

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ANA LÚCIA SILVA FIGUEIREDO DE PAIVA**

PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SISTEMA EM FLUXO ACOPLADO *IN-LINE*  
À GFAAS PARA ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM AMOSTRAS DE  
INTERESSE FARMACÊUTICO

ALFENAS/MG  
2009

ANA LÚCIA SILVA FIGUEIREDO DE PAIVA

PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SISTEMA EM FLUXO ACOPLADO *IN-LINE* À GFAAS  
PARA ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM AMOSTRAS DE INTERESSE  
FARMACÊUTICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos. Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

ALFENAS/MG  
2009

**Paiva, Ana Lúcia Silva Figueiredo de.**

Pré-concentração em sistema em fluxo acoplado in-line a ETAAS para especiação de selênio em amostras de interesse farmacêutico / Ana Lúcia Silva Figueiredo de Paiva.-Alfenas, 2009.

80 f.-

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. Selênio. 2. Análise de Injeção de Fluxo. 3. Extração em Fase Sólida. 4. Espectrofotometria Atômica.

I. Título.

CDD: 543

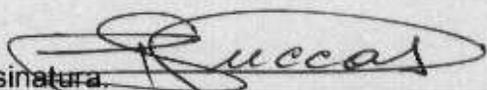
ANA LÚCIA SILVA FIGUEIREDO DE PAIVA

PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM SISTEMA EM FLUXO ACOPLADO *IN-LINE* À ETAAS  
PARA ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM AMOSTRAS DE INTERESSE  
FARMACÊUTICO

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Aprovada em:

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas  
Instituição: UNIFAL/MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda  
Instituição: UNICAMP

Assinatura: 

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley  
Instituição: UNIFAL/MG

Assinatura: 

Aos meus filhinhos Lucas e Mateus

Este trabalho também é de vocês, por estarem presentes durante oito meses em disciplinas, seminários, testes laboratoriais... Vocês me deram muita força e esperança quando eu mais precisava e depois permitiram, mesmo sem saber, a minha ausência por tantas horas.

Ao meu marido Jean Carlos

Pelo apoio como companheiro, pela compreensão nas ausências, pelo incentivo, pela estrutura familiar, por passar a entender tudo sobre selênio e pelo amor.

À minha mãe Marlene

Por fazer de mim tudo que sou, por sempre ajudar a tornar meus sonhos realidade e por tantas vezes tomar o meu lugar como mãe. A senhora é meu exemplo de mãe e mulher.

À minha vó Theresa, ao meu avô Odílio e às minhas tias Marly e Marluce

Por me ajudarem sempre que puderam e fazer a vida dos meus filhinhos mais feliz.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, por ter cedido espaço para a realização deste mestrado.

A todos os funcionários, por fazerem desta instituição um lugar muito agradável.

A todos os docentes, que ajudaram na minha formação profissional e no desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga, Fernanda Figueiredo Andrade Costa, pela grande ajuda nos testes laboratoriais e pela excelente companhia durante tantas horas de trabalho.

À minha turma de mestrado e ao pessoal do laboratório, pela agradável convivência, pelo apoio e pelas conversas engraçadas.

Ao professor César Ricardo Teixeira Tarley, pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelas oportunidades oferecidas para o meu enriquecimento profissional.

Ao professor Pedro Orival Luccas, inicialmente por me incentivar a ingressar no mestrado, depois por ser compreensivo e atuante como orientador e finalmente, por me ensinar o dom de educar e me apaixonar pela pesquisa.

À FAPEMIG pela bolsa concedida, à FINEP, CAPES, CNPQ e FURNAS Centrais Elétricas S. A. pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Selênio é um elemento essencial para os organismos, no entanto, há uma faixa estreita entre a sua concentração essencial e tóxica, a qual depende da espécie envolvida. Neste trabalho, uma minicoluna “*homemade*”, contendo a resina LC-SAX® foi acoplada ao autoamostrador do GFAAS, para realizar pré-concentração *in-line*. A pré-concentração, eluição e limpeza da minicoluna foram sincronizadas com o programa de aquecimento do GFAAS. Para especiação dos compostos de selênio, 6 mL de amostra, contendo as duas espécies, selenito e selenato, foram preparadas nos valores de pH de 2,0 e 8,8. A eluição foi realizada usando 20 µL de ácido nítrico diretamente dentro do tubo de grafite. Foi empregado planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para verificar as variáveis significativas do sistema e a otimização final foi feita utilizando matriz de Doehlert com superfície de resposta. Os valores otimizados para pH, vazão de pré-concentração e concentração do eluente foram 8,8; 4,0 mL min<sup>-1</sup> e 2,8 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Um estudo do pH de adsorção foi realizado na faixa de 2 a 8, sendo que em pH 2,0 somente Se(VI) foi pré-concentrado, por outro lado, em pH acima de 6,0 ambas as espécies Se(VI) e Se(IV) puderam ser determinadas. Na ordem de determinar a concentração de cada espécie, um sistema com três equações foi proposto, o mesmo foi baseado na soma das absorbâncias obtidas em dois diferentes valores de pH. A primeira equação foi obtida em pH 2,0 com a curva analítica de Se(VI); a segunda também para Se(VI), porém em pH 8,8 e a terceira obtida com Se(IV) em pH 8,8. O sistema apresentou para Se(IV) e Se(VI) respectivamente, as seguintes características: fatores de pré-concentração de 108 e 74 vezes, índices de consumo de 5,6 x 10<sup>-2</sup> e 8,1 x 10<sup>-2</sup> mL, eficiências de concentração de 37,0 e 25,4 FP min<sup>-1</sup> e limites de detecção de 49 e 31 ng L<sup>-1</sup>. Foram obtidos resultados satisfatórios para precisão com coeficiente de variação até 5,5% para Se(IV) na concentração de 2,0 µg L<sup>-1</sup> (n=6). A exatidão foi testada em material de referência certificado de *Dogfish* e com testes de recuperação, sendo que não houve diferença significativa entre o valor certificado e obtido com 95% de confiança (teste-t); e valores de recuperação na faixa de 99 – 110%. O método foi aplicado em amostras de águas e farmacêuticas e os resultados foram satisfatórios.

Palavras-chave: Selênio, Análise por Injeção em Fluxo, Extração em Fase Sólida, Espectrofotometria Atômica.

## Abstract

Selenium is one essential element for live organisms; nevertheless, there is one small range between its toxicity and essentiality, which depends on the selenium species. Thus, the development of sensitive technique is of utmost importance. In this work a home-made mini column filled with LC-SAX was coupled to GFAAS auto sampler using FIA system, which was used for in-line pre-concentration. Pre-concentration, elution and cleaning of the minicolumn in the FIA system were synchronized with GFAAS heating program. To speciation of Se compounds, 6 mL of sample, with two Se species, were prepared at pH 2.0 and 8.8, the elution was performed using 20  $\mu\text{L}$  of nitric acid directly in the graphite tube. The  $2^3$  factorial design to verify the significance of the variables was employed, and a Doehlert matrix and response surface for optimal values observation was used. The optimized values for pH, pre-concentration flow rate and eluent concentration were 8.8,  $4.0 \text{ mL min}^{-1}$  and  $2.8 \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. When pH was studied in the range of 2 to 8 was noted that in pH 2 only Se(VI) was pre-concentrated, on another hand, in pH above 6 both Se(IV) and Se(VI) can be determined. In order to determine each species a system with three equations was proposed and this system was based on the sum of absorbances obtained in two different pH. The first equation was obtained in pH = 2.0 with Se(VI) analytical curve; the second is for Se(VI) too but in pH = 8.8, and the third one was obtained with Se(IV) analytical curve in pH = 8.8. The system presented for Se(IV) and Se(VI) respectively, the following characteristics: enrichment factor of the 108 and 74, consume indices of the  $5.6 \times 10^{-2}$  and  $8.1 \times 10^{-2}$  mL, concentration efficiency of the 37.0 e 25.4 FE  $\text{min}^{-1}$ . The limit of detection were 49 and 31  $\text{ng L}^{-1}$  for Se(IV) and Se(VI), respectively. The method shown satisfactory results for precision with coefficient of variation up to 5.5% for Se(VI) when  $2.0 \text{ ug L}^{-1}$  was tested (n=6). The accuracy was checked with certified reference material, Dogfish, and with recovery tests. There is no significant difference between obtained and certified values with 95% confidence level (t-test), and the recovery values were in the range of 99 to 110%. The method was applied in water and pharmaceutical samples and the results were satisfactory.

Keywords: Selenium, Flow Injection Analysis, Solid Phase Extraction, Atomic Spectrophotometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Em (a) colunas de nanotubo de carbono, (b) nanotubo de carbono tratado com alumina, (c) alumina ativada, (d) sílica e (e) espuma de poliuretano, utilizadas nos testes de pré-concentração de selênio.....	32
Figura 2.2 -	Estrutura química de uma resina SAX.....	33
Figura 2.3 -	Esquema do sistema FIA, para triagem do sorvente, utilizado na pré-concentração/eluição de selênio e posterior determinação por GFAAS. Em S, soluções padrão de Se e/ou eluente a 1,5 mL min <sup>-1</sup> ; BP, bomba peristáltica; C, coluna e TE, tubo de ensaio.....	33
Figura 2.4 -	Em (a) Desenho esquemático da minicoluna utilizada no sistema de pré-concentração de selênio e em (b) uma fotografia da mesma.....	36
Figura 2.5 -	Diagrama esquemático do sistema de pré-concentração em fluxo <i>in-line</i> à GFAAS, demonstrando a etapa de limpeza da minicoluna. Componentes: microcomputador para aquisição de dados e controle das válvulas solenoides, HNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> , solução de limpeza. Em M, minicoluna trocadora de ânions (1,5 cm x 2,06 mm i.d.); V <sub>i</sub> , três válvulas solenoides de três vias; D, descarte e FG, forno de grafite.....	37
Figura 2.6 –	Em M, minicoluna do sistema de pré-concentração em três situações diferentes: (a) demonstrando o sistema aspirando 20 µL de eluente (E) posicionado no carrossel do autoamostrador, em (b) sistema aspirando nitrato de paládio (Pd) e em (c) posição final das duas soluções antes de serem injetadas dentro do forno de grafite (FG).....	38
Figura 2.7 -	Diagramas de distribuição das espécies de selênio.....	41
Figura 3.1 –	Em (a) Sinal de absorbância obtido com eluente ácido nítrico e em (b) com ácido clorídrico. Sinal de background em azul e sinal de absorbância dos átomos de selênio em vermelho.....	52
Figura 3.2 –	Diagrama de Pareto: CE, concentração do eluente (µg L <sup>-1</sup> ); VP, vazão de pré-concentração (ml min <sup>-1</sup> ) e pH da amostra. ....	54
Figura 3.3 –	Superfície de resposta, obtida da matriz de Doehlert, concentração do eluente (mol L <sup>-1</sup> ) e pH da amostra. ....	58

Figura 3.4 - Estudo do pH de adsorção dos ânions selenito (-♦-) e selenato (-■-) no sistema de pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS.....	59
Figura 3.5 – Curva analítica obtida pela pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS de soluções de selenito em pH 8,8.....	61
Figura 3.6 - Curva analítica obtida pela pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS de soluções de selenato em pH 8,8.....	61
Figura 3.7 - Curva analítica obtida pela pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS de soluções de selenato em pH 2,0.....	62
Figura 3.8 - Curva analítica construída sem pré-concentração de selenito em meio ácido nítrico 2,8 mol L <sup>-1</sup> .....	66
Figura 3.9 - Curva analítica construída sem pré-concentração de selenato em meio ácido nítrico 2,8 mol L <sup>-1</sup> .....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Espécies de selênio mais comumente encontradas em superfícies de águas continentais.....	17
Tabela 1.2 -	Trabalhos publicados empregando SPE de selênio e detecção em GFAAS.....	25
Tabela 2.1 -	Programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica.....	31
Tabela 2.2 -	Esquema das válvulas solenoides utilizadas no sistema de pré-concentração de selênio. ....	38
Tabela 2.3 -	Concentrações dos concomitantes estudados.....	43
Tabela 2.4 -	Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado na digestão de material de referência certificado.....	45
Tabela 3.1 -	Resultados obtidos na triagem do sorvente.....	50
Tabela 3.2 -	Escolha do sistema tampão.....	52
Tabela 3.3 -	Fatores, níveis e resultados obtidos no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	53
Tabela 3.4 -	Matriz de Doehlert e resultados obtidos em absorbância para o sistema de pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS para determinação de selenito.....	55
Tabela 3.5 -	Análise de variância (ANOVA) obtida da matriz de Doehlert. ....	56
Tabela 3.6 -	Influência de íons concomitantes na especiação de selênio.....	62
Tabela 3.7 -	Resultados de precisão intra-dia (repetibilidade) .....	63
Tabela 3.8 -	Resultados de precisão inter-corridas (precisão intermediária) .....	64
Tabela 3.9 -	Resultado encontrado após aplicação da metodologia proposta em material de referência certificado.....	64
Tabela 3.10 -	Parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas analíticas de Se (IV) em pH 8,8 e Se (VI) em pH 2,0; empregando o sistema de pré-concentração para especiação de selênio.....	65
Tabela 3.11 -	Parâmetros avaliados com relação à eficiência do sistema de pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS para especiação de selênio.....	68
Tabela 3.12	Aplicação em amostras simuladas.....	69
Tabela 3.13 -	Resultados dos testes de adição e recuperação das espécies de	

	selênio em amostras de águas naturais.....	70
Tabela 3.14 -	Resultado da análise de selênio quelato.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CRM** - do inglês certified reference material
- GFAAS** - do inglês electrothermal atomic absorption spectrometry
- FAAS** - do inglês flame atomic absorption spectrometry
- FIA** - do inglês flow-injection analysis
- ICP-MS** - do inglês inductively coupled plasma mass spectrometry
- ICP OES** - do inglês inductively coupled plasma optical emission spectrometry
- PTFE** - do inglês polytetrafluoroethylene
- SEC-CZE-ICP-MS** - do ingles size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometric
- SPE** - do inglês solid phase extraction

