte: Do autor (2022)

Já na avaliação das formas de aplicação de selênio inorgânico no experimento conduzido no município de Patos de Minas – MG (figura 10), o teste de Tukey apontou, com confiança de 95%, a diferença estatística entre a bioacessibilidade do selênio entre as doses máximas e doses ponderadas, aquelas apontadas como ideais de aplicação no trabalho de Lessa *et al.* (2020), sendo que a bioacessibilidade foi maior para a maior dose aplicada em relação à menor. Também é observada a diferença estatística, com 95 % de confiança, entre a aplicação via solo e as aplicações via foliar, na qual as aplicações via foliar apresentam maior bioacessibilidade do selênio em relação à aplicação via solo.

A fração bioacessível do selênio no grão de arroz biofortificado tem média de  $61 \pm 11$  % do teor total, analisando todas as formas de aplicação nas duas regiões onde o experimento foi realizado. As amostras controle, em que não foi adicionado selênio, não foram computadas pois apresentaram erro elevado entre as análises, que pode ser atribuído às baixas concentrações de selênio presentes nestas amostras. A fração bioacessível encontrada está próxima do que é reportado na literatura para bioacessibilidade de selênio em arroz (GONG *et al.*, 2018; JAISWAL *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2017). Muleya *et al.* (2021) avaliaram a bioacessibilidade de selênio em grãos de milho, feijão frade e amendoim pela digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, utilizando solução de  $\alpha$ -amilase ( $75 \text{ U mL}^{-1}$ ) para a simulação da fase oral, pepsina

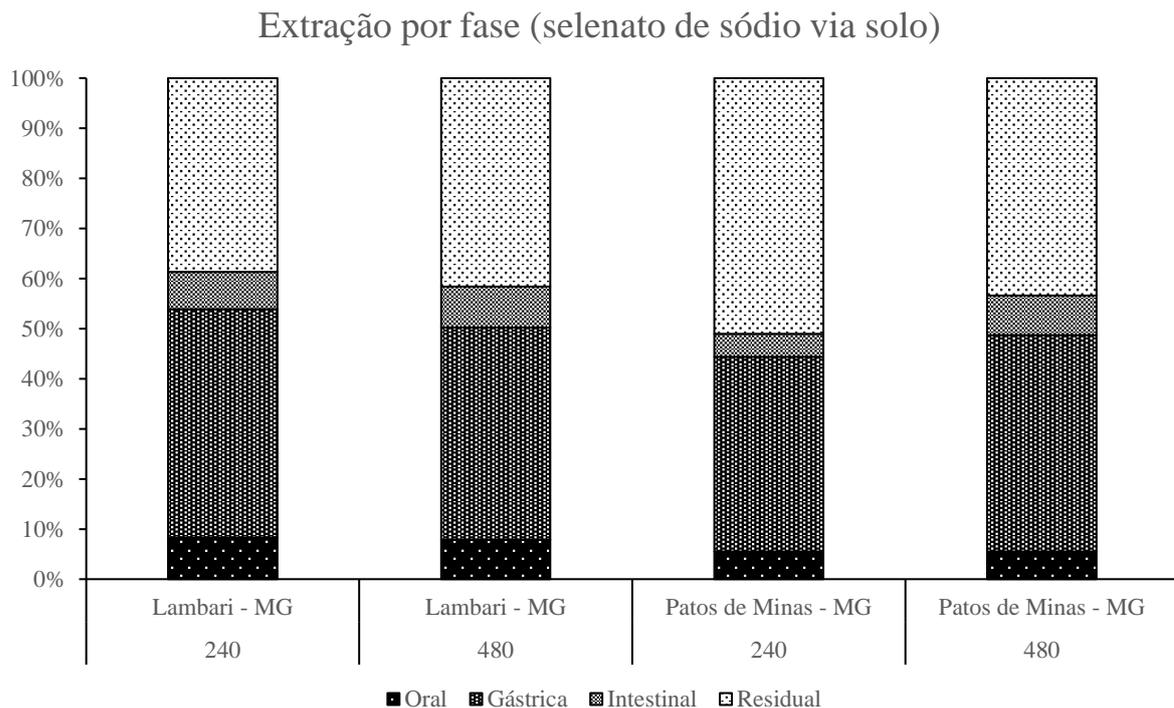
(2000 U mL<sup>-1</sup>) para a fase gástrica e pancreatina (tripsina a 100 U mL<sup>-1</sup>) com bile para a fase intestinal. Uma alíquota do sobrenadante foi filtrada e digerida com ácido nítrico concentrado assistida por radiação micro-ondas e o teor de selênio foi determinado por ICP-MS com câmara de reação com gás oxigênio (1,2 mL min<sup>-1</sup>) para remoção de interferentes. Os íons monitorados foram <sup>77</sup>Se<sup>16</sup>O<sup>+</sup> (m/z 93) e <sup>80</sup>Se<sup>16</sup>O<sup>+</sup> (m/z 96). Foi utilizado padrão interno de Rh e material de referência certificado de arroz (NIST 1568b) com teor de selênio de 365 ± 29 µg kg<sup>-1</sup> que obteve recuperação de 94,6 ± 1,7 %. Os limites de detecção e quantificação variaram entre 0,007-0,045 µg L<sup>-1</sup> e 0,020-0,130 µg L<sup>-1</sup> respectivamente para as espécies monitoradas pelo íon <sup>77</sup>Se<sup>+</sup> e as espécies de selênio determinadas pelo monitoramento do íon <sup>80</sup>Se<sup>+</sup> variaram entre 0,005-0,061 e 0,016-0,177 respectivamente. O teor de selênio bioacessível determinado no trabalho variou de 66,6 a 78,2 % do teor total para todas as amostras, não havendo diferença estatística entre os alimentos avaliados.

O teor bioacessível médio para as amostras com aplicação de selenato de sódio via foliar, considerando o experimento conduzido nos dois municípios, foi de 66 ± 7 % enquanto que, para as amostras com aplicação de selenato via solo e selenito de sódio via foliar, o teor de selênio bioacessível médio foi de 56 ± 11 % e 60 ± 4 %, respectivamente. Utilizando o teste de Tukey, com 95 % de confiança, é possível afirmar que o teor bioacessível de selênio em grãos de arroz biofortificados quando se aplica selenato de sódio via foliar é maior do que quando se aplica selenato de sódio via solo. Não há diferença estatística com 95 % de confiança entre o teor bioacessível da aplicação de selenito de sódio via foliar em relação às demais formas de aplicação e nem entre as doses aplicadas entre quaisquer formas de aplicação. Considerando a não diferença estatística entre as formas de selênio aplicadas e os dados da literatura (GALÍĆ *et al.*, 2021) que consideram a aplicação de selenato para biofortificação, a melhor forma de biofortificação de selênio em arroz seja a aplicação via foliar de selenato de sódio com a correção de que, se apenas 66 ± 3 % (média da fração bioacessível para aplicação de 120 mg kg<sup>-1</sup> de selenato de sódio via foliar nos experimentos dos dois municípios estudados) do selênio aplicado é bioacessível, então a aplicação de 120 mg kg<sup>-1</sup> deve ser corrigida para 182 ± 5 mg kg<sup>-1</sup> de selenato de sódio aplicado via foliar.