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	SELÊNIO.....	16
1.1.1	Ocorrência.....	16
1.1.2	Aspectos Fisiológicos.....	18
1.1.3	Deficiência de Selênio.....	19
1.1.4	Toxicidade.....	20
1.2	TÉCNICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO.....	20
1.2.1	Técnicas Hifenadas.....	21
1.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E/OU PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	23
1.3.1	Extração em Fase Sólida.....	23
1.3.2	Pré-concentração em Fluxo Acoplada à Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite.....	24
1.3.3	Pré-concentração em Fluxo Acoplada a Outros Detectores para Determinação de Selênio.....	26
1.3.4	Adsorventes Empregados na Pré-concentração de Selênio.....	26
1.4	OBJETIVO.....	27
1.5	JUSTIFICATIVA.....	27
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
2.1	EQUIPAMENTOS.....	29
2.2	REAGENTES.....	30
2.3	CONDIÇÕES OPERACIONAIS DO ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA.....	31
2.4	ESTUDOS PRELIMINARES PARA A MONTAGEM DO SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO.....	31
2.4.1	Preparo das Colunas para Triagem do Sorvente.....	32
2.4.2	Configuração do Sistema de Pré-concentração em Fluxo para Triagem do Sorvente.....	33
2.4.3	Triagem do Sorvente e do Eluente.....	34
2.4.4	Preparo da Minicoluna.....	35
2.4.5	Configuração do Sistema de Pré-concentração <i>in-line</i> à GFAAS para Determinação de Se.....	36

2.5	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO <i>IN-LINE</i> À GFAAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELENITO.....	39
2.5.1	Seleção da Vazão de Pré-concentração, Concentração do Eluente e pH da Amostra.....	40
2.6	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO.....	40
2.6.1	Curvas Analíticas para o Sistema de Especificação.....	42
2.6.2	Estudo de Concomitantes.....	43
2.6.3	Figuras de Mérito do Sistema de Especificação.....	44
2.6.3.1	Precisão.....	44
2.6.3.1.1	Precisão Intra-Corrída (Repetibilidade) .....	44
2.6.3.1.2	Precisão Intermediária (Precisão Inter-corrídas) .....	45
2.6.3.2	Exatidão.....	45
2.6.3.3	Linearidades, Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ) para o Sistema de Especificação.....	45
2.6.3.4	Curvas Analíticas sem Pré-concentração.....	46
2.6.3.5	Fatores de Pré-concentração, Índices de Consumo e Eficiências de Concentração.....	46
2.7	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS SIMULADAS.....	48
2.8	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	47
2.8.1	Águas Naturais.....	48
2.8.2	Selênio Quelato.....	48
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
3.1	TRIAGEM DO SORVENTE.....	50
3.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO <i>IN-LINE</i> À GFAAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELENITO.....	51
3.2.1	Seleção da Vazão de Pré-concentração, Concentração do Eluente e pH da Amostra.....	53
3.3	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO.....	58
3.3.1	Curvas Analíticas para o Sistema de Especificação.....	60
3.3.2	Estudo de Concomitantes.....	62
3.3.3	Figuras de Mérito do Sistema de Especificação.....	63
3.3.3.1	Precisão.....	63
3.3.3.1.1	Precisão Intra-Corrída (Repetibilidade) .....	63

3.3.3.1.2	Precisão Intermediária (Precisão Inter-corridas) .....	64
3.3.3.2	Exatidão.....	64
3.3.3.3	Linearidades, Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ) para o Sistema de Especificação .....	65
3.3.3.4	Curvas Analíticas sem Pré-concentração.....	66
3.3.3.5	Fatores de Pré-concentração, Índices de Consumo e Eficiências de Concentração.....	67
3.4	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS SIMULADAS.....	68
3.5	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	69
3.5.1	Águas Naturais.....	69
3.5.2	Selênio Quelato.....	70
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SELÊNIO

O selênio (Se) foi descoberto em 1817 por J. J. Berzelius, é um semi-metal do grupo dos calcogênios (6A) de número atômico 34 e peso molecular de  $78,96 \text{ g mol}^{-1}$ . À temperatura ambiente é sólido e apresenta seis isótopos estáveis:  $^{74}\text{Se}$  (fração natural 0,89%),  $^{76}\text{Se}$  (9,37%),  $^{77}\text{Se}$  (7,63%),  $^{78}\text{Se}$  (23,77%),  $^{80}\text{Se}$  (49,61%) e  $^{82}\text{Se}$  (8,73%) (SUZUKI et al., 2006), e possui quatro estados de oxidação: selenetos (-2,0), selênio elementar (0), selenito (+4) e selenato (+6) (WAKE, et al., 2004).

Uma das formas sólidas do Se e a mais termodinamicamente estável é o Se cinzento também conhecido por Se hexagonal ou metálico ( $\text{Se}^0$ ). Pode ser obtido mediante cristalização a partir do elemento em estado de fusão ou por condensação de vapor (OHLWEILER, 1971). Apresenta densidade de  $4,82 \text{ g cm}^{-3}$ , ponto de fusão de  $220,3 \text{ }^\circ\text{C}$  e ponto de ebulição de  $668^\circ\text{C}$ .

É um semiconductor usado em fotocélulas devido à propriedade de a luz incidente excitar seus elétrons. O Se monocíclico e o Se vítreo também chamado de Se preto são outras formas sólidas de Se, este último é usado como fotorreceptor no processo de fotocópia xerográfica (SHRIVER, 2003).

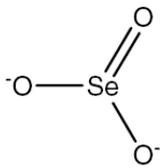
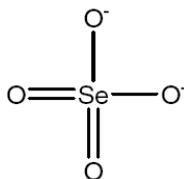
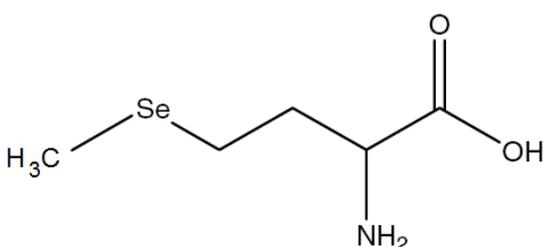
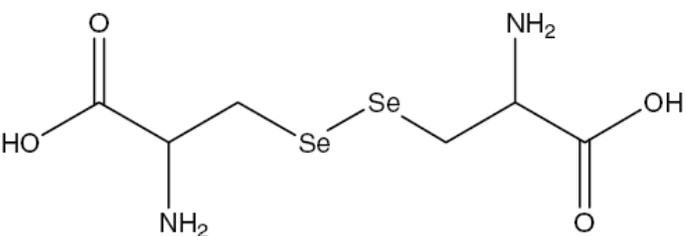
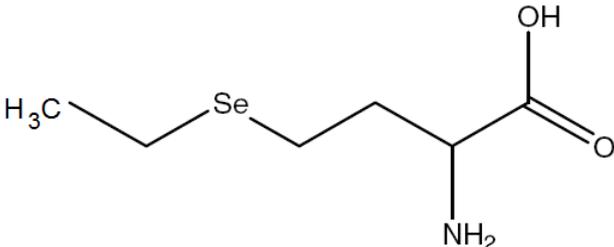
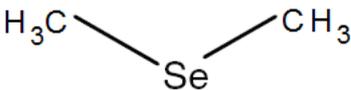
Os oxiânions: selenito (Se (IV),  $(\text{SeO}_3^{-2})$ ) e selenato (Se (VI),  $(\text{SeO}_4^{-2})$ ) são as formas inorgânicas mais conhecidas deste elemento (Tabela 1.1).

Quando na forma orgânica apresenta-se como selenoaminoácidos, sendo os compostos mais conhecidos a selenocisteína, selenometionina, selenoetionina e dimetilseleneto.

#### 1.1.1 Ocorrência

Selênio é encontrado no ar (MOSCOSO-PÉREZ, et al. 2008), plantas, alimentos e água. Neste último é mais frequente o aparecimento de fontes inorgânicas de Se.

Tabela 1.1 - Espécies de selênio mais comumente encontradas em superfícies de águas continentais.

Nome	Abreviatura	Estrutura
Selenito	Se (IV)	
Selenato	Se (VI)	
Selenometionina	SeMet	
Selenocisteína	SeCys	
Selenoetionina	SeEt	
Dimetilseleneto	DMSe	

Fonte: Adaptado de Wake et al. (2004) e Juresa, Kuehnelt e Francesconi (2006).

Os selenoaminoácidos são mais encontrados em proteínas de plantas e animais. Existem plantas que são acumuladoras de selênio, e podem ser divididas em três grupos: acumuladoras de selenito (brócolis e pepino), acumuladoras de SeMet (trigo

e cogumelo) e acumuladoras de metilselenocisteína (MeSeCys), alho e cebola (SUZUKI, 2005).

Em produtos farmacêuticos selenito de sódio e selenato de sódio muitas vezes aparecem quelados com aminoácidos, dando origem ao quelato de selênio. Este produto adiciona a vantagem de uma melhor absorção via oral do elemento em questão (DEG, 2007).

### 1.1.2 Aspectos Fisiológicos

Por meio de fontes nutricionais, diversas formas orgânicas e inorgânicas de selênio são absorvidas pelo organismo humano. Uma vez ingeridas, as formas de Se podem ser transformadas em um intermediário comum chamado seleneto ( $\text{HSe}^-$ ).

Nas células vermelhas do sangue, selenito é prontamente reduzido pela glutathione peroxidase a seleneto (SUZUKI, 2005), em seguida este ânion é lançado novamente na corrente sanguínea onde se liga à albumina para ser transportado ao fígado (SHIOBARA; SUZUKI, 1998).

Contudo, a espécie selenato necessita de condições mais rigorosas para ser reduzido a seleneto. Os íons selenato são levados pelo sistema de transporte do fosfato aos hepatócitos e são parcialmente excretados na urina (KOBAYASHI; OGRA; SUZUKI, 2001).

No fígado o selenato e o seleneto originado do selenito são utilizados para sintetizar selenoproteína P e diferentes isoformas de glutathione peroxidase (SUZUKI; ISHIWATA; OGRA, 1999).

Uma vez ingeridos, os compostos orgânicos de Se podem ser oxidados a selenato e selenito, mas na maioria das vezes os selenoaminoácidos são transformados em seleneto por meio de clivagem da ligação de Se ligado a carbono (SUZUKI; ISHIWATA; OGRA, 1999), além de seleneto também pode ser formado o composto reativo metilselenol ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ ) com propriedades anti-carcinogênicas.

No interior dos hepatócitos, parte do seleneto é utilizado para síntese de selenoproteínas (SUZUKI, 2005). Desta forma Se passa a fazer parte do centro ativo de selenoenzimas que catalizam reações de oxidação e redução.

Existem mais de 25 selenoproteínas (KRYUKOV, et al., 2003), as mais importantes são: selenoproteína P, que parece ter função antioxidante no espaço extracelular, iodotironina, que catalisa a conversão de tiroxina (T4) a triiodotironina (T3), tioredoxina redutase, está relacionada com a viabilidade e proliferação celular, a selenofosfato sintetase, é necessária para a síntese de outras selenoproteínas, a selenoproteína W, tem função muscular (ALLAN; LACOURCIERE; STADMAN 1999) e a glutathiona peroxidase, com ação antioxidante.

A outra parte do seleneto presente no fígado é excretada depois de ser metilada, sendo a sua maioria eliminada na urina (SUZUKI, 2005). Portanto a dosagem de Se nessa amostra pode ser utilizada como monitoramento dos níveis deste elemento no corpo humano.

Em casos de ingestão baixa de Se, o composto metilado excretado é o Se-metil-N-acetilgalactosamina (selenosugar), e em altas doses Se é excretado na forma anterior, sob a forma de trimetilselenonium (TMSe)  $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$  (SUZUKI; SOMEKAWA; SUZUKI, 2006) e através da respiração, responsável pela eliminação de Se na forma de dimetilseleneto (MCCONNELL; PORTMAN, 1952 apud SUZUKI, 2005).

### 1.1.3 Deficiência de Selênio

A Síndrome de Keshan é a doença mais relatada associada com a deficiência de selênio. Foi descrita pela primeira vez em 1935 na província chinesa de mesmo nome (LIU, et al., 2002). Os principais sintomas clínicos desta doença são os vários graus de cardiomegalia e descompensação cardíaca. Degeneração e necrose das fibras com substituição por fibrose, são encontrados na histopatologia do miocárdio (WHO, 2009).

Diversos trabalhos associam a deficiência de selênio com incidência de vários tipos de câncer, dentre eles podemos citar o trabalho de Ip et al. (2000).