Observando que a fração bioacessível de selênio se mantém semelhante mesmo com o aumento significativo de aplicação do analito, é possível discutir dois pontos. O primeiro é que, em geral, a fração bioacessível mantém a proporcionalidade com o teor total de selênio no grão. A determinação do teor bioacessível de selênio para os demais teores de Se aplicados pode comprovar esta hipótese em trabalhos futuros. E o segundo ponto, considerando a confirmação desta hipótese, é de que a adição de maiores quantidades de selênio na forma inorgânica

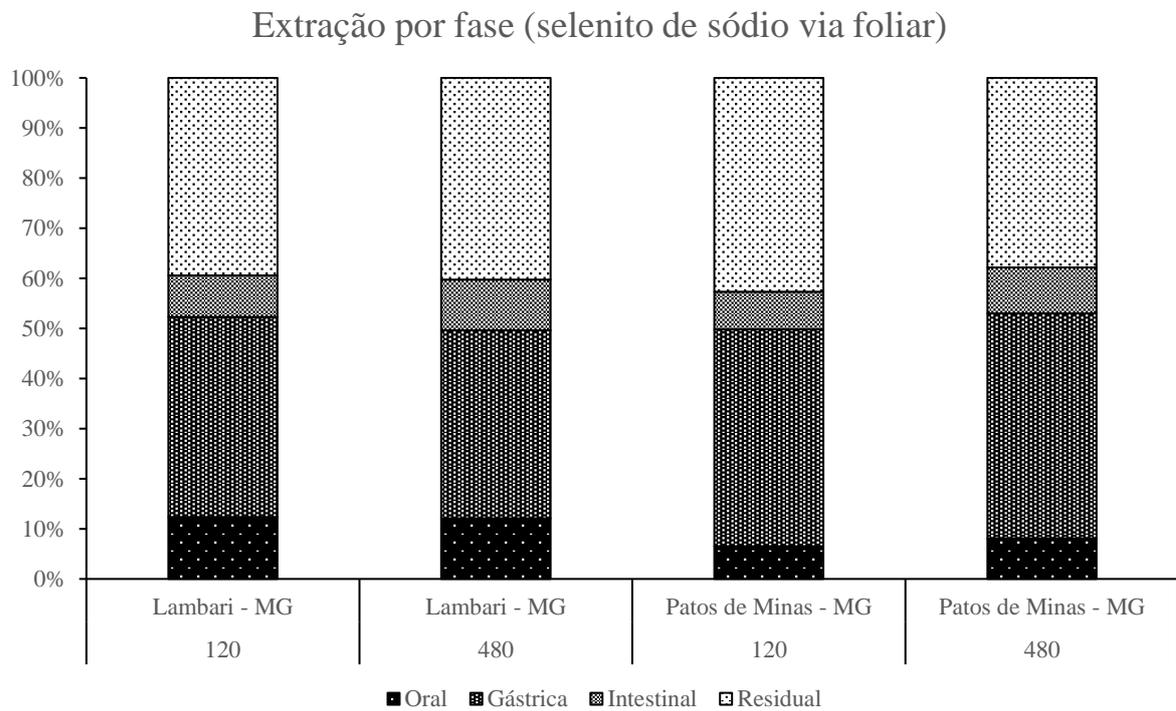
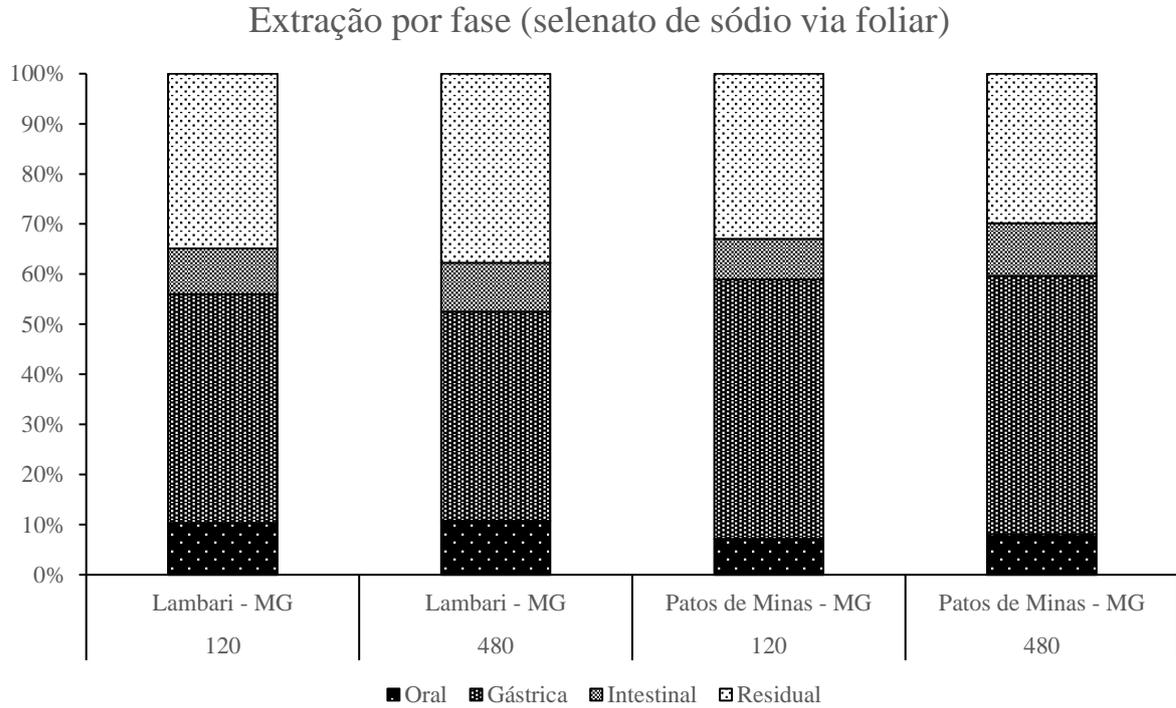
(selenato e selenito de sódio) não diminui a proporção de bioacessibilidade. O selênio adicionado na forma inorgânica é metabolizado pela planta e há produção de grãos biofortificados que apresentam bioacessibilidade de selênio de cerca de 61 % . Esta observação, portanto, responde ao objetivo principal deste trabalho que era observar se há de fato a melhoria nutricional causada pela biofortificação de grãos de arroz utilizando formas inorgânicas de selênio considerando a bioacessibilidade deste após consumo do produto final. Conclui-se então que é possível aumentar, de forma efetiva, o teor nutricional do arroz branco polido no que diz respeito ao selênio ao se aplicar selênio inorgânico no plantio, seja na aplicação via solo, juntamente com o fertilizante, ou via foliar após o tempo correto de cultivo, e que a quantidade de selênio aplicada para obter o teor de selênio ótimo para consumo humano depende do método de aplicação e deve ser corrigido considerando a fração bioacessível do Se no grão.