#### 1.1.4 Toxicidade

No organismo humano existem cerca de 10 mg Se por 60 Kg de peso corporal (SUZUKI, 2005). A concentração normal encontrada no sangue é de 0,076-0,14 mg L<sup>-1</sup>, soro/plasma 0,05-0,15 mg L<sup>-1</sup> e urina 0,002-0,03 mg L<sup>-1</sup>, a concentração tóxica é de 0,4 mg L<sup>-1</sup> no soro/plasma e na urina, e a concentração letal é de 1 mg L<sup>-1</sup> no sangue e 2 mg L<sup>-1</sup> na urina (REPETTO; REPETTO, 2005). A ingestão diária recomendada é de 55 µg de Se, segundo o Instituto de Medicina (2000, apud XIA et al., 2005), uma intoxicação pode ocorrer quando ultrapassada a ingestão de 400 µg de Se por dia, cujos sintomas são: vômitos, queda de cabelos, irritabilidade, náuseas, neuropatia periferal e fadiga (CHERNOFF, 2005).

A toxicidade varia de acordo com a espécie química do elemento, sendo que selenito é considerado mais tóxico que selenato (MORENO; PÉREZ-CONDE; CÁMARA, 2000).

O limite máximo aceitável de selênio total em águas doces destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado (classe 1) segundo Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005) e Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008) é de 10 µg L<sup>-1</sup>.

Portanto, a determinação deste elemento em amostras biológicas e ambientais necessita da utilização de técnicas sensíveis.

## 1.2 TÉCNICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO

Várias técnicas podem ser utilizadas para determinação de selênio em diferentes matrizes, como exemplo a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Burguera e Burguera (2007) revisaram configurações *on-line* para esta técnica, no trabalho os autores inferem à mesma características baseadas em robustez, custo das análises relativamente baixo e sensibilidade para determinações de metais em níveis de µg L<sup>-1</sup>.

Uma outra revisão sobre GFAAS aplicada em amostras de sangue humano para determinação de selênio foi escrita por Sabé; Rubio e García-Beltrán (2000),

onde os autores concluíram que a mesma é muito sensível, entretanto a temperatura de pirólise deve ser muito bem estabelecida a fim de evitar perdas do analito, além da escolha de um modificador químico adequado, sendo os melhores resultados obtidos quando nitrato de paládio foi usado.

Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (STURUP; HAYES; PETERS, 2005), espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (MACHÁT; KANICKÝ; OTRUBA, 2002), espectrofotometria ultra violeta-visível (SUVARDHAN et al., 2007; ZHENGJUN et al., 2005), fluorescência de raios-X (GORDEEVA et al., 2003) e voltametria (STOZHKO, et al. 2006) também já foram utilizadas na determinação de selênio.

### 1.2.1 Técnicas Hifenadas

Nas análises de amostras complexas, técnicas analíticas de separação são utilizadas com o principal objetivo de promover aumento da sensibilidade e/ou *clean-up* da amostra. Após a amostra sofrer separação, a mesma é inserida no detector específico. Neste sentido a separação, detecção e a interface entre eles devem ser otimizadas.

São vários os exemplos de técnicas hifenadas para determinação de selênio. Frequentemente encontradas são as técnicas de acoplamento entre a cromatografia líquida de alta eficiência a detectores de emissão, absorção ou fluorescência atômica e também espectrometria de massas, revisado por Guerin, Astruc e Astruc (1999).

A junção da cromatografia líquida de alta eficiência ao espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente é bastante comum. Um exemplo é o trabalho Li et al., (2007) que determinaram compostos de selênio orgânicos e inorgânicos em amostras de urina de pacientes que ingeriram selênio, o limite de detecção variou na faixa de 0,05 – 1,48  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Como exemplos deste tipo de acoplamento também podem ser citados os trabalhos de Juresa, Kuehnelt e Francesconi (2006), Cankur, Yathavakilla e Caruso (2006), Wang et al. (2007), Encinar et al. (2004) e Palacios et al. (2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência também foi utilizada por Gómez e colaboradores (1998), acoplada à espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e à espectrometria de fluorescência atômica por Gómez-Ariza et al. (2000) e Liang et al. (2006).

Outras técnicas hífenadas para determinação de selênio são encontradas entre o acoplamento da eletroforese capilar com detecção direta no ultra-violeta visível (SLADCOV et al., 2003), cujos limites de detecção foram de 315,6 – 1578,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Se (IV) e Se (VI), respectivamente. O acoplamento entre SEC-CZE-ICP-MS foi realizado por Mounicou et al. (2002). Neste trabalho um grande número de analitos foram separados (Se (IV), Se (VI), SeCys, SeMet e SeEt, sendo os limites de detecção encontrados na faixa de 7-18  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A eletroforese capilar também foi acoplada ao detector por quimioluminescência por Deng et al. (2008), para determinação de SeMet obtendo o limite de detecção de 0,39  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Um limite de detecção de apenas 0,02  $\text{ng L}^{-1}$  (KREMER; ILGEN; FELDMANN, 2005), foi encontrado com o acoplamento da cromatografia gasosa ao ICP-MS para detecção do metabólito gasoso dimetilseleto.

Amplamente descrita na literatura para determinação de selênio, a técnica de geração de hidretos acoplada a FAAS resulta em alta sensibilidade, na faixa de 0,065 a 10,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Nesta técnica, borohidreto de sódio em meio ácido é utilizado para a redução de Se (IV) em hidreto de selênio. Este gás é atomizado em um tubo de quartzo colocado sobre a chama do espectrômetro de absorção atômica (BOHRER et al, 2007; MATUSIEWICZ; KRAWCZYK, 2006; MACHADO; JACINTHO; GINÉ, 1999; MALEKI; SAFAVI; DOROODMAND, 2005 e COELHO; BACCAN, 2004).

Uma vez que somente selenito é convertido em hidreto de selênio, uma etapa de redução de Se (VI) para Se (IV) torna-se necessária quando o objetivo da técnica for a determinação de selênio total. Para esta redução é utilizado HCl 5  $\text{mol L}^{-1}$  a 95°C durante 20 min (MACHADO; JACINTHO; GINÉ, 1999).

Se o objetivo do procedimento for a realização da especificação de selênio, faz-se a análise da amostra, sem o pré-tratamento descrito acima, onde determina-se Se (IV) e após o referido tratamento obtém-se a leitura de selênio total, pela diferença encontra-se a concentração de Se (VI).

### 1.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E/OU PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Atualmente é grande a preocupação em se quantificar elementos em baixos níveis de concentração ( $\leq \mu\text{g L}^{-1}$ ). Nesse contexto, a utilização de técnicas sensíveis na determinação de espécies em níveis cada vez menores pode estar combinada com diversas técnicas de extração e/ou pré-concentração. Como exemplos podemos citar as técnicas de extração líquido-líquido, precipitação e a extração em fase sólida.

#### 1.3.1 Extração em fase sólida

O uso da extração em fase sólida foi iniciado em meados da década de 1970, o principal objetivo na época era eliminar as desvantagens oferecidas pela extração líquido-líquido, entre elas podem ser citadas: a propriedade de amostras solúveis em água serem parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, possibilidade de formação de emulsões, volumes relativamente grandes de amostras e solventes, processo tedioso, entre outros (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

De acordo com Wake et al. (2004), a extração em fase sólida encontra-se entre as técnicas de pré-concentração mais utilizados para selênio. Segundo os mesmos autores as principais vantagens desta técnica são os elevados fatores de pré-concentração que podem ser encontrados, levando a menores limites de detecção, fácil automação e possibilidade de acoplamento *on-line*.

Separações *on-line* por sorção são sempre realizadas por meio de colunas (FANG, 1993). Estas são feitas através do acoplamento direto da pré-concentração em fluxo a um detector específico de um equipamento.

A maioria dos trabalhos empregando pré-concentração *on-line* à espectrometria de absorção atômica são realizados com a técnica em chama. A primeira contribuição deste tipo de acoplamento ocorreu em 1983 por Olsen et al. Este acoplamento é relativamente simples uma vez que a técnica em chama trabalha com fluxos contínuos.

### 1.3.2 Pré-concentração em Fluxo Acoplada à Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite.

Em forno de grafite, o acoplamento da pré-concentração em fluxo é mais complexo, este ocorre de modo descontínuo, paralelo e sincronizado com o processo de atomização. Outro desafio é o reduzido volume de amostra que pode ser utilizado, estando limitado no máximo a 100  $\mu\text{L}$ , entretanto melhores limites de detecção são alcançados por esta técnica, quando a mesma é comparada à FAAS.

O primeiro trabalho de pré-concentração *on-line* ao espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica foi publicado em 1990 por Fang, Sperling e Welz. Foram utilizadas duas bombas peristálticas controladas automaticamente por um computador, tubos de Tygon e de PTFE, um injetor de cinco canais e uma coluna recheada com  $\text{C}_{18}$ . Cinco estágios foram necessários desde a pré-concentração até a completa eluição dentro do tubo de grafite. Porém, uma etapa manual foi utilizada para inserir o capilar de eluição dentro do tubo de grafite antes de ser iniciado o sistema de pré-concentração.

A Tabela 1.2 apresenta alguns trabalhos publicados sobre SPE para determinação de selênio e detecção em GFAAS. Podem ser observados trabalhos utilizando todo o procedimento de SPE no modo em batelada, onde a pré-concentração com sorventes ocorre em sistema aberto.

Outros autores utilizaram a SPE em fluxo, porém sem acoplamento direto ao detector.

Por fim, três artigos demonstram um sistema de pré-concentração em fluxo acoplado diretamente ao detector do espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica, semelhante ao trabalho desenvolvido por Queiroz et al. (2002), para determinação de cobre, onde o termo “in-line” foi utilizado para designar este modo de acoplamento. Este termo também foi utilizado no presente trabalho.

Algumas vantagens do acoplamento *in-line* são: economia de reagentes, aumento da frequência analítica, baixo risco de contaminação da amostra e perdas do analito.

A interface neste tipo de acoplamento ocorre entre o braço do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e o tubo de polietileno do sistema FIA.

Tabela 1.2 - Trabalhos publicados empregando SPE de selênio e detecção em GFAAS.

Analito	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Amostra (ml)	Sorvente	SPE	Acoplamento ao detector	Referência
Se total	–	Sedimento e água natural (100,0 – 1000,0)	Carvão Ativado	Batelada	<i>Off-line</i>	(KUBOTA; SUZUKI; OKUTANI, 1995)
Se (IV) Se (VI)	5,0	Águas Naturais (50,0 – 500,0)	Resina na forma de Mo	Batelada	<i>Off-line</i>	(KUBOTA; OKUTANI, 1997)
Se (IV)	0,0047	Águas Naturais (100,0)	Dióxido de titânio	Batelada	<i>Off-line</i>	(LI; DENG, 2002)
Se (VI)	0,0063	(100,0)				
Se (IV) Se (VI)	0,06	Águas Naturais (100,0)	Dióxido de titânio	Batelada	<i>Off-line</i>	(ZHANG et al., 2007)
Se total	0,08	Água (150,0)	Espuma de poliuretano	em fluxo	<i>Off-line</i>	(ARPADJAN; VUCHKOVA; KOSTADINOVA, 1997)
Se (IV) Se (VI)	0,049 800,0	Águas Naturais (100,0)	Alumina Ativada	em fluxo	<i>Off-line</i>	(PYRZYŃSKA; DRZEWICZ; TROJANOWICZ, 1998)
Se total	0,14	Materiais de referência certificados (25,0)	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub>	em fluxo	<i>Off-line</i>	(DIAS; CADORE; BACCAN, 2003)
Se (IV) Se (VI)	0,01	Amostras ambientais (40,0)	Diaion HP-2MG	em fluxo	<i>Off-line</i>	(SAYGI et al., 2007)
Se (IV)	0,0045	Água (4,2)	RP C18	em fluxo	<i>On-line</i>	(YAN; SPERLING; WELZ, 1999)
Se (IV) Se (VI)	0,01	Água Potável (9,0)	DOWEX 1X8	em fluxo	<i>On-line</i>	(STRIPEIKIS et al., 2004)
Se (VI)	0,006	Solução parenteral (1,0)	L-metionina	em fluxo	<i>On-line</i>	(PACHECO et al., 2008)

<sup>a</sup>Limites de detecção convertidos para microgramas por litro a partir dos valores encontrados nos artigos originais.

Alguns trabalhos utilizam o próprio sistema FIA para injeção da amostra no forno de grafite, sendo o volume da mesma controlado por uma alça de amostragem (YAN; SPERLING; WELZ, 1999) e (PACHECO et al., 2008), em trabalho semelhante

o volume de amostra foi controlado pela bomba tipo seringa do espectrômetro de absorção atômica (STRIPEIKIS et al., 2004).