Figura 11 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz extraído em cada fase do teste *in vitro* (continua)



Fonte: Do autor (2022)

Figura 11 – Teor de selênio bioacessível em grãos de arroz extraído em cada fase do teste *in vitro* (conclusão)



Fonte: Do autor (2022)

A figura 11 e a tabela 7 mostram o teor de selênio extraído em cada fase da digestão simulada. É possível perceber que a maior parte do selênio bioacessível é extraído da matriz durante a fase gástrica (43,87% quando desconsideradas as amostras controle). A fase oral

extraiu 8,55% do selênio da amostra utilizando a  $\alpha$ -amilase na solução salivar simulada. E a fase intestinal removeu em média 8,40 % do teor total de selênio da amostra. Considerando estes dados, o selênio bioacessível presente no arroz não é extraído majoritariamente na fase oral da digestão, portanto, o amido da amostra (87,58% da massa do arroz), apesar de ser a maior parte da matriz do arroz, não apresenta o maior fator de retenção do selênio bioacessível da matriz. Foram buscados outros estudos sobre a bioacessibilidade de selênio e de outros elementos em alimentos em cada fase da simulação gastrointestinal, porém, grande parte dos trabalhos com simulação *in vitro* não reportam o teor extraído na etapa inicial. Portanto, a observação feita neste trabalho não pôde ser contrastada com a literatura por falta de trabalhos publicados com esta determinação do teor bioacessível após a etapa oral da simulação. O selênio presente no grão de arroz é retido, majoritariamente, nas proteínas do endosperma do arroz (WILLIAMS *et al.*, 2009). A acidez do meio e a ação da pepsina desnaturam as proteínas presentes no arroz e, portanto, o selênio que estava retido por elas se desprende da matriz do alimento e se torna bioacessível na fase gástrica do trato digestivo. Nos resultados obtidos pela análise de cada etapa da simulação, nota-se que a fase gástrica é responsável por tornar bioacessível, aproximadamente, 44 % do teor total de selênio presente no grão branco e polido. Estes resultados obtidos são coerentes com aqueles encontrados na literatura.

Tabela 7 – Teor de selênio extraído em cada etapa da digestão simulada

<b>Tratamento</b>	<b>% oral</b>	<b>% gástrica</b>	<b>% intestinal</b>	<b>% bioacessível</b>
SES-240-LA	8,29%	45,57%	7,49%	61,35%
SES-480-LA	7,90%	42,31%	8,21%	58,42%
SEVI-120-LA	10,32%	45,70%	9,08%	65,10%
SEVI-480-LA	10,76%	41,72%	9,76%	62,25%
SEIV-120-LA	12,37%	39,90%	8,29%	60,56%
SEIV-480-LA	12,07%	37,55%	10,12%	59,74%
SES-240-PT	5,52%	38,88%	4,60%	48,99%
SES-480-PT	5,52%	43,20%	7,89%	56,62%
SEVI-120-PT	7,18%	51,78%	8,09%	67,05%
SEVI-480-PT	8,09%	51,57%	10,49%	70,15%
SEIV-120-PT	6,53%	43,27%	7,55%	57,35%
SEIV-480-PT	8,06%	44,93%	9,19%	62,18%
<b>Média</b>	<b>8,55%</b>	<b>43,87%</b>	<b>8,40%</b>	<b>60,81%</b>

Fonte: Do autor (2022)

## 5 CONCLUSÕES

O método utilizado no presente estudo permitiu a determinação quantitativa de selênio com elevadas precisão e exatidão em amostras digeridas de grãos de arroz biofortificados agronomicamente, assim como nos extratos obtidos em cada uma das etapas do ensaio de bioacessibilidade. A compatibilização de matriz para a construção de curvas de calibração para cada uma das fases (oral, gástrica e intestinal) do ensaio de bioacessibilidade, foi fundamental para a exatidão das medidas. A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas com o uso de ácido nítrico diluído preparado a partir do ácido concentrado bidestilado em sistema de subdestilação, juntamente com peróxido de hidrogênio, foi eficaz na decomposição completa das matrizes avaliadas e contribuiu para mitigar a ocorrência de efeitos matriciais nas determinações por ICP-MS. O preparo de amostras também foi adequado para evitar a perda de espécies voláteis de selênio durante a decomposição das amostras sob aquecimento em sistema fechado e também propiciou a obtenção de limites de detecção apropriados para a determinação de selênio em baixas concentrações. O uso do oxigênio na câmara de reação dinâmica do ICP-MS foi eficiente para a formação do íon  $\text{SeO}^+$ , permitindo a determinação quantitativa do selênio em região espectral menos sujeita a interferentes derivados de espécies poliatômicas naturalmente presentes no plasma de argônio, como  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ .

No que diz respeito aos resultados do ensaio de bioacessibilidade, que avaliou o teor de selênio em cada uma das fases que simulam o trato gastrointestinal humano, pode-se concluir que a biofortificação via foliar com selenito e selenato de sódio foram mais eficazes na produção de grãos com maiores teores do elemento na fração bioacessível. O teor bioacessível de selênio nos grãos de arroz foi, em média, de  $61 \pm 5 \%$  do teor total sendo que  $44 \pm 4 \%$  do teor total de selênio é extraído na etapa gástrica da digestão. Estes resultados permitem concluir que a biofortificação de grãos de arroz, com formas inorgânicas de selênio, é eficaz também para aumento do teor bioacessível deste elemento no alimento. Cabe mencionar que as doses ótimas para a aplicação de selênio no solo ou diretamente nas folhas das plantas de arroz devem ser corrigidas, levando-se em consideração a fração bioacessível. Desta forma, a dosagem ótima em ensaios de biofortificação, que tradicionalmente leva em consideração apenas o teor total obtido no grão, deve ser multiplicada por um fator igual a 1,6, no caso da cultura do arroz. A dose aplicada ideal leva em consideração que apenas o arroz consumido diariamente foi biofortificado com selênio, se outros alimentos biofortificados com o mesmo elemento forem

ingeridos, a dose aplicada deve ser reduzida a fim de evitar uma overdose de selênio no organismo.

Cabe finalmente destacar que trabalhos futuros devem ser conduzidos para avaliar a fração de selênio efetivamente biodisponível nos grãos de arroz biofortificados para que o fator de correção da dosagem recomendada de selenito ou de selenato possa ser mais apropriada para produzir grãos de arroz biofortificados que satisfaçam às demandas nutricionais da população.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, D. M. Mean Square Error of Prediction as a Criterion for Selecting Variables. **Technometrics**, 13 (3), p. 469-475, 1971.
- AMARAL, C. D. B. *et al.* Investigation of analyte losses using microwave-assisted sample digestion and closed vessels with venting. **Talanta**, 160, p. 354-359, 2016.
- ARAÚJO, A. M. *et al.* Soil management and ionic strength on selenate retention in oxidic soils. **Ciência e Agrotecnologia**, 42 (4), p. 395-407, 2018.
- ARI, B. *et al.* Bioaccessibility and bioavailability of selenium species in Se-enriched leeks (*Allium Porrum*) cultivated by hydroponically. **Food Chemistry**, 372, 2022.
- ÁVILA, P. A. *et al.* Phosphorus and sulfur in a tropical soil and their effects on growth and selenium accumulation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Environmental Science and Pollution Research International**, 27 (35), p. 44060–44072, 2020.
- BACHIEGA, P. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium. **Food Chemistry**, 190, p. 771-776, 2016.
- BATTIN, E. E.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase and metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 55, p. 1-23, 2009.
- BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **The Journal of Endocrinology**, 184, p. 455-465, 2005.
- BIZZI, C. *et al.* Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, 99, p. 193-196, 2011.
- BIZZI, C. A., *et al.* Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 32, p. 1448-1466, 2017.
- BOLDRIN, P. F. *et al.* Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis**, 31 (2), p. 238-244, 2013.
- BOLDRIN, P. F. *et al.* Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiologia Plantarum**, 158 (1), 80–91, 2016.
- BOLDRIN, P. F. *et al.* Genotypic Variation and Biofortification with Selenium in Brazilian Wheat Cultivars. **Journal of Environmental Quality**, 47 (6), 1371–1379, 2018.
- BOVELL-BENJAMIN, A.; BROMFIELD, E. Nutrition and Bioavailability: Sense and Nonsense of Nutrition Labeling. Ensuring Global Food Safety In: Boisrobert C., Stjepanovic A., Oh S., Lelieveld H., editors. San Diego: Academic Press, p. 289-309, 2010.

BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, 14 (4), p. 991-1014, 2019.

BROWN, K. M.; ARTHUR, J. R. Selenium, selenoproteins and human health: A review. **Public Health Nutrition**, 4 (2), p. 593-599, 2001.

BURCHI, F.; FANZO, J.; FRISON, E. The role of food and nutrition system approaches in tackling hidden hunger. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 8 (2), p. 358-373, 2011.

CAKMAK, I.; KUTMAN, U.B. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. **European Journal of Soil Science**, 69, p. 172-180, 2018.

CAMBRAIA, T. L. L. *et al.* Agronomic biofortification of common bean grain with zinc. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 54, 2019.

CARMONA, V. M. V. *et al.* Agronomic biofortification of beet plants with zinc via seed priming. **Revista Caatinga**, 33 (1), 2020.

COELHO, R. C. *et al.* Expanding information on the bioaccessibility and bioavailability of iron and zinc in biofortified cowpea seeds. **Food Chemistry**, 347, 2021.

COLES, L. T. *et al.* Validation of a dual in vivo–in vitro assay for predicting the digestibility of nutrients in humans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93 (11), p. 2637-2645, 2013.

DA SILVA, R. R. *et al.* Enrichment of lithium in lettuce plants through agronomic biofortification. **Journal of Plant Nutrition**, 42 (17), 2019.

DA SILVA, D. F. *et al.* Biofortification with selenium and implications in the absorption of macronutrients in *Raphanus sativus* L. **Journal of Food Composition and Analysis**, 86, 2020a.

DA SILVA, D. F. *et al.* Anatomical and physiological characteristics of *Raphanus sativus* L. submitted to different selenium sources and forms application. **Scientia Horticulturae**, 260, 2020b.

DALTO, D. B.; MATTE, J. J. The net portal appearance approach - a tool to monitor the real-time bioavailability of nutrients in pigs. **Animal - Open Space**, 1 (1), 2022.

DE ALMEIDA, H. J. *et al.* Soil Type and Zinc Doses in Agronomic Biofortification of Lettuce Genotypes. **Agronomy**, 10 (1), 2020a.

DE ALMEIDA, H. J. *et al.* Zinc application improves the yield and nutritional quality of three green bean genotypes grown in a Red Latosol. **Scientia Horticulturae**, 274, 2020b.

DE ASSIS, M. W. D. *et al.* Tentative zinc biofortification of banana fruit via bunch spray and bunch stalk feeding. **International Journal of Food Science & Technology**, 2020.

- DE LAETER, J. R. *et al.* Atomic weights of the elements: Review 2000 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 75 (6), p. 683-800, 2003.
- DE OLIVEIRA, N. T. *et al.* Zinc biofortification strategies in food-type soybean cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, 13 (01), p. 11-16, 2019.
- DE OLIVEIRA, V. C. *et al.* Agronomic biofortification of carrot with selenium. **Ciência e Agrotecnologia**, 42 (2), p. 138-147, 2018.
- DE SOUZA, A. A. B.; NASCIMENTO, C. W. A.; DE SOUZA, E. R. Mineral composition, chlorophyll fluorescence and zinc biofortification in *Vigna unguiculata* fertilized with bulk and nanoparticulate zinc oxides. **Acta Physiologiae Plantarum**, 43 (159), 2021.
- DELAQUA, D. *et al.* *In vitro* bioaccessibility and bioavailability of selenium in agronomic biofortified wheat. **Journal of Food Composition and Analysis**, 105, 2022.
- DELAQUA, D. *et al.* Increase of selenium concentration in wheat grains through foliar application of sodium selenate. **Journal of Food Composition and Analysis**, 99, 2021.
- DHALIWAL, S. S. *et al.* Biofortification-A Frontier Novel Approach to Enrich Micronutrients in Field Crops to Encounter the Nutritional Security. **Molecules**, 27 (4), 2022.
- DIAS, D. M. *et al.* Rice and Bean Targets for Biofortification Combined with High Carotenoid Content Crops Regulate Transcriptional Mechanisms Increasing Iron Bioavailability. **Nutrients**, 7 (11), p. 9683–9696, 2015.
- DIAS, D. M. *et al.* Iron Biofortified Carioca Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)-Based Brazilian Diet Delivers More Absorbable Iron and Affects the Gut Microbiota In Vivo (*Gallus gallus*). **Nutrients**, 10 (12), 2018.
- DINH, Q. T. *et al.* Selenium distribution in the Chinese environment and its relationship with human health: A review. **Environmental International**, 112, p. 294-309, 2018.
- DOS SANTOS, A. C. M. *et al.* Biofortification of soybean grains with foliar application of Li sources. **Journal of Plant Nutrition**, 42 (19), 2019.
- DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 385 (7), p. 1304-1323, 2006.
- DUNTAS, L. H. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, 41 (6), p. 443-447, 2009.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of nutrients. *In*: MACRAE, R.; ROBINSON, R. K., *et al.* (Ed.). **Encyclopedia of food science, food technology and nutrition**. London: Academic Press, p. 384-388, 1993.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J. *et al.* Selenium in human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, 14 (7), p. 1337-1383, 2011.

FERNANDES, K. F. M.; BERTON, R. S.; COSCIONE, A. R. Selenium biofortification of rice and radish: effect of soil texture and efficiency of two extractants. **Plant Soil and Environment**, 60 (3), p. 105-110, 2014.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, 29 (11), p. 751-760, 2009.

FERREIRA, K. *et al.* Selenium content of Brazilian foods. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, 11 (3), pp. 172-177, 2002.

FLOHE, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Letters**, 32 (1), p. 132-134, 1973.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Hydride generation atomic absorption spectrometric (HGAAS) determination of selenium in term and preterm infant formulae available in the United Kingdom. **Food Chemistry**, 55 (3), p. 293-298, 1996.

GABOS, M. B.; ALLEONI, L. R. F.; ABREU, C. A. Background levels of selenium in some selected Brazilian tropical soils. **Journal of Geochemical Exploration**, 145, p. 35-39, 2014.