### 1.3.3 Pré-concentração em Fluxo Acoplada a Outros Detectores para Determinação de Selênio.

Também é comum o acoplamento da extração em fase sólida a outros detectores específicos. Esta união já foi realizada empregando sílica modificada com brometo de cetiltrimetilamônio ao ICP OES por Xiong, He e Hu (2008). Se (VI) foi determinado após adsorção na coluna, selênio total após oxidação de Se (IV) para Se (VI) com  $\text{KMnO}_4$  e Se (IV) pela diferença entre Se total e Se (VI). O limite de detecção para selenato em amostra de água natural foi de  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Yu et al. (2004), obtiveram o limite de detecção de apenas  $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$  ao determinarem espécies inorgânicas de Se em amostras de água. Foi realizado um acoplamento da extração em fase sólida, empregando uma coluna de  $\text{C}_{18}$  não polar, ao ICP-MS. Na amostra foi adicionado o complexante para selenito pirrol ditiocarbamato de amônio, esta amostra foi pré-concentrada e o efluente contendo selenato foi levado à leitura. Para determinação de Se total utilizou-se uma alíquota da amostra que não passou pela etapa de pré-concentração e a determinação de selenito foi realizada pela diferença entre as concentrações de Se total e Se (VI).

### 1.3.4 Adsorventes Empregados na Pré-concentração de Selênio

Os principais mecanismos de separação em SPE são: adsorção, partição, exclusão por tamanho e troca iônica. Este último é empregado para separação/pré-concentração de analitos na sua forma iônica e geralmente o adsorvente possui grupamentos catiônicos ou aniônicos ligados à sua superfície (LANÇAS, 2004).

A resina trocadora forte de cátions (SCX, do inglês *strong cation exchanger*) geralmente possui o grupamento  $[\text{SO}_3^-]$  ligado na sua superfície, e a resina trocadora forte de ânions (SAX, do inglês *strong anion exchanger*) comumente possui o

grupamento  $N^+(CH_3)_3$ . Neste último caso, empiricamente pode-se constatar que a eluição ocorrerá com o uso de um eluente que possua no mínimo um pH de duas unidades menor que o  $pK_a$  do analito (STRIPEIKIS et al., 2004; JITMANEE et al., 2007).

Um exemplo do uso de uma resina trocadora de ânions fortemente básica pode ser encontrado no trabalho de STRIPEIKIS et al. (2004). A resina DOWEX 1X8 foi empregada e o principal desafio encontrado pelos autores estava relacionado à eluição total de selênio da coluna, levando ao uso de concentrações altas de ácidos usados como eluentes. Muromac<sup>®</sup> 2X8 é outro exemplo de uma resina trocadora de ânions, esta foi empregada por Jitmanee et al. (2007).

Alguns trabalhos utilizam complexantes baseados em ditiocarbamatos a fim de possibilitar a adsorção do analito nos sorventes empregados (SAYGI et al., 2007; DIAS; CADORE; BACCAN, 2003; YAN; SPERLING; WELZ, 1999 e ARPADJAN; VUCHKOVA; KOSTADINOVA, 1997).

#### 1.4 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi propor um método para especificação de selênio por meio do acoplamento das técnicas de pré-concentração em sistema de análise por injeção em fluxo e a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite.

#### 1.5 JUSTIFICATIVA

O fato de selênio ser um elemento essencial para os organismos vivos e seus níveis em fontes naturais variarem grandemente nas diversas partes do mundo, têm levado a um aumento do seu consumo na forma de suplementação alimentar ou através do uso de medicamentos. E baseando-se no princípio de que esse elemento é tóxico e essa toxicidade variar de acordo com a espécie química envolvida, o consumo abusivo do mesmo pode ocasionar danos à saúde humana. De acordo

com o exposto, justifica-se o estudo da especiação das espécies de selênio em fontes naturais, como a água e também em matérias-primas utilizadas para a fabricação de fórmulas farmacêuticas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no presente trabalho, listados abaixo, encontram-se no Laboratório de Análise Química de Fármacos da Universidade Federal de Alfenas.

Balança analítica modelo AY220 (SHIMADZU<sup>®</sup>);

Purificador de água modelo Milli - Q Academic (MILLIPORE<sup>®</sup>);

Espectrômetro de absorção atômica modelo AAS 5 EA (ZEISS<sup>®</sup>), com aquecimento transversal do tubo de grafite com plataforma de L'vov, lâmpada de deutério para correção de background e autoamostrador MPE 5;

Lâmpada de catodo oco de Se (AnalytikJenaAG<sup>®</sup>), como fonte de radiação.;

Potenciômetro modelo 1 Schott (Handylab<sup>®</sup>), utilizado para medidas dos valores de pH;

Forno de microondas modelo Ethos Plus (MILESTONE<sup>®</sup>), usado para a digestão das amostras;

No sistema FIA foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais:

Bomba peristáltica de oito canais IPC (ISMATEC<sup>®</sup>) e tubos de Tygon<sup>®</sup> de 2,06 mm d.i., utilizados para propulsão dos fluidos;

Válvulas solenoides de três vias (NRerch<sup>®</sup>) e tubos de polietileno de 0,8 mm de d.i., para interconexão do sistema;

Sistema eletrônico, montado no próprio laboratório de pesquisa, cuja função era acionar ou desligar as válvulas solenoides;

Microcomputador PC (IBM<sup>®</sup>), processador PENTIUM 133 MHZ, 64 MB de memória RAM, usado para aquisição de dados e controle do sistema eletrônico.

## 2.2 REAGENTES

Seguem os reagentes empregados no presente trabalho.

Se 1000 mg ( $\text{SeO}_2$  em  $\text{HNO}_3$  6,3%), Titrisol<sup>®</sup> (Merck), utilizado no preparo das soluções padrão de íons selenito;

Selenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) (Merck<sup>®</sup>), utilizado no preparo das soluções padrão de íons selenato;

Peróxido de hidrogênio (Merck<sup>®</sup>) e ácido nítrico (Merck<sup>®</sup>), usados para digestão das amostras, sendo que o último também foi utilizado como eluente;

Cloreto de amônio (Impex<sup>®</sup>), amônia (Impex<sup>®</sup>), ácido bórico (Merck<sup>®</sup>) e hidróxido de sódio (Vetec<sup>®</sup>), usados no preparo do sistema tampão;

Nitrato de paládio (Aldrich Chemical Company<sup>®</sup>), utilizado como modificador químico durante o processo de pirólise;

Reagentes utilizados na triagem do sorvente: ácido ascórbico (VETEC<sup>®</sup>), ácido clorídrico (VETEC<sup>®</sup>), dietilditiofosfato de amônio (ACROS ORGANICS<sup>®</sup>) e etanol (MERCK<sup>®</sup>);

Nitrito de Sódio (MERCK<sup>®</sup>), cloreto de sódio (IMPEX<sup>®</sup>), nitrato de sódio (ECIBRA<sup>®</sup>), manganês (MERCK<sup>®</sup>) e alumínio (MERCK<sup>®</sup>), foram usados no teste de concomitantes;

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (pureza > 93%, 10-40 nm de diâmetro e 5-20  $\mu\text{m}$  de comprimento) (CNT Co., Ltda), nanotubos de carbono tratado com alumina (AMAI, et al. 2007), espuma de poliuretano (ARPADJAN; VUCHKOVA; KOSTADINOVA, 1997), sílica (lã de vidro) e alumina ativada (PYRZÝNSKA; DRZEWICZ; TROJANOWICZ, 1998), utilizados na triagem do sorvente;

Resina trocadora de ânions LC SAX (SUPELCO<sup>®</sup>), empregada como sorvente.

### 2.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DO ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

As condições de temperatura das etapas de pirólise e atomização para determinação de selênio foram adaptadas do trabalho de Saygi et al. (2007). As mesmas encontram-se na Tabela 2.1.

Para atomização de selênio foram utilizados tubos de grafite revestidos piroliticamente.

Tabela 2.1 - Programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

Etapas	T (°C)	Rampa (°Cs <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Gás Ar (mL min <sup>-1</sup> )
Secagem	110	15	15	250
Pirólise	1100	10	20	250
Atomização	2100	FP	5	0
Limpeza	2600	1000	3	250

FP (do inglês, *full power*)

O comprimento de onda de 196 nm, largura da fenda de 1,2 nm, tempo de integração de sinal de 5 segundos e um volume de injeção de 20 µL, são algumas condições operacionais do utilizadas. A correção do sinal de fundo foi feita com lâmpada de deutério.

### 2.4 ESTUDOS PRELIMINARES PARA A MONTAGEM DO SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO.

É importante salientar que para ser otimizado, qualquer sistema precisa de uma versão inicial, nesse contexto, nesse trabalho, o primeiro procedimento consistiu em construir colunas e selecionar um sorvente e um eluente adequado para a pré-concentração do analito.

### 2.4.1 Preparo das Colunas para Triagem do Sorvente

Colunas com vários sorventes foram preparadas para o teste de triagem. No procedimento, duas ponteiras de micropipetador serviram de suporte para o sorvente (Figura 2.1). Lã de vidro ( $\text{SiO}_2$ ) foi introduzida nas pontas deste suporte, para evitar a perda do sorvente e tubos de polietileno de 0,8 mm de d.i. foram conectados nas extremidades dos mesmos possibilitando a conexão da coluna com o sistema FIA. Tubos de Tygon<sup>®</sup> foram usados com a finalidade de selar as duas ponteiras.

Foram pesadas 30 mg do sorvente e 100 mg de lã de vidro, assim, fez-se necessário um estudo para verificar a sorção do analito na sílica, ou seja, a sílica em forma de lã de vidro também foi empregada como sorvente.

No recheio das colunas os sorventes foram pesados em béquer, ressuspensos em quantidade suficiente de água deionizada e aspirados através de um sistema FIA em linha única (Figura 2.3) para o interior do suporte sólido.

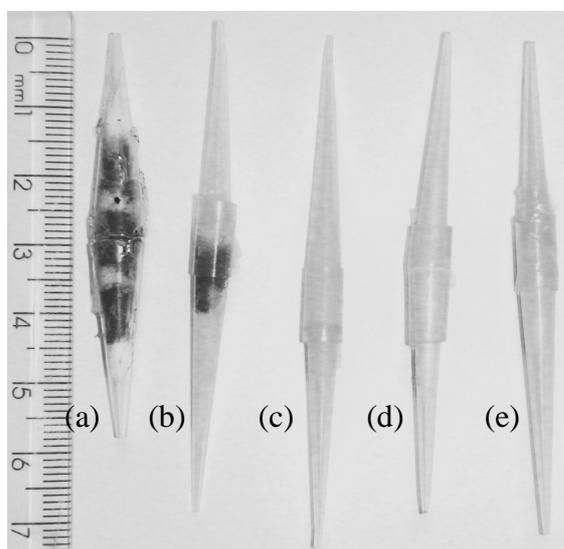


Figura 2.1 – Em (a) colunas de nanotubo de carbono, (b) nanotubo de carbono tratado com alumina, (c) alumina ativada, (d) sílica e (e) espuma de poliuretano, utilizadas nos testes de pré-concentração de selênio.

A resina trocadora de ânions foi retirada de um cartucho de extração para preparo de amostras LC-SAX (SUPELCO<sup>®</sup>).

Este adsorvente é um trimetilaminopropilsilano, trocador forte de ânions (SAX, do inglês, *strong anion exchanger*), uma amina quaternária ligada à uma sílica que possui como contra-íon  $\text{Cl}^-$  (Figura 2.2).

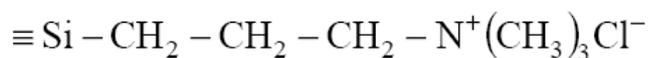


Figura 2.2 – Estrutura química de uma resina SAX.  
Fonte: Adaptado de Queiroz, Collins e Jardim (2001).

A interação entre o analito e a resina ocorre por meio de atração eletrostática dos ânions selenito e selenato pelo átomo de nitrogênio protonado.

Para ocorrer a troca iônica em solução aquosa, o pH da amostra deve ser aquele no qual ambos componentes de interesse, analitos e grupo funcional ligado na sílica, estejam ionizados.

A eluição ocorrerá com uma solução que possua, no mínimo, um pH de duas unidades a menos que o  $\text{pK}_a$  do analito.

#### 2.4.2 Configuração do Sistema de Pré-concentração em Fluxo para Triagem do Sorvente.

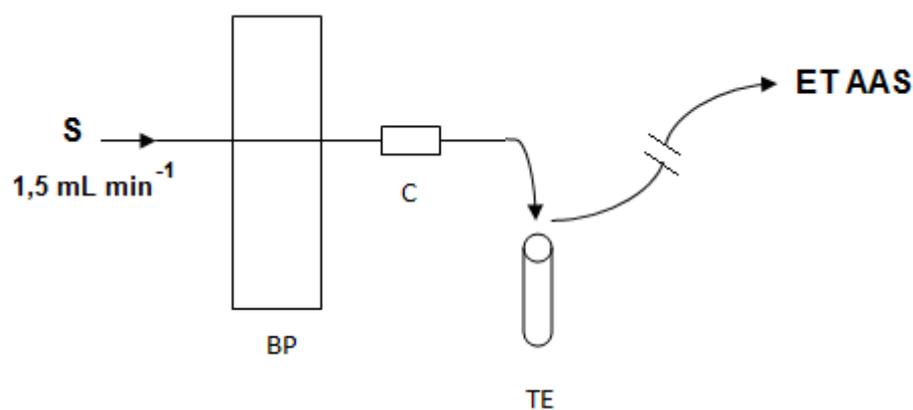


Figura 2.3 - Esquema do sistema FIA, para triagem do sorvente, utilizado na pré-concentração/eluição de selênio e posterior determinação por GFAAS. Em S, soluções padrão de Se e/ou eluente a 1,5 mL min<sup>-1</sup>; BP, bomba peristáltica; C, coluna e TE, tubo de ensaio.

A configuração do sistema FIA utilizado na pré-concentração/eluição de selênio para a triagem do sorvente está representada na Figura 2.3.

Neste sistema foram utilizados tubos de Tygon<sup>®</sup> de 2,06 mm d.i., tubos de polietileno de 0,8 mm d.i., bomba peristáltica de oito canais e colunas de sorventes.

#### 2.4.3 Triagem do Sorvente e do Eluente.

Para a triagem do sorvente consideraram-se os relatos na literatura dessas substâncias bem como sua disponibilidade no Laboratório de Análise Química de Fármacos da Universidade Federal de Alfenas.

Os sorventes testados foram: nanotubos de carbono (NTC) sem tratamento (TARLEY, et al. 2006), NTC tratado com alumina (AMAIS, et al. 2007), alumina ativada (PYRZÝNSKA; DRZEWICZ; TROJANOWICZ, 1998), sílica (SiO<sub>2</sub>) (lã de vidro), espuma poliuretano (ARPADJAN; VUCHKOVA; KOSTADINOVA, 1997) e resina trocadora de ânions (GÓMEZ-ARIZA et al., 2000).

Outro fato a considerar é a pré-concentração das diferentes espécies de Se, e.g., Se<sup>o</sup> (AFKHAMI; MADRAKIAN, 2002), selenito (SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) (JITMANEE et al., 2007) e Se complexado (DIAS; CADORE; BACCAN, 2003). Nesse contexto, no presente trabalho, o selenito foi testado em todas as colunas mencionadas. Se<sup>o</sup> e Se complexado foram testados com a coluna de NTC, e também com sílica.

A fim de se pré-concentrar selenito uma solução padrão do mesmo na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup> foi preparada. Se<sup>o</sup> foi obtido a partir da redução de selenito (100 µg L<sup>-1</sup>) com ácido ascórbico 1% (m/v). Para o preparo de selênio complexado reagiu-se selenito (100 µg L<sup>-1</sup>) com dietilditiofosfato de amônio 1% (m/v).

Essas soluções padrão foram inseridas em um sistema em fluxo (subseção 2.4.2) e para constatar a ocorrência ou não de adsorção verificou-se a concentração de Se nas soluções após passarem pelas colunas.

Para os sorventes que apresentaram resultados positivos com relação à adsorção, prosseguiram-se os estudos investigando o eluente adequado para cada coluna.

No estudo da eficiência de eluição foi empregado o mesmo sistema FIA (subseção 2.4.2), contudo determinou-se a concentração de Se no eluato. Assim, foram empregados os seguintes eluentes:

Para alumina ativada e LC-SAX, foram empregados como eluentes HCl 0,12 mol L<sup>-1</sup> e HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>, para sílica os eluentes foram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,8 mol L<sup>-1</sup>/HNO<sub>3</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup> e KBrO<sub>3</sub> 0,0625 mol L<sup>-1</sup>/HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Para nanotubo de carbono foram empregados como eluentes etanol e uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em meio hidroetanólico contendo 80 % (v/v) de etanol. O ácido clorídrico foi testado por possuir o mesmo ânion do contra-íon da resina LC-SAX, ácido nítrico por ter sido utilizado no trabalho de Jitmanee et al. (2007) onde foi utilizada uma resina trocadora de ânions, peróxido de hidrogênio e bromato de potássio em meio ácido, por serem fortes oxidantes e etanol por ter apresentado resultados satisfatório no trabalho de Dias, Cadore e Baccan (2003).

#### 2.4.4 Preparo da Minicoluna

Após a triagem do material sorvente, foram construídas minicolunas recheadas com a resina trocadora de ânions LC-SAX para adaptação ao sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS (Figura 2.4). No preparo das mesmas foram utilizados: um pedaço de tubo de Tygon<sup>®</sup> que serviu de suporte sólido para a resina, lã de vidro que foi utilizada para evitar a perda do sorvente e tubos de polietileno de 0,8 mm d.i. inseridos em ambas extremidades do suporte sólido. Uma extremidade dessa minicoluna foi conectada ao sistema FIA e a outra foi inserida no braço do autoamostrador, com a finalidade de injetar o eluato dentro do tubo de grafite.

Inicialmente foi construída uma minicoluna com um pedaço de tubo de Tygon<sup>®</sup> de 3,05 mm d.i., onde foi constatada a formação de caminhos preferenciais que prejudicavam a repetibilidade das determinações. Em seguida foi utilizado um Tubo de Tygon<sup>®</sup> de 1,5 mm d.i. que levou a uma alta pressão no sistema de pré-concentração. Finalmente foi preparada uma minicoluna com 2,06 mm d.i. e 1,5 cm de comprimento com a qual foi obtido êxito nas determinações. Para recheiar esta minicoluna o procedimento adotado foi o mesmo realizado para as colunas de triagem do sorvente (subseção 2.4.1).

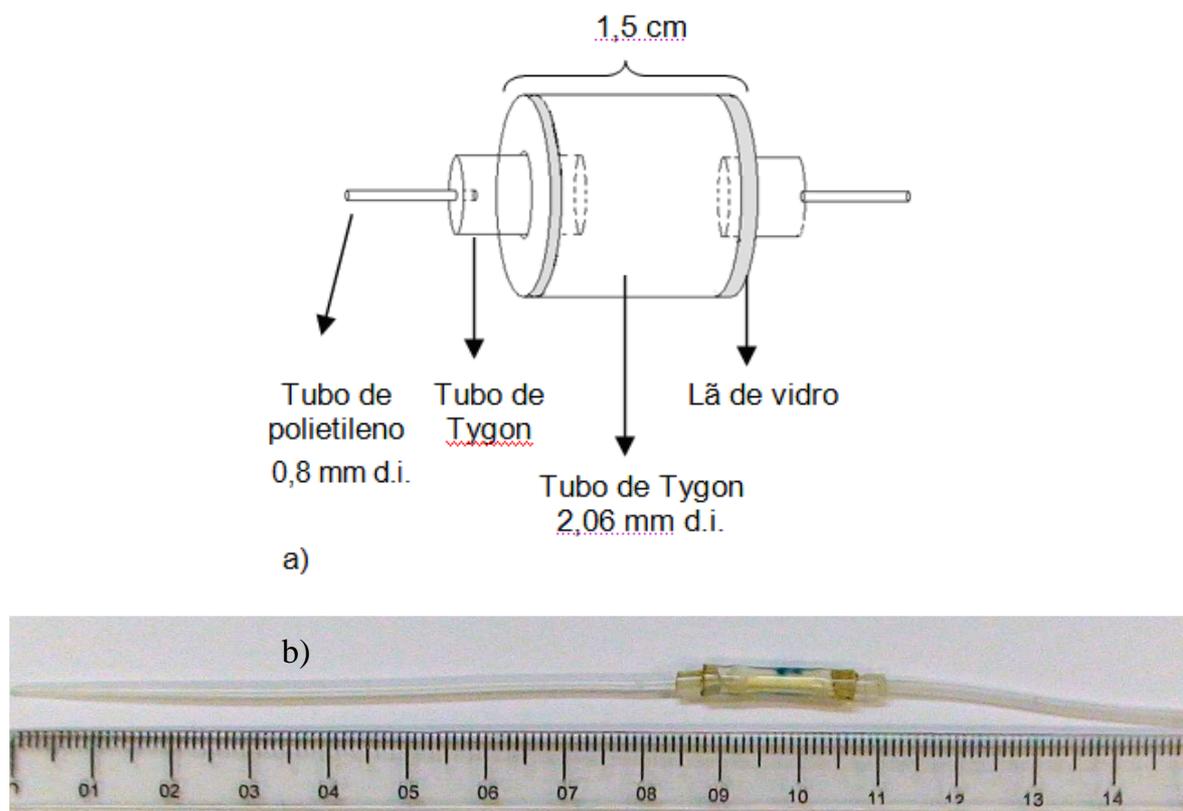


Figura 2.4 – Em (a) desenho esquemático da minicoluna utilizada no sistema de pré-concentração de selênio e em (b) uma fotografia da mesma.

#### 2.4.5 Configuração do Sistema de Pré-concentração *in-line* à GFAAS para Determinação de Se

O sistema FIA para pré-concentração de Se foi acoplado no autoamostrador do aparelho de absorção atômica. Este sistema em fluxo é semelhante ao mencionado por Queiroz, et al. (2002). Foram utilizados: uma bomba peristáltica de oito canais e tubos de Tygon® de 2,06 mm de d.i., para propulsão dos fluidos; três válvulas solenoides de três vias e tubos de polietileno de 0,8 mm de d.i., para interconexão do sistema e direcionamento das soluções e um microcomputador para aquisição de dados e controle do sistema eletrônico.

A Figura 2.5, apresenta o diagrama do sistema FIA empregado. Uma interface construída no laboratório (FIGUEIREDO, et al., 2006), fez a conexão entre o microcomputador e o sistema eletrônico de controle das válvulas solenoides. O

acoplamento entre o sistema FIA e o espectrômetro de absorção atômica foi realizado por meio do braço do autoamostrador do equipamento e o tubo de polietileno de uma das extremidades da minicoluna e através da válvula solenoide ( $V_1$ ) com a bomba tipo seringa do equipamento.

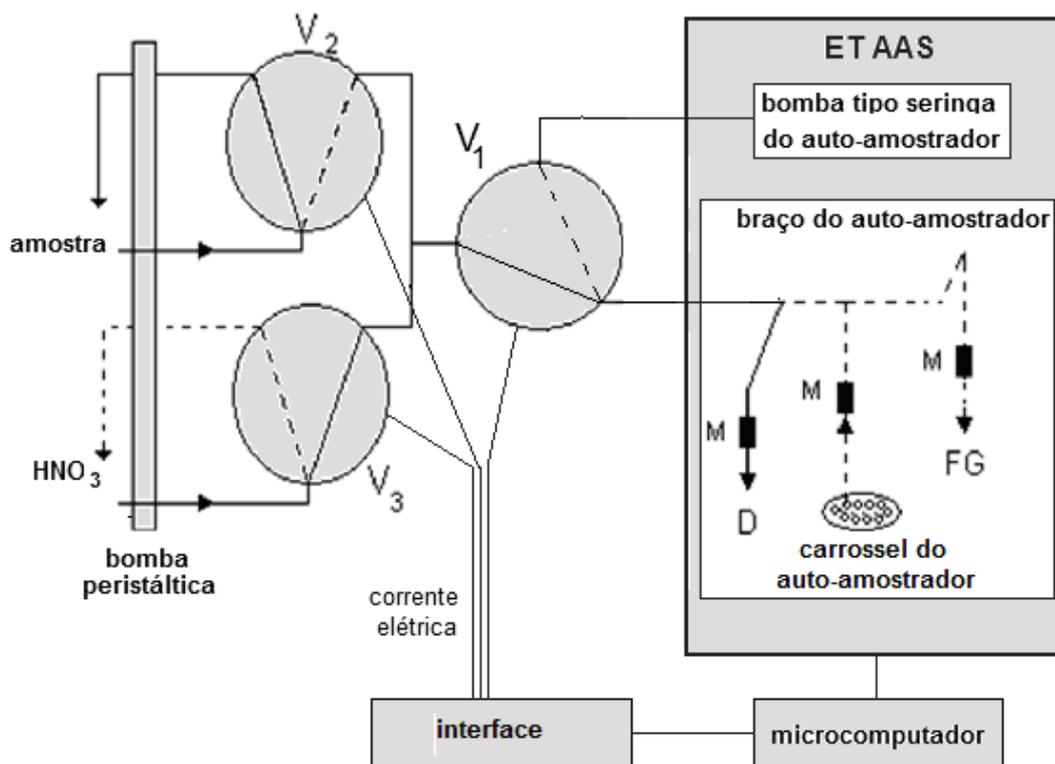


Figura 2.5 – Diagrama esquemático do sistema de pré-concentração em fluxo *in-line* à GFAAS, demonstrando a etapa de limpeza da minicoluna. Componentes: microcomputador para aquisição de dados e controle das válvulas solenoides,  $\text{HNO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , solução de limpeza. Em M, minicoluna trocadora de ânions (1,5 cm x 2,06 mm i.d.);  $V_i$ , três válvulas solenoides de três vias; D, descarte e FG, forno de grafite.

O sistema FIA de pré-concentração opera em três etapas que ocorrem de forma paralela e sincronizada com o programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Na primeira etapa acontece a limpeza da minicoluna, na segunda a pré-concentração e na terceira etapa a eluição de selênio (Tabela 2.2).

Inicialmente, a minicoluna do sistema FIA encontra-se conectada à bomba peristáltica e com o braço do autoamostrador na posição de descarte, as válvulas 1 e 3 são ligadas direcionando solução de limpeza ( $\text{HNO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) numa vazão de 4 mL  $\text{min}^{-1}$ , em direção à minicoluna por 60 s.

Em seguida, na etapa 2, as válvulas 1 e 2 são acionadas pré-concentrando o analito por 90 s.

Tabela 2.2 – Esquema das válvulas solenoides utilizadas no sistema de pré-concentração de selênio.

Etapas	Posição do braço do autoamostrador	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	t (s)	Descrição
1	Descarte	1	0	1	60	Limpeza da minicoluna
2	Descarte	1	1	0	90	Pré-concentração de selênio
3	Carrosel/Tubo de grafite	0	0	0	25	Eluição

O status 0 e 1 representam que as válvulas encontram-se desligadas e ligadas, respectivamente.