GALIĆ, L. *et al.* Agronomic Biofortification of Significant Cereal Crops with Selenium - A Review. **Agronomy**, 11 (5), 2021.

GHOLAMI, M. *et al.* A simple design for microwave assisted digestion vessel with low reagent consumption suitable for food and environmental samples. **Scientific Reports**, 6, 2016.

GONG, R. *et al.* Effect of selenite on organic selenium speciation and selenium bioaccessibility in rice grains of two Se-enriched rice cultivars. **Food Chemistry**, 264, p. 443-448, 2018.

GRACIANO, P. D. *et al.* Agronomic biofortification with zinc in curly lettuce cultivars. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 15 (4), p. 1-9, 2020.

HIRTZ, A.; GÜNTHER, K. Determination of Total Selenium and Extractability of Selenium in Commercially-Available Dietary Supplements by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS). **Analytical Letters**, 53 (16), p. 2529-2544, 2020.

HOFFMANN, P. R.; BERRY, M. J. The influence of selenium on immune responses. **Molecular Nutrition and Food Research**, 52, p. 1273-1280, 2008.

HORNER, N. S.; BEAUCHEMIN, D. The effect of cooking and washing rice on the bioaccessibility of As, Cu, Fe, V and Zn using an on-line continuous leaching method. **Analytica Chimica Acta**, 758, p. 28-35, 2013.

JAISWAL, S. K. *et al.* Bioaccessibility of selenium from Se-rich food grains of the seleniferous region of Punjab, India as analyzed by instrumental neutron activation analysis. **CYTA - Journal of Food**, 10 (2), p. 160-164, 2012.

JALAL, A. *et al.* Common Bean Yield and Zinc Use Efficiency in Association with Diazotrophic Bacteria Co-Inoculations. **Agronomy**, 11 (5), 2021.

KIPP, A. P. *et al.* Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 32, p. 195-199, 2015.

KLAPEC, T. *et al.* Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. **Food Chemistry**, 85 (3), p. 445-452, 2004.

KOS, V.; VEBER, M.; HUDNIK, V. Determination of selenium in soil by hydride generation AAS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 360 (2), p. 225-229, 1998.

KURIA, A. *et al.* Selenium status in the body and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 61 (21), p. 3616-3625, 2021.

LARA, T. S. *et al.* Selenium biofortification of wheat grain *via* foliar application and its effect on plant metabolism. **Journal of Food Composition and Analysis**, 81, p. 10-18, 2019.

LEBLANC, K. L.; RUZICKA, J.; WALLSCHLÄGER, D. Identification of trace levels of selenomethionine and related organic selenium species in high-ionic-strength waters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 408, 1033-1042, 2016.

LEI, X. G.; CHENG, W. H.; MCCLUNG, J. P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annual Review of Nutrition**. 27, p. 41-61, 2007.

LEITE, C. M. C. *et al.* Low efficiency of Zn uptake and translocation in plants provide poor micronutrient enrichment in rice and soybean grains. **Journal of Plant Nutrition**, 43 (1), p. 79-91, 2019.

LENAERTS, B; DEMONT, M. The global burden of chronic and hidden hunger revisited: new panel data evidence spanning 1990-2017. **Global Food Security**, 28, 2021.

LESSA, J. H. L. *et al.* Adsorption-desorption reactions of selenium (VI) in tropical cultivated and uncultivated soils under Cerrado biome. **Chemosphere**, 164, p. 271-277, 2016.

LESSA, J. H. L. *et al.* Agronomic biofortification of rice (*Oryza sativa* L.) with selenium and its effect on element distributions in biofortified grains. **Plant and Soil**, 2019.

LESSA, J. H. L. *et al.* Strategies for applying selenium for biofortification of rice in tropical soils and their effect on element accumulation and distribution in grains. **Journal of Cereal Science**, 96, 2020.

LI, J. *et al.* Bioaccessibility of antimony and arsenic in highly polluted soils of the mine area and health risk assessment associated with oral ingestion exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 110, p. 308-315, 2014.

LIDON, F. C. *et al.* Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. **Journal of Cereal Science**, 81, p. 22-29, 2018.

LIMA, F. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; SOUSA, C. S. Adubação com Zinco como alternativa para aumentar a concentração de micronutrientes em partes comestíveis de hortaliças. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 10 (3), 2015.

LOPES, G.; ÁVILA, F. W.; GUILHERME, L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciência e Agrotecnologia**, 41 (6), p. 605-615, 2017.

LUM, T-S.; LEUNG, K. S-Y. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 31 (5), p. 1078-1088, 2016.

MARTINS, F. C. O. L. *et al.* Compostos orgânicos e inorgânicos contendo selênio: Revisão de métodos analíticos e perspectivas para análises químicas. **Química Nova**, 40 (10), p. 1204-1214, 2017.

MATEUS, M. P. B. *et al.* Selenium biofortification enhances ROS scavenge system increasing yield of coffee plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 209, 2021.

MATTIELLO, E. M. *et al.* Efficiency of soil-applied <sup>67</sup>Zn-enriched fertiliser across three consecutive crops. **Pedosphere**, 31 (4), p. 531-537, 2021.

MATUSIEWICZ, H. Sample Preparation for Inorganic Trace Element Analysis. **Physical Sciences Reviews**, 2017

MCCONNELL, K. P.; CHO, G. J. Active transport of L-selenomethionine in intestine. **American Journal of Physiology**, 213 (1), 1967.

MENEGHELLI, C. M. *et al.* Zinc-biofortified lettuce in aeroponic system. **Journal of Plant Nutrition**, 44 (14), 2021.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, 5 (6), p. 1113-1124, 2014.

MORAES, M. *et al.* **Evidences of selenium deficiency in Brazil: from soil to human nutrition.** In: BANUELOS, G. R.; LIN, Z. G.; Yin, X. B. (Eds). First International Conference on Selenium in the Environment and Human Health, 2009, Suzhou. Selenium: deficiency, toxicity, and biofortification for human health. 116p. Hefei: University of Science and Technology of China Press, p.73-74, 2009.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. In vivo and in vitro testing for selenium and selenium compounds bioavailability assessment in foodstuff. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57, p. 805-833, 2017.

MULEYA, M. *et al.* Selenium speciation and bioaccessibility in Se-fertilised crops of dietary importance in Malawi. **Journal of Food Composition and Analysis**, 98, 2021.

NASCIMENTO, S. *et al.* Dietary availability patterns of the brazilian macro-regions. **Nutritional Journal**, 10 (79), p. 1-8, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH - NIH. **Selenium: fact sheet for health professionals**. US Department of Health & Human Services. 2021. Disponível em: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>>.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Science of the Total Environment**, 249 (1-3), p. 347-371, 2000.

NING, Z. *et al.* Contamination, oral bioaccessibility and human health risk assessment of thallium and other metal(loid)s in farmland soils around a historic Tl-Hg mining area. **Science of The Total Environment**, 758, 2021.

NÓBREGA, J. *et al.* Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, 98, p. 272-276, 2012.

OLIVEIRA, L. C. P. *et al.* Efeito da adubação silicatada em hortaliças não convencionais. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 19 (2), p. 224-229, 2020.