Na etapa 3 as válvulas são desligadas e o sistema FIA passa a se conectar à bomba tipo seringa do autoamostrador. O programa do equipamento é acionado e automaticamente 20  $\mu$ L de eluente são aspirados através da minicoluna, em seguida, 5  $\mu$ L de nitrato de paládio também são coletados, porém, esta solução não entra em contato com a resina trocadora de ânions (Figura 2.6).

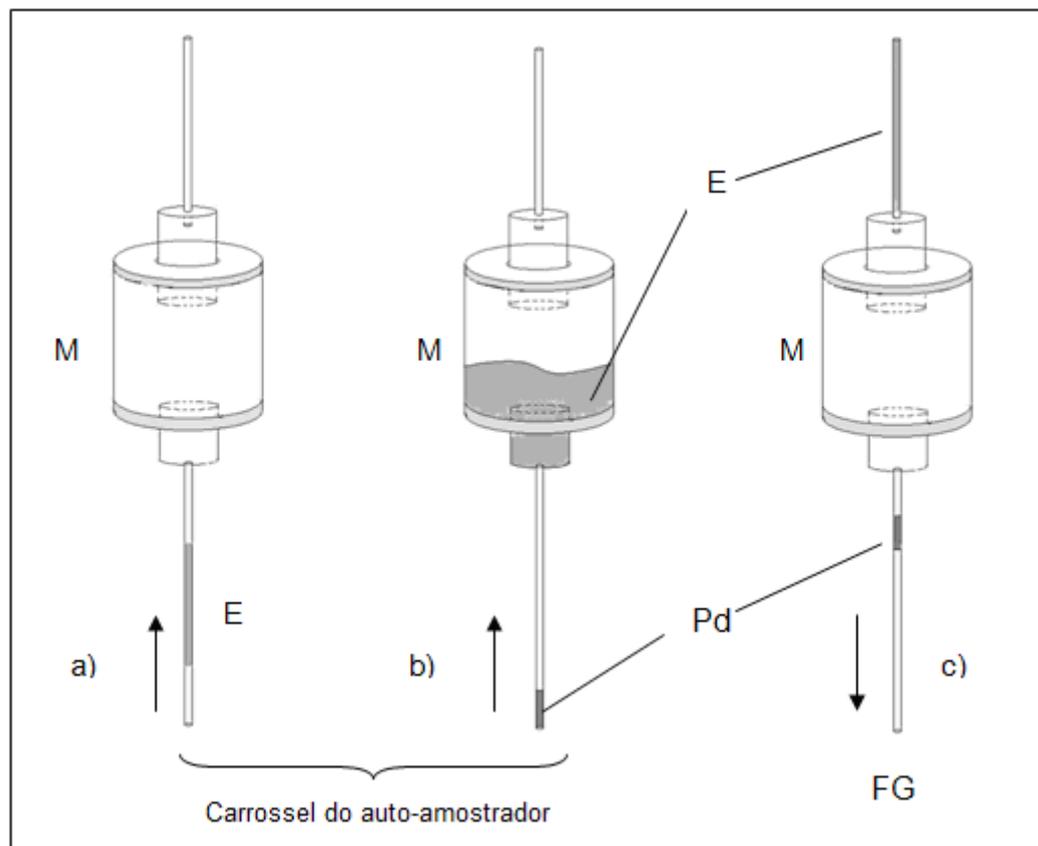


Figura 2.6 – Em M, minicoluna do sistema de pré-concentração em três situações diferentes: (a) demonstrando o sistema aspirando 20  $\mu$ L de eluente (E) posicionado no carrossel do

autoamostrador, em (b) sistema aspirando nitrato de paládio (Pd) e em (c) posição final das duas soluções antes de serem injetadas dentro do forno de grafite (FG).

Posteriormente, o braço do autoamostrador conduz o sistema FIA para dentro do tubo de grafite onde o eluato é depositado. Nota-se que o eluente passa pela coluna duas vezes, o que aumenta o seu poder de eluição.

Durante o aquecimento do tubo de grafite o braço do autoamostrador volta para a posição inicial e um novo ciclo se inicia. Assim, o ciclo de aquecimento do forno de grafite e as etapas de 1 a 3 do sistema FIA foram sincronizadas com o intuito de se obter uma maior frequência analítica.

## 2.5 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO *IN-LINE* À GFAAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELENITO

O sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS foi estudado inicialmente para determinação de selenito. Neste estudo foram utilizadas soluções padrão do mesmo, preparadas a partir do padrão Se 1000 mg L<sup>-1</sup> (Titrisol<sup>®</sup>, Merck).

Assim, para possibilitar o funcionamento inicial do sistema de pré-concentração foram estudados os parâmetros: tipo de eluente, sistema tampão e volume de amostra. O pH das soluções nestes testes foi ajustado com NaOH em 8,5; este valor foi escolhido baseando-se nas constantes de ionização do ácido selenoso ( $K_1$ ,  $2,7 \times 10^{-3}$  e  $K_2$ ,  $2,5 \times 10^{-7}$ ) (OHLWEILER, 1971), a fim de se trabalhar com o analito na sua forma ionizada.

Posteriormente, uma otimização multivariada do pH da amostra, concentração do eluente e vazão de pré-concentração foi realizada utilizando planejamento fatorial e matriz de Doehlert.

Conforme mencionado na subseção 2.4.3, foram testados como eluentes: HCl e HNO<sub>3</sub>.

Com o objetivo de assegurar a estabilidade do pH das amostras, foram testados dois sistemas tampões para pH 8,5 : amoniacal e borato na concentração de 0,005 mol L<sup>-1</sup>. Neste contexto, comparou-se a magnitude de sinais de absorvância, obtidos com uma solução padrão de selenito 30 µg L<sup>-1</sup>, em soluções tamponadas e em soluções com pH ajustado com NaOH.

Com relação ao volume de amostra, o mesmo foi fixado em 6,0 mL tendo em vista uma frequência analítica adequada e o perfeito sincronismo do programa de aquecimento com o sistema de pré-concentração.

### 2.5.1 Seleção da Vazão de Pré-concentração, Concentração do Eluente e pH da Amostra.

Com a finalidade de se obter os valores ótimos do sistema pré-concentração *in-line* à GFAAS com relação à selenito, uma otimização multivariada foi proposta. Este método avalia as variáveis estudadas e suas interações, enquanto que o modo univariado, avalia somente uma variável por vez não sendo possível analisar as interações entre elas. Outras vantagens são os menores consumos de reagentes e número de experimentos (BARROS NETO, 1996).

Foram estudadas as variáveis: vazão de pré-concentração, concentração do eluente e o pH da amostra. A otimização foi iniciada com um planejamento fatorial completo de dois níveis e três variáveis ( $2^3$ ), usado para fazer uma triagem de quais variáveis eram significativas no sistema.

Após a análise dos dados resultantes do planejamento fatorial, o sistema foi otimizado por meio de uma matriz de Doehlert para as três variáveis em questão (FERREIRA et al., 2004). A vantagem do planejamento com matriz de Doehlert é a sua flexibilidade, uma vez que o analista pode avaliar as variáveis mais significativas para o sistema em mais níveis e as variáveis menos importantes em menos níveis.

## 2.6 ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO

O sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS mostrou ter uma potencialidade para especiação de selênio. Desta forma, um estudo do pH de pré-concentração das espécies de selênio, selenito e selenato, foi realizado. O mesmo foi baseado nas constantes de ionização do ácido selenoso (mencionadas no subitem 2.5) e do ácido selênico ( $K_2 = 2,0 \times 10^{-2}$ ).

Uma aproximação dos valores de pH utilizados pode ser vista no diagrama de distribuição das espécies (Figura 2.7). Uma vez que a espécie a ser pré-concentrada necessita estar em sua forma iônica, monohidrogenoselenato pode ser encontrado em toda faixa de pH estudada, entretanto monohidrogenoselenito pode ser encontrado somente em pH acima de 1,5.

Em posse desse diagrama prosseguiram-se os testes com o estudo empírico do efeito do pH no sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS. Este estudo foi realizado por pré-concentrar soluções das espécies em questão na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  na faixa de pH entre 1 e 8, intervalo no qual foi possível determinar um pH seletivo para a adsorção de selenato, não sendo neste teste necessário estudar valores de pH mais elevados.

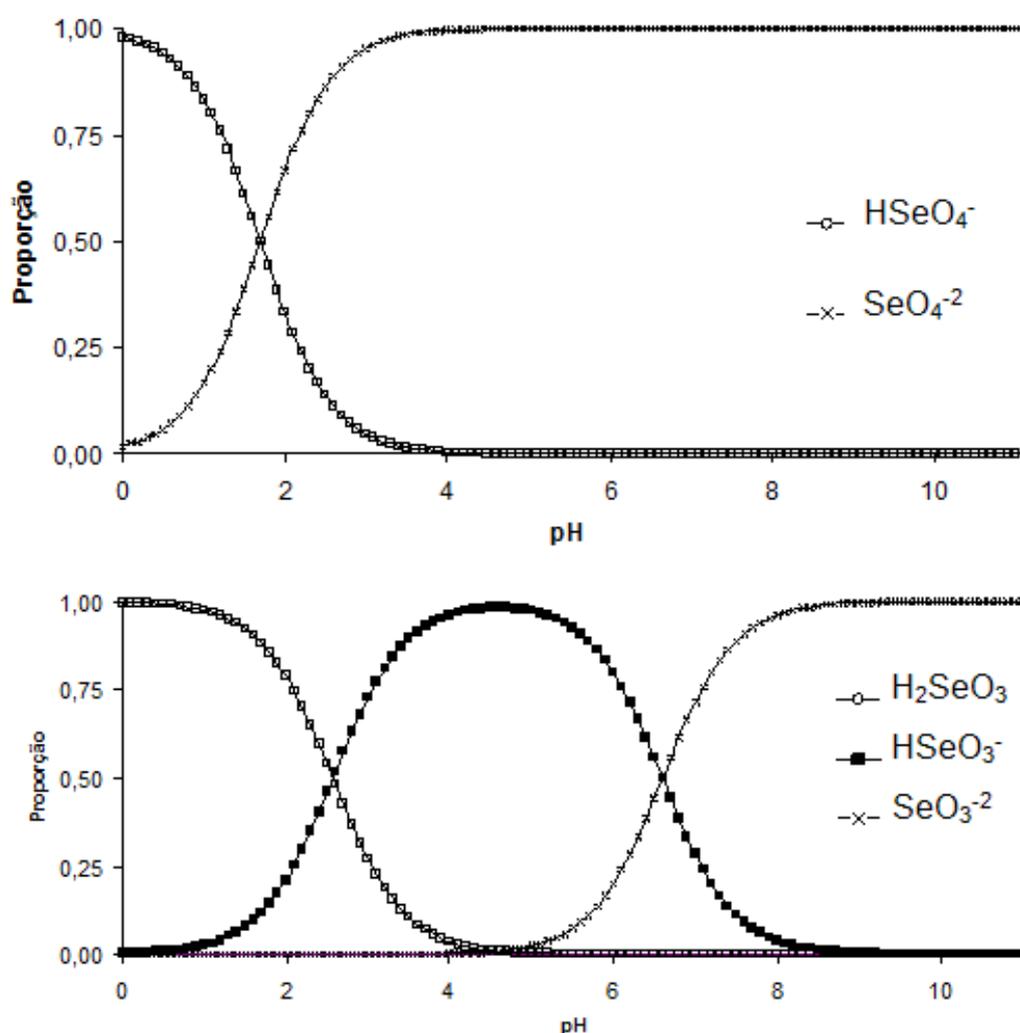


Figura 2.7 – Diagramas de distribuição das espécies de selênio.

### 2.6.1 Curvas Analíticas para o Sistema de Especificação

No estudo anterior foram obtidos dois valores de pH para pré-concentração de selenito e selenato, em seguida com a finalidade de se obter uma correlação entre os sinais de absorvância das espécies em questão e as concentrações dos mesmos foram preparadas três curvas analíticas. Uma delas para selenato em pH 2,0; onde soluções padrão nas concentrações de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 8,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram preparadas por diluição apropriada da solução estoque. As outras duas curvas analíticas foram construídas para selenito e selenato em pH 8,8 (valor de pH obtido após a otimização multivariada) nas concentrações de 1,0; 3,0; 5,0; 8,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Com os dados das curvas analíticas obteve-se um sistema de equações lineares, no qual em meio ácido o sinal da amostra era regido pela Equação 2.1, obtida pela curva analítica de selenato em pH 2,0 e regido em meio alcalino pela Equação 2.3, obtida pela soma das curvas analíticas construídas em pH 8,8. Assim, obtiveram-se as concentrações de selenato (Equação 2.2) e selenito (Equação 2.4). Como pode ser visto, este sistema de equações leva em consideração as diferentes sensibilidades das espécies em questão nos diferentes valores de pH estudados.

$$A_1 = m_1 \times C_{\text{Se(VI)}} + a_1 \quad (2.1)$$

$$C_{\text{Se(VI)}} = (A_1 - a_1)/m_1 \quad (2.2)$$

$$A_2 = m_2 \times C_{\text{Se(VI)}} + a_2 + m_3 \times C_{\text{Se(IV)}} + a_3 \quad (2.3)$$

$$C_{\text{Se(IV)}} = (-A_1 m_1 m_2 + A_2 m_1 + m_1 m_2 a_1 - m_1 a_2 - m_1 a_3)/m_1 m_3 \quad (2.4)$$

Onde:

$A_1$  é o sinal de absorvância em pH 2,0

$m_1$  é o coeficiente angular da curva de selenato em meio ácido;

$C_{\text{Se(VI)}}$  é a concentração de selenato;

$a_1$  é o coeficiente linear da curva de selenato em meio ácido.