OOMEN, A. G. *et al.* Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Environmental Science & Technology**, 36 (15), p. 3326-3334, 2002.

PATACO, I. M. *et al.* Biofortification of durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Desf.) Husnot) grains with nutrients. **Journal of Plant Interactions**, 12 (1), p. 39-50, 2017.

PÉREZ, M. B. *et al.* Selenium biofortification on garlic growth and other nutrients accumulation. **Horticultura Brasileira**, 37 (3), p. 294-301, 2019.

PILON, M. *et al.* Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic Arabidopsis expressing a mouse selenocysteine lyase. **Plant Physiology**, 131 (3), p. 1250-1257, 2003.

PRATES, S. M. S. **Caracterização química, atividade antioxidante e avaliação da bioaccessibilidade de componentes bioativos de *Sterculia striata* A.St.-Hil. & Naudin (chichá) em comparação com *Arachis hypogaea* L. (amendoim)**. Orientador: BRANDÃO, M. G. L. B. 2018. 101 f. (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PROM-U-THAI, C. *et al.* Simultaneous Biofortification of Rice With Zinc, Iodine, Iron and Selenium Through Foliar Treatment of a Micronutrient Cocktail in Five Countries. **Frontier in Plant Science**, 2020.

RAM, H. *et al.* Biofortification of wheat, rice and common bean by applying foliar zinc fertilizer along with pesticides in seven countries. **Plant and Soil**, 403, p. 389-401, 2016.

RAMOS, D. P. *et al.* Agronomic biofortification of cowpea with selenium by foliar fertilization: effect of doses in three cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 43 (4), p. 538-547, 2020.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **British Journal of Nutrition**, 100 (2), p. 254-268, 2008.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet**, 379 (9822), p. 1256-1268, 2012.

REILLY, C. Introduction. *In*: REILLY, C. (Ed.). **Selenium in Food and Health**. Boston, MA: Springer US, 1996.

REIS A. R. *et al.* Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-related health issues, and case studies. *In*: PILON-SMITS, E.; WINKEL, L.; LIN, Z. Q. (eds) **Selenium in plants**. Plant Ecophysiology, vol 11, p. 209-230. Springer, Cham. 2017.

REIS, H. P. G. *et al.* Agronomic biofortification with selenium impacts storage proteins in grains of upland rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 100 (5), p. 1990-1997, 2020.

ROCHA, F. R. P., NÓBREGA, J. A., KAMOGAWA, M. Y. Fundamentos do preparo de amostras. *In* **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, p. 572. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2016.

RODRIGUES, R. M. *et al.* Most consumed foods in Brazil: evolution between 2008-2009 and 2017-2018. **Revista de Saúde Pública**, 55, 2021.

RODRIGUEZ, R. R.; BASTA, N. T. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. **Environmental Science & Technology**, 33 (4), p. 642-649, 1999.

SAGER, M. Selenium in agriculture, food, and nutrition. **Pure and Applied Chemistry**, 78 (1), p. 111-133, 2006.

SANT'ANA, C. T. *et al.* Bioaccessibility and bioavailability of iron in biofortified germinated cowpea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99 (14), p. 6287-6295, 2019.

SANTIAGO, F. E. M. *et al.* Biochemical basis of differential selenium tolerance in arugula (*Eruca sativa* Mill.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, 157, p. 328-338, 2020.

SANTOS, C. A. F.; BOITEUX, L. S. Genetic control and transgressive segregation of zinc, iron, potassium, phosphorus, calcium, and sodium accumulation in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Genetics and Molecular Research**, 14 (1), p. 259-268, 2015.

SCHEID, S. S. *et al.* Iron biofortification and availability in the mycelial biomass of edible and medicinal basidiomycetes cultivated in sugarcane molasses. **Scientific Reports**, 10, 2020.

SCHIAVON, M. *et al.* Selenium biofortification in the 21<sup>st</sup> century: status and challenges for healthy human nutrition. **Plant and Soil**, 16, p. 1-26, 2020.

SCHRAUZER, G. N. Anticarcinogenic effects of selenium. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 57 (13-14), p. 1864-1873, 2000.

- SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, 79 (12), p. 3292–3293, 1957.
- SIGRIST, M. *et al.* Determination of selenium in selected food samples from Argentina and estimation of their contribution to the Se dietary intake. **Food Chemistry**, 134 (4), p. 1932–1937, 2012.
- SILVA, V. M. *et al.* Agronomic biofortification of cowpea with selenium: effects of selenate and selenite applications on selenium and phytate concentrations in seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99 (13), p. 5969–5983, 2019.
- SILVA, V. M. *et al.* Agronomic biofortification of cowpea with zinc: Variation in primary metabolism responses and grain nutritional quality among 29 diverse genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, 162, p. 378–387, 2021a.
- SILVA, V. M. *et al.* Application of sodium selenate to cowpea (*Vigna unguiculata* L.) increases shoot and grain Se partitioning with strong genotypic interactions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 67, 2021b.
- SKOOG, D. *et al.* **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 8<sup>th</sup> ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole, 2004.
- SPERANÇA, M. A. *et al.* Biofortification quality in bananas monitored by energy-dispersive X-ray fluorescence and chemometrics. **Food Chemistry**, 362, 2021.
- SRINIVASAN, V. S. Bioavailability of Nutrients: A Practical Approach to In Vitro Demonstration of the Availability of Nutrients in Multivitamin-Mineral Combination Products. **The Journal of Nutrition**, 131 (4), p. 1349–1350, 2001.
- STAFEN, C. F. *et al.* Iron biofortification in rice: in search of morphological traits for indirect selection in breeding programs. **Científica**, 47 (2), p. 199–209, 2019.
- SUN, G-X. *et al.* Bioaccessibility of selenium from cooked rice as determined in a simulator of the human intestinal tract (SHIME). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97 (11), p. 3540–3545, 2017.
- SUCHAROVÁ, J. Optimisation of DRC ICP-MS for determining selenium in plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 26 (9), p. 1756–1762, 2011.
- THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS : a tutorial for beginners**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- THOMSEN, V. Spectral Background Radiation and the "Background Equivalent Concentration" in Elemental Spectrochemistry. **Spectroscopy**, 27 (3), p. 28–36, 2012.
- THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**. 58 (3), 391–402, 2004.

VASQUES, I. C. F. *et al.* Comparison of bioaccessibility methods in spiked and field Hg-contaminated soils. **Chemosphere**, 254, 2020.

VAZ-TOSTES, M. G. *et al.* Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using *in vitro* and *in vivo* models and their effect on the nutritional status of preschool children. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96 (4), p. 1326-1332, 2016.

VELU, G. *et al.* Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. **Journal of Cereal Science**, 59 (3), p. 365-372, 2014.

VENDELAND, S. C. *et al.* Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. **Biometals**, 7 (4), p. 305-312, 1994.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; DE AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, 38 (4), p. 1184-1192, 2008.

WEEKS, B. S.; HANNA, M. S.; COOPERSTEIN, D. Dietary selenium and selenoprotein function. **Medical Science Monitor**, 18 (8), p. 127-132, 2012.