$A_2$  é o sinal de absorvância em pH 8,8;

$m_2$  é o coeficiente angular da curva de selenato em meio alcalino;

$a_2$  é o coeficiente linear da curva analítica de selenato em meio alcalino;

$m_3$  é o coeficiente angular da curva de selenito em meio alcalino;

$C_{\text{Se(IV)}}$  é a concentração de selenito;

$a_3$  é o coeficiente linear da curva analítica de selenito em meio alcalino.

## 2.6.2 Estudo de Concomitantes

A seletividade do método foi testada frente aos principais compostos comumente presentes em águas, e no presente trabalho avaliaram-se alguns compostos que foram previamente determinados em amostras da Represa de Furnas na região do Braço Sapucaí ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ).

Os níveis dos concomitantes testados foram baseados na concentração dos mesmos presentes naturalmente na Represa de Furnas (Braço Sapucaí), sendo que estes dados foram obtidos pelo Grupo de Liminologia da Universidade Federal de Alfenas durante o ano de 2008.

Tabela 2.3 - Concentrações dos concomitantes estudados.

Interferente	Concentração 1 ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração 2 ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentração 3 ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Cloreto	1 <sup>a</sup>	125 <sup>b</sup>	250 <sup>c</sup>
Nitrito	0,035 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>
Nitrato	5 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>	250 <sup>a</sup>
Alumínio	0,05 <sup>b</sup>	0,1 <sup>c</sup>	1,4 <sup>a</sup>
Manganês	0,05 <sup>b</sup>	0,1 <sup>c</sup>	0,14 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Nível máximo encontrado na Represa de Furnas; <sup>b</sup> metade do nível máximo permitido pelo CONAMA e <sup>c</sup> nível máximo permitido pelo CONAMA.

Outro parâmetro levado em consideração foram os níveis máximos permitidos destes concomitantes em águas doces classe 2, segundo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2005), estes níveis raramente são encontrados e foram estudados com a finalidade de se obter mais dados a respeito do sistema de pré-concentração. As referidas concentrações 1, 2 e 3 estão descritas na Tabela 2.3.

Esses concomitantes foram adicionados a padrões de selenito  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  e selenato  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , e as soluções foram divididas em duas alíquotas, sendo uma delas ajustada em pH 8,8 com tampão borato e a outra em pH 2,0 com ácido nítrico.

### 2.6.3 Figuras de Mérito do Sistema de Especificação

Os procedimentos para a obtenção das figuras de mérito com o sistema de especificação de selenito e selenato: precisão, exatidão, linearidades, limites de detecção e limites de quantificação estão descritas a seguir.

#### 2.6.3.1 Precisão

No presente trabalho a precisão foi avaliada em dois níveis, repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas).

##### 2.6.3.1.1 Precisão Intra-Corrída (Repetibilidade)

A precisão em termos de repetibilidade avalia a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto intervalo de tempo, no mesmo laboratório, com o mesmo analista e instrumentação (ICH, 1994). No presente trabalho a mesma foi realizada através de determinações em sextuplicata de uma solução contendo  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada espécie estudada. Esta solução foi dividida em duas alíquotas ajustadas nos dois valores de pH estudados (2,0 e 8,8) e finalmente submetidas ao procedimento de pré-concentração e leitura.

##### 2.6.3.1.2 Precisão Intermediária (Precisão Inter-corrídas)

O objetivo deste estudo foi avaliar a precisão entre os resultados obtidos em dois dias diferentes, com analistas diferentes, porém no mesmo laboratório e com o

mesmo equipamento (ICH, 1994). A solução utilizada neste teste foi preparada da mesma forma descrita na subseção 2.6.3.1.1.

### 2.6.3.2 Exatidão

A fim de se avaliar a exatidão do método proposto, o mesmo foi aplicado em material de referência certificado (CRM) para metais traço de fígado de *Dogfish*.

Foram pesadas triplicatas de 100 mg do CRM, ao mesmo foram adicionados 6 mL de HNO<sub>3</sub> (65%) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) e estes foram pré-digeridos em tubo aberto por uma noite em temperatura ambiente. Em seguida, os mesmos foram digeridos em forno microondas Ethos Plus (Milestone<sup>®</sup>), segundo procedimento descrito na Tabela 2.4.

O digerido foi levado à quase secura e reconstituído para 250 mL com água deionizada. Metade desta solução foi ajustada em pH 2,0 com ácido nítrico e a outra metade em pH 8,8 com tampão borato 0,005 mol L<sup>-1</sup>, finalmente o procedimento de pré-concentração foi realizado.

Tabela 2.4 – Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado na digestão de material de referência certificado.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
1	5	200	600
2	10	200	1000

### 2.6.3.3 Linearidades, Limites de Detecção (LOD) e Limites de quantificação (LOQ) para o Sistema de Especificação.

A capacidade de uma metodologia de demonstrar que os resultados obtidos dentro de um intervalo específico são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, é definido como linearidade. Esta foi determinada pelo coeficientes de correlação, obtidos pelas curvas analíticas de selenito e selenato (BRASIL, 2003).

As linearidades, limites de detecção e limites de quantificação do sistema de especiação com relação à selenato, foram obtidas a partir da curva analítica em meio ácido devido ao fato da concentração deste ânion ser determinada neste pH, o branco foi uma solução de ácido nítrico pH 2,0. Para selenito, os mesmos foram obtidos em pH 8,8; as soluções padrão foram ajustadas com tampão borato 0,005 mol L<sup>-1</sup>, sendo que o branco, neste caso, foi uma solução deste tampão.

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação, foram realizadas dez leituras do branco. O cálculo de ambos os limites é baseado na razão entre o desvio padrão das dez leituras do branco e o coeficiente angular da curva de calibração. O valor obtido é multiplicado por três e dez, respectivamente para a obtenção dos limites de detecção e quantificação do método (INGLE JR; CROUCH, 1988).

#### 2.6.3.4 Curvas Analíticas sem Pré-concentração

A fim de obter os fatores de pré-concentração do sistema, apresentado na próxima subseção, duas curvas analíticas sem pré-concentração foram construídas, uma para selenito e outra para selenato.

Desta forma, cinco soluções padrão de selenito nas concentrações de 20,0; 30,0; 50,0; 70,0 e 90,0 µg L<sup>-1</sup> foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque do mesmo em meio de ácido nítrico 2,8 mol L<sup>-1</sup>, mesmo meio do eluente. Da mesma forma, porém a partir da solução estoque de selenato, foram preparadas cinco soluções padrão deste ânion nas concentrações de 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg L<sup>-1</sup>.

#### 2.6.3.5 Fatores de Pré-concentração, Índices de Consumo e Eficiências de Concentração

A determinação dos fatores de pré-concentração (FP), índices de consumo (IC) e eficiências de concentração (EC) foi realizada neste estudo. Estes parâmetros

são importantes no sentido de se avaliar a eficiência dos sistemas de pré-concentração em fluxo.

O fator de pré-concentração é o critério mais utilizado para esta avaliação, o mesmo indica o quanto o sistema pré-concentrou o analito. Teoricamente este termo é definido pela razão entre a concentração do analito no eluato e na amostra original. Porém, na prática, este fator pode ser definido como a razão dos coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas antes e depois da pré-concentração do analito (FANG, 1993).

Entretanto, altos FP não são necessariamente associados com altas eficiências, estes podem ser alcançados com longos períodos de pré-concentração, prejudicando umas das características principais dos sistemas de pré-concentração em fluxo, as altas frequências analíticas obtidas. Neste sentido, este parâmetro não deve ser avaliado de forma exclusiva.

A eficiência de concentração indica o FP alcançado durante um minuto de pré-concentração. Este é definido como o produto entre o FP e a frequência de amostragem em número de amostras determinadas por minuto.

Outro parâmetro avaliado é o índice de consumo, este reflete um aspecto da eficiência do sistema de pré-concentração relacionado com a utilização da amostra. É definido como o volume de amostra (mL) consumido para se obter uma unidade de FP, sendo que o mesmo é obtido por meio da razão entre o volume de amostra pré-concentrado e o fator de pré-concentração do sistema.

## 2.7 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS SIMULADAS

A fim de se verificar o desempenho do método proposto, o mesmo foi aplicado em amostras simuladas. Neste contexto, uma amostra contendo  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  de selenito e  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  de selenato foi preparada em tampão borato  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,8; outra alíquota desta amostra foi ajustada em pH 2,0 com ácido nítrico. Em seguida, as duas alíquotas foram inseridas no sistema de pré-concentração proposto para determinação das espécies de selênio.

O mesmo procedimento descrito acima também foi aplicado em uma amostra contendo  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de selenito e  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de selenato.

## 2.8 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

O método proposto foi empregado na determinação de selenito e selenato em águas naturais de rio e mina e também em amostras de medicamentos.

### 2.8.1 Águas Naturais

Amostras de água de dois rios (Rio Sapucaí: 21°26'54"S e 45°37'38"W, Rio Verde: 21°25'13"S e 46°01'34"W) e duas amostras de água de uma mina (21°25'2"S e 45°56'15"W), coletadas em diferentes dias, foram filtradas sob vácuo usando membrana de vidro de 47 mm (Carvalhaes<sup>®</sup>). Uma alíquota do filtrado foi ajustada em pH 2,0 com ácido nítrico e outra em pH 8,8 com tampão borato 0,005 mol L<sup>-1</sup>, em seguida as mesmas foram analisadas no sistema de pré-concentração proposto, todo procedimento foi realizado em triplicata.

Foram realizados testes de adição e recuperação nessas amostras, sendo que as mesmas foram enriquecidas com quantidades diferentes de selenito e selenato, 1,0; 3,0 e 5,0 µg L<sup>-1</sup>, visando obter concentrações em toda faixa linear estudada no método proposto.

### 2.8.2 Selênio Quelato

As amostras de selênio quelato foram doadas por duas farmácias de manipulação, Pimpinela e Pharma Ervas, sendo a primeira da cidade de Alfenas (MG) e a última de Machado (MG).

Foram pesadas triplicatas de 100 mg de cada amostra e o mesmo procedimento de digestão descrito para o material de referência certificado foi realizado.

O digerido foi levado à quase secura e reconstituído para 1000 mL com água desionizada, uma alíquota de 2,5 mL foi retirada desta para posterior diluição em

250 mL. Em seguida, esta solução foi dividida em duas partes, uma delas foi ajustada em pH 2,0 e a outra em pH 8,8 e ambas foram determinadas no sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 TRIAGEM DO SORVENTE

Os resultados do teste de triagem do sorvente frente a algumas espécies de selênio serviram como base para a escolha do mesmo. Conforme mencionado na subseção 2.4.3, este estudo foi feito com diferentes soluções de selênio para se verificar a adsorção do analito.

O ânion selenito, embora testado em todos os possíveis sorventes estudados, foi adsorvido somente na alumina ativada e na resina trocadora de ânions LC-SAX, conforme Tabela 3.1. Selenito reduzido a  $Se^0$  foi adsorvido somente na sílica e Se complexado foi adsorvido em nanotubos de carbono.

Em todos os casos descritos anteriormente verificou-se 100% de adsorção do analito com o respectivo sorvente, pois não foi detectado selênio em nenhuma das soluções padrões após passarem pela coluna.

Tabela 3.1 – Resultados obtidos na triagem do sorvente.

Sorvente	Selenito	$Se^0$	Se complexado
NTC	NA	NA	Adsorveu
NTC tratado com alumina	NA	NA	NA
Alumina ativada	Adsorveu	NA	NA
Sílica	NA	Adsorveu	NA
Espuma de poliuretano	NA	NA	NA
LC-SAX	Adsorveu	NA	NA

NA, não houve adsorção.

Pode ser notado (Tabela 3.1), que houve resultado positivo quanto à adsorção para os sorventes alumina ativada, LC-SAX, sílica e NTC. Deste modo, em seguida fez-se um estudo para se verificar a eficiência de eluição do analito conforme mencionado na subseção 2.4.3.

Observou-se que somente com a resina LC-SAX houve eluição de selenito, para os demais adsorventes estudados não foi obtido êxito nesta etapa do sistema de pré-concentração. Entretanto, frente ao número reduzido de testes realizados nessa triagem, é importante salientar que não se pode descartar a possibilidade do uso dos outros sorventes para adsorção de selênio em outras condições químicas,

sendo que os mesmos poderão ser estudados futuramente. Assim, com o intuito de continuar o presente trabalho com o menor número de experimentos, os testes posteriores foram feitos apenas com LC-SAX.

### 3.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO *IN-LINE* À GFAAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELENITO

O desenvolvimento inicial do sistema de pré-concentração de selênio *in-line* à GFAAS (Figura 2.5), foi realizado para selenito. No sentido de tornar possível o funcionamento deste sistema, alguns parâmetros foram estudados inicialmente de forma univariada. Neste contexto, foi escolhido o tipo do eluente, o volume de amostra e o sistema tampão. Posteriormente, com a finalidade de obter a melhor resposta do sistema de pré-concentração, uma otimização multivariada foi realizada, com a vazão de pré-concentração, concentração do eluente e pH da amostra.