WEI, Y. H. *et al.* Simultaneous determination of Se, trace elements and major elements in Se-rich rice dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) after microwave digestion. **Food Chemistry**, 159, p. 507-511, 2014.

WELNA, M., SZYMCZYCHA-MADEJA, A., POHL, P. Quality of the trace element analysis: sample preparation steps. In (Ed.), Wide spectra of quality control. **IntechOpen**. 2011.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**. 182 (1), p. 49-84, 2009.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements. **Trends in Plant Science**, 10 (12), p. 586-593, 2005.

WILLIAMS, E.; HARRISON, M. Selenium: From health to the biological food chain. **Journal of Biotech Research**, 2 , p. 112-120, 2010.

WILLIAMS, P. N. *et al.* Selenium characterization in the global rice supply chain. **Environmental Science and Technology**, 43 (15), p. 6024-6030, 2009.

YANG, H. *et al.* The beneficial and hazardous effects of selenium on the health of the soil-plant-human system: An overview. **Journal of Hazardous Materials**, 422, 2022.

YIN, N. *et al.* Predictive capabilities of *in vitro* colon bioaccessibility for estimating *in vivo* relative bioavailability of arsenic from contaminated soils: Arsenic speciation and gut microbiota considerations. **Science of The Total Environment**, 818, 2022.

ZHANG, K. *et al.* Development and application of a HPLC-ICP-MS method to determine selenium speciation in muscle of pigs treated with different selenium supplements. **Food Chemistry**, 302, 2020.

## ANEXOS

Tabela 8 – Artigos brasileiros sobre biofortificação (2013-2022) (continua)

<b>Referência</b>	<b>Elemento Aplicado</b>	<b>Alimento Biofortificado</b>	<b>Análise de bioacessibilidade</b>	<b>Método analítico</b>
ÁVILA <i>et al.</i> , 2020	Se	Leucena	Não	GFAAS
BACHIEGA <i>et al.</i> , 2016	Se	Brócolis	Não	EDXRF
BOLDRIN <i>et al.</i> , 2016	Se	Trigo	Não	ICP OES
BOLDRIN <i>et al.</i> , 2018	Se	Trigo	Não	GFAAS
BOLDRIN <i>et al.</i> , 2013	Se	Arroz	Não	TXRF
CAMBRAIA <i>et al.</i> , 2019	Zn	Feijão	Não	ICP OES
CARMONA <i>et al.</i> , 2020	Zn	Beterraba	Não	-
COELHO <i>et al.</i> , 2021	Fe e Zn	Feijão-frade	Sim	ICP-MS (colisão He)
DA SILVA <i>et al.</i> , 2020a	Se	Rabanete	Não	GFAAS
DA SILVA <i>et al.</i> , 2020b	Se	Rabanete	Não	GFAAS
DA SILVA <i>et al.</i> , 2019	Li	Alface	Não	-
DE ALMEIDA <i>et al.</i> , 2020a	Zn	Alface	Não	AAS
DE ALMEIDA <i>et al.</i> , 2020b	Zn	Vagem	Não	AAS
DE ASSIS <i>et al.</i> , 2020	Zn	Banana	Não	AAS
DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019	Zn	Soja	Não	-
DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018	Se	Cenoura	Não	GFAAS
DE SOUZA; DO NASCIMENTO; DE SOUZA, 2021	Zn	Feijão-frade	Não	ICP OES
DELAQUA <i>et al.</i> , 2021	Se	Trigo	Não	ICP OES
DELAQUA <i>et al.</i> , 2022	Se	Trigo	Sim	ICP OES
DIAS <i>et al.</i> , 2015	Fe	Arroz, feijão, abóbora e batata doce	Sim	ICP OES
DIAS <i>et al.</i> , 2018	Fe	Feijão	Sim	ICP OES
DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2019	Li	Soja	Não	FAES

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 8 – Artigos brasileiros sobre biofortificação (2013-2022) (continua)

Referência	Elemento Aplicado	Alimento Biofortificado	Análise de bioacessibilidade	Método analítico
FERNANDES; BERTON; COSCIONE, 2014	Se	Arroz e rabanete	Não	HG ICP OES
GRACIANO <i>et al.</i> , 2020	Zn	Alface	Não	AAS
JALAL <i>et al.</i> , 2021	Zn	Feijão	Não	AAS
LARA <i>et al.</i> , 2019	Se	Trigo	Não	GFAAS
LEITE <i>et al.</i> , 2019	Zn	Arroz e soja	Não	AAS
LESSA <i>et al.</i> , 2019	Se	Arroz	Não	GFAAS
LESSA <i>et al.</i> , 2020	Se	Arroz	Não	GFAAS
LIDON <i>et al.</i> , 2018	Se	Arroz	Não	EDXRF
LIMA; NASCIMENTO; SOUSA, 2015	Zn	Hortaliças	Não	AAS
MATEUS <i>et al.</i> , 2021	Se	Café	Não	ICP-MS
MATTIELLO <i>et al.</i> , 2021	Zn	Trigo, azevém e milho	Não	ICP-MS (colisão He)
MENEGHELLI <i>et al.</i> , 2021	Zn	Alface	Não	AAS
OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2020	Si	Hortaliças	Não	Espectrofotometria de Absorção Molecular
PATACO <i>et al.</i> , 2017	Fe, Cu, Mn, Zn, Ca, K, Mg e P	Trigo	Não	ICP OES
PÉREZ <i>et al.</i> , 2019	Se	Alho	Não	ICP-MS
PROM-U-THAI <i>et al.</i> , 2020	Zn, I, Fe, Se	Arroz	Não	ICP OES e ICP-MS
RAM <i>et al.</i> , 2016	Zn	Trigo, arroz e feijão	Não	ICP OES
RAMOS <i>et al.</i> , 2020	Se	Feijão-frade	Não	HGAAS
REIS <i>et al.</i> , 2020	Se	Arroz	Não	ICP-MS
SANT'ANA <i>et al.</i> , 2019	Fe	Feijão-frade	Sim	FAAS

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 8 – Artigos brasileiros sobre biofortificação (2013-2022) (conclusão)

<b>Referência</b>	<b>Elemento Aplicado</b>	<b>Alimento Biofortificado</b>	<b>Análise de bioacessibilidade</b>	<b>Método analítico</b>
SANTIAGO <i>et al.</i> , 2020	Se	Rúcula e alface	Não	ICP OES
SANTOS; BOITEUX, 2015	K, Ca, Fe, Zn, P, Na	Feijão-frade	Não	FAAS
SCHEID <i>et al.</i> , 2020	Fe	Fungo comestível	Não	FAAS
SILVA <i>et al.</i> , 2019	Se	Feijão-frade	Não	ICP-MS
SILVA <i>et al.</i> , 2021a	Zn	Feijão-frade	Não	ICP-MS
SILVA <i>et al.</i> , 2021b	Se	Feijão-frade	Não	ICP-MS
SPERANÇA <i>et al.</i> , 2021	Zn	Banana	Não	EDXRF
STAFEN <i>et al.</i> , 2019	Fe	Arroz	Não	ICP-MS
VAZ-TOSTES <i>et al.</i> , 2016	Fe e Zn	Feijão	Sim	MIP OES

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 9 – Comparação do teor total de selênio nas amostras de arroz biofortificadas em Lambari – MG com o somatório das fases do ensaio de bioacessibilidade

Dose (mg kg <sup>-1</sup> ) /tratamento	Teor total (µg kg <sup>-1</sup> )	Teor em cada fase do ensaio (µg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação* <sup>1</sup> (%)
Dose 240 Selenato via solo	329 ± 14	Oral: 29,9 ± 0,7 Gástrica: 164 ± 8 Intestinal: 27 ± 1 Residual: 139 ± 39 Somatório: 360 ± 40 <sup>*2</sup>	110 %
Dose 480 Selenato via solo	783 ± 14	Oral: 66 ± 8 Gástrica: 351 ± 22 Intestinal: 68 ± 1 Residual: 345 ± 62 Somatório: 830 ± 66 <sup>*2</sup>	106 %
Dose 120 Selenato via foliar	556 ± 63	Oral: 58 ± 3 Gástrica: 255 ± 50 Intestinal: 51 ± 5 Residual: 195 ± 36 Somatório: 557 ± 61 <sup>*2</sup>	100 %
Dose 480 Selenato via foliar	1778 ± 231	Oral: 223 ± 14 Gástrica: 864 ± 72 Intestinal: 202 ± 25 Residual: 782 ± 30 Somatório: 2072 ± 83 <sup>*2</sup>	116 %
Dose 120 Selenito via foliar	552 ± 62	Oral: 74 ± 3 Gástrica: 238 ± 28 Intestinal: 49 ± 1 Residual: 235 ± 24 Somatório: 596 ± 37 <sup>*2</sup>	108 %
Dose 480 Selenito via foliar	2140 ± 200	Oral: 280 ± 16 Gástrica: 872 ± 160 Intestinal: 235 ± 24 Residual: 935 ± 20 Somatório: 2322 ± 163 <sup>*2</sup>	109 %

Fonte: Do autor (2022)

$$*^1 \text{Recuperação} = \left( \frac{\sum \text{teor de selênio nas frações}}{\text{teor total de selênio}} \right) \times 100$$

\*<sup>2</sup>Cálculo da incerteza da soma:  $e = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2 + d^2}$ ; onde a, b, c e d são as incertezas dos teores de selênio obtidos nas fases oral, gástrica, intestinal e residual, respectivamente.

Tabela 10 – Comparação do teor total de selênio nas amostras de arroz biofortificadas em Patos de Minas – MG com o somatório das fases do ensaio de bioacessibilidade

Dose (mg kg <sup>-1</sup> ) /tratamento	Teor total (µg kg <sup>-1</sup> )	Teor em cada fase do ensaio (µg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação* <sup>1</sup> (%)
Dose 240 Selenato via solo	300 ± 24	Oral: 16 ± 1 Gástrica: 112 ± 11 Intestinal: 13 ± 3 Residual: 147 ± 28 Somatório: 288 ± 30* <sup>2</sup>	96 %
Dose 480 Selenato via solo	592 ± 34	Oral: 32 ± 2 Gástrica: 251 ± 27 Intestinal: 46 ± 5 Residual: 252 ± 43 Somatório: 581 ± 51* <sup>2</sup>	98 %
Dose 120 Selenato via foliar	600 ± 66	Oral: 41 ± 9 Gástrica: 295 ± 15 Intestinal: 46 ± 2 Residual: 188 ± 1 Somatório: 570 ± 18* <sup>2</sup>	95 %
Dose 480 Selenato via foliar	2135 ± 228	Oral: 164 ± 23 Gástrica: 1048 ± 93 Intestinal: 213 ± 15 Residual: 606 ± 35 Somatório: 2032 ± 103* <sup>2</sup>	95 %
Dose 120 Selenito via foliar	570 ± 81	Oral: 40 ± 2 Gástrica: 266 ± 25 Intestinal: 46 ± 5 Residual: 262 ± 61 Somatório: 614 ± 66* <sup>2</sup>	108 %
Dose 480 Selenito via foliar	2316 ± 27	Oral: 195 ± 25 Gástrica: 1089 ± 5 Intestinal: 223 ± 22 Residual: 917 ± 133 Somatório: 2424 ± 138* <sup>2</sup>	105 %

Fonte: Do autor (2022)

$$*^1 \text{Recuperação} = \left( \frac{\sum \text{teor de selênio nas frações}}{\text{teor total de selênio}} \right) \times 100$$

\*<sup>2</sup>Cálculo da incerteza da soma:  $d = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2}$ ; onde a, b, e c são as incertezas dos teores de selênio obtidos nas fases oral, gástrica e intestinal, respectivamente.

Tabela 11 – Teste ANOVA de fator duplo (Região x Dose) (selenato via solo)

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Região:	197,07	1,00	197,07	21,28	0,001725
Dose:	32,70	1,00	32,70	3,532	0,09702
Interaction:	55,69	1,00	55,69	6,013	0,0398
Within:	74,08	8,00	9,26		
<b>Total:</b>	<b>359,542</b>	<b>11</b>			

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 12 – Teste de Tukey (valores de p) (selenato de sódio via solo)

Municípios			Doses		
	LA	PT		240	480
LA		0,001725	240		0,09702
PT	0,001725		480	0,09702	

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 13 – Teste ANOVA de fator duplo (Região x Dose) (selenato via foliar)

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Região:	1,33333	1	1,33333	0,06016	0,8124
Dose:	5,49453	1	5,49453	0,2479	0,6319
Interaction:	16,0083	1	16,0083	0,7223	0,4201
Within:	177,305	8	22,1631		
<b>Total:</b>	<b>200,141</b>	<b>11</b>			

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 14 – Teste de Tukey (valores de p) (selenato de sódio via foliar)

Municípios			Doses		
	LA	PT		120	480
LA		0,8124	120		0,6319
PT	0,8124		480	0,6319	

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 15 – ANOVA – Região x Dose (selenito de sódio via foliar)

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Região:	1,02083	1	1,02083	0,05211	0,8252
Dose:	69,6008	1	69,6008	3,553	0,09618
Interaction:	44,6216	1	44,6216	2,278	0,1697
Within:	156,728	8	19,591		
<b>Total:</b>	<b>271,971</b>	<b>11</b>			

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 16 – Teste de Tukey (valores de p) (selenito de sódio via foliar)

Municípios			Doses		
	LA	PT	120	480	
LA		0,8252	120		0,09618
PT	0,8252		480	0,09618	

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 17 – ANOVA – Aplicação x Dose (Experimento completo)

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Aplicação:	433,728	2	216,864	8,988	0,000874
Dose:	89,7204	1	89,7204	3,719	0,06332
Interaction:	18,0735	2	9,03676	0,3745	0,6908
Within:	723,828	30	24,1276		
<b>Total:</b>	<b>1265,35</b>	<b>35</b>			

Fonte: Do autor (2022)

Tabela 18 – Teste de Tukey (valores de p) (Experimento completo)

Aplicação			Doses		
	SES	SEVI	SEIV	Média	Máxima
SES		0,0005681	0,0746	Média	0,06334
SEVI	0,000568		0,1403	Máxima	0,06334
SEIV	0,0746	0,1403			

Fonte: Do autor (2022)