Na escolha do eluente foi usado, como critério, a magnitude do sinal de absorvância obtido quando ácido nítrico e ácido clorídrico eram utilizados. Neste teste, selenito na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  em pH 8,5 ajustado com NaOH, numa vazão de 4 mL min, foi pré-concentrado (durante 90 s) na resina trocadora de ânions. Este valor de pH foi fixado para este teste baseando-se nas constantes de ionização do ácido selenoso, a otimização deste parâmetro será apresentada posteriormente.

Como pode ser visto na Figura 3.1, um sinal de absorvância transiente foi obtido quando 20  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico foi utilizado como eluente; entretanto, quando ácido clorídrico foi empregado os sinais de absorvância não foram satisfatórios, houve uma interferência negativa, provavelmente devido à perda de selênio por volatilização durante a etapa de secagem e/ou pirólise sob a forma de  $\text{SeCl}_4$  (SVEHLA, 1979). A determinação de selênio por GFAAS em meio ácido clorídrico já foi realizada, porém, foi utilizado o modificador permanente irídio (STRIPEIKIS, 2004; PACHECO et al., 2008) ou nitrato de paládio associado a nitrato de magnésio (SAYGI et al., 2007), sendo que no presente trabalho somente nitrato de paládio foi empregado.

Na escolha do sistema tampão os sinais de absorvância das soluções tamponadas foram comparados com o sinais das mesmas sem tamponar, ou seja, o ajuste do pH foi feito somente com adição de NaOH.

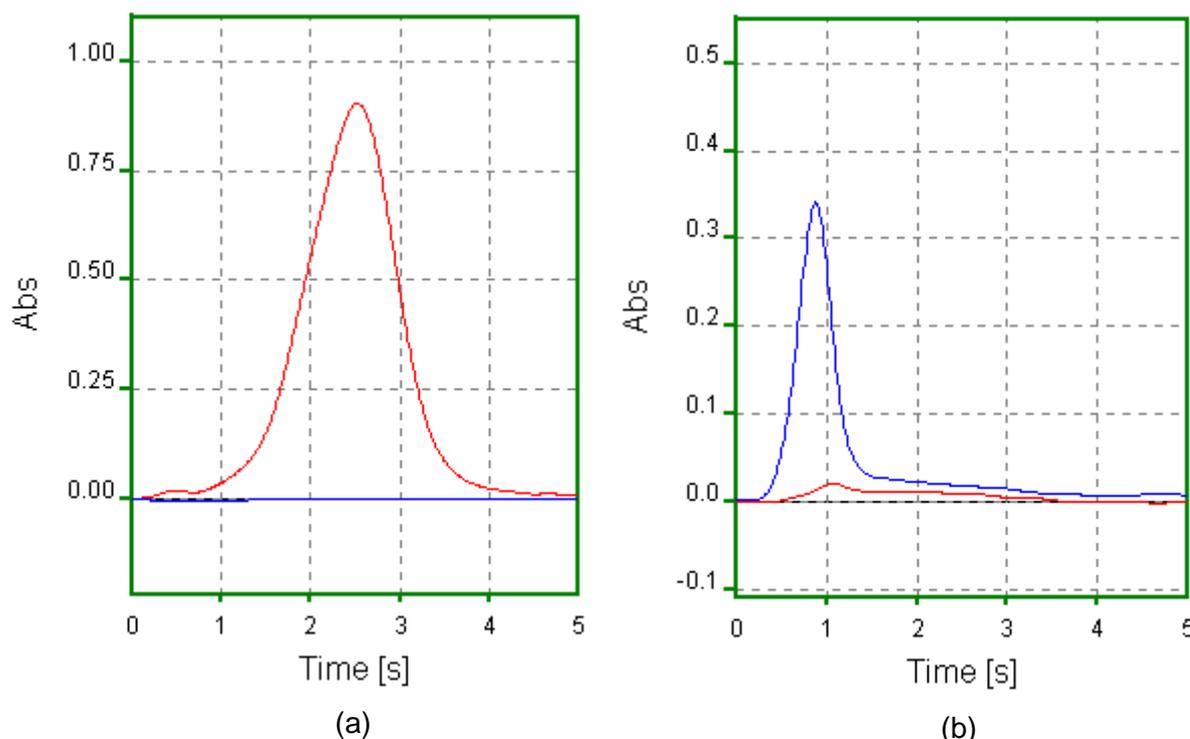


Figura 3.1 – Em (a) Sinal de absorvância obtido com eluente ácido nítrico e em (b) com ácido clorídrico. Sinal de background em azul e sinal de absorvância dos átomos de selênio em vermelho.

Conforme Tabela 3.2 o sinal de absorvância obtido com a solução tamponada em tampão borato  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  foi somente 5% menor que a solução sem tamponar. Entretanto, quando tampão amoniacal na mesma concentração foi utilizado, esta perda de sinal chegou a 38,2%, provavelmente devido à interferência de  $\text{Cl}^-$ , proveniente do cloreto de amônio, descrita anteriormente. Desta forma tampão borato foi escolhido para ser usado nas amostras de selênio.

Tabela 3.2 - Escolha do sistema tampão

Ajuste de pH	Sinal de Absorvância (área)	Perda de sinal (%)
Com NaOH	$1,521 \pm 0,04^{*b}$	---
Tampão borato	$1,445 \pm 0,04$	5,0
Tampão amoniacal	$0,940 \pm 0,08$	38,2

\*média  $\pm$  desvio padrão relativo (n = 3)

Um dos principais objetivos do uso de sistemas de análise por injeção em fluxo é a obtenção de uma alta frequência analítica, desta forma o volume de amostra não foi otimizado, o mesmo foi fixado em 6 mL, este valor foi mantido tendo em vista uma frequência analítica adequada e o perfeito sincronismo do programa de aquecimento com o sistema de pré-concentração.

### 3.2.1 Seleção da Vazão de Pré-concentração, Concentração do Eluente e pH da Amostra.

Com a finalidade de obter a melhor resposta analítica do sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS, foi realizado um estudo multivariado da vazão de pré-concentração, concentração do eluente e pH da amostra.

A Tabela 3.3 mostra o planejamento fatorial  $2^3$  realizado na triagem das variáveis significativas para o sistema. Podem ser observados os valores codificados (+ e -), os quais indicam todas as combinações possíveis das variáveis estudadas. As definições dos fatores estudados e seus níveis estão sumarizados na mesma.

Na execução desta triagem foram conduzidos experimentos em duplicata na pré-concentração de 6,0 mL de solução padrão de selenito na concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabela 3.3 - Fatores, níveis e resultados obtidos no planejamento fatorial  $2^3$ .

Fatores				Níveis	
				(-) Baixo	(+) Alto
pH da amostra				8,0	9,5
Vazão de pré-concentração (VP)/mL min <sup>-1</sup>				2,0	4,0
Concentração do eluente (CE)/mol L <sup>-1</sup>				1,0	2,5
Ensaio	pH	VP	CE	Absorbância (área)	
1	-	-	-	0,366	0,416
2	+	-	-	0,334	0,354
3	-	+	-	0,529	0,575
4	+	+	-	0,475	0,460
5	-	-	+	0,410	0,430
6	+	-	+	0,692	0,737
7	-	+	+	0,569	0,632
8	+	+	+	0,589	0,647

Na Figura 3.2 é demonstrado o Diagrama de Pareto obtido a partir dos resultados do planejamento fatorial. Este diagrama representa a significância dos fatores e das suas interações usando um intervalo de confiança ao nível de 95%, no diagrama definido pela linha vertical. Barras horizontais à direita desta linha vertical indicam quais os fatores significativos para o sistema. Como pode ser verificado todos os fatores e suas interações foram estatisticamente significativas para o sistema. Neste diagrama também pode ser observado que a concentração do eluente é a variável que mais exerce influência no sistema e o pH aquela que menos exerce influencia no mesmo. Todos os fatores possuem um efeito estimado positivo, indicando que melhores respostas analíticas podem ser encontradas quando houver um aumento dos níveis destes fatores, ou seja, ao aumentarmos a CE, pH da amostra e vazão de pré-concentração, maior será a pré-concentração/eluição de selênio pelo sistema.

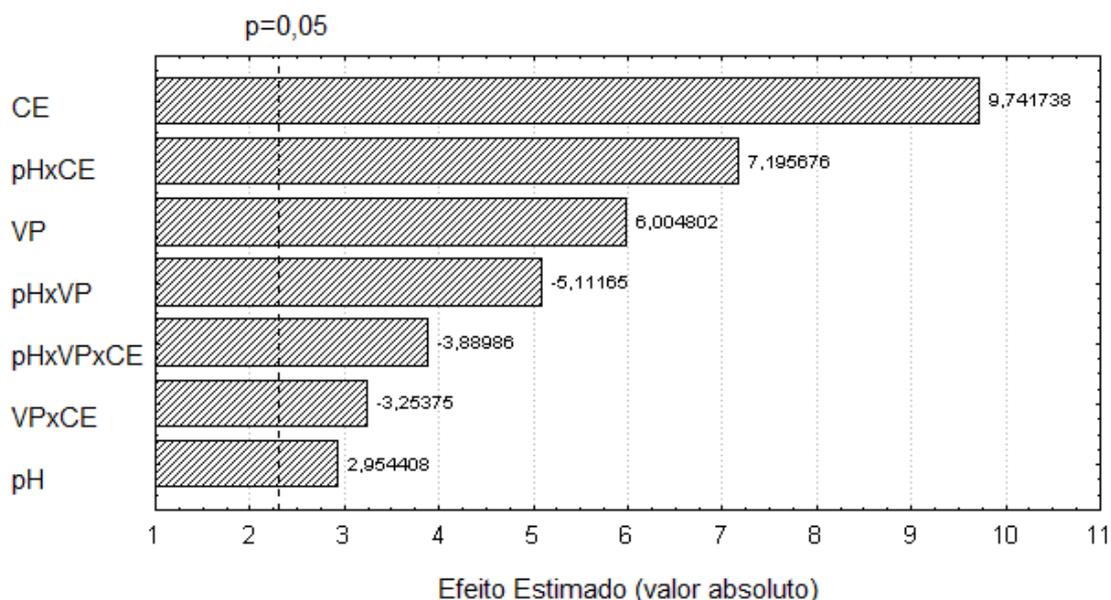


Figura 3.2 - Diagrama de Pareto: CE, concentração do eluente ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); VP, vazão de pré-concentração ( $\text{mL min}^{-1}$ ) e pH da amostra.

De fato, aumentando-se a CE, aumenta-se a força iônica desta solução favorecendo a eluição de selênio da resina trocadora de ânions, o limite máximo desta concentração é controlado pelo tubo de grafite, sendo que concentrações muito altas do eluente podem interferir no sinal de selênio, além de aumentar o desgaste do tubo de grafite.

Da mesma forma o pH da amostra pode ser aumentado, favorecendo o aumento da concentração de íons selenito, porém o pH da mesma tem como limite superior a interferência produzida por uma concentração alta dos íons  $\text{OH}^-$ , inseridos na solução para o ajuste de pH.

Enfim, um aumento na vazão de pré-concentração produzindo aumento na pré-concentração de íons selenito pode ser explicada pela cinética da reação entre estes íons e a resina trocadora de ânions, i.é., quando a vazão é menor pode ocorrer adsorção e desorção.

Após a análise do Diagrama de Pareto, o sistema foi otimizado por meio de uma matriz de Doehlert para as três variáveis em questão (Tabela 3.4).

A concentração do eluente por exercer maior influência no sistema foi estudada em sete níveis, a vazão de pré-concentração em cinco níveis e o pH da amostra estudado em três níveis.

Foram realizadas leituras em triplicata no ponto central a fim de se avaliar a qualidade do modelo experimental por meio da análise de variância (ANOVA).

Tabela 3.4 - Matriz de Doehlert e resultados obtidos em absorvância para o sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS para determinação de selenito.

Fatores	Níveis						
CE	0,8	1,3	1,8	2,3	2,8	3,3	3,8
VP		1,0	2,5	4,0	5,5	7,0	
pH			7,0	9,5	12,0		
Corridas	VP ( $\text{mL min}^{-1}$ )	CE ( $\text{mol L}^{-1}$ )		pH	Absorvância (área)		
1	4,0(0)	2,3(0)		9,5(0)	0,4658		
1	4,0(0)	2,3(0)		9,5(0)	0,4235		
1	4,0(0)	2,3(0)		9,5(0)	0,4282		
2	7,0(1)	2,3(0)		9,5(0)	0,1816		
3	5,5(0,5)	3,8(0,866)		9,5(0)	0,1089		
4	5,5(0,5)	2,8(0,289)		12,0(0,817)	0,0964		
5	1,0(-1)	2,3(0)		9,5(0)	0,4634		
6	2,5(-0,5)	0,8(-0,866)		9,5(0)	0,1677		
7	2,5(-0,5)	1,8(-0,289)		7,0(-0,817)	0,2570		
8	5,5(0,5)	0,8(-0,866)		9,5(0)	0,1333		
9	5,5(0,5)	1,8(-0,289)		7,0(-0,817)	0,0669		
10	2,5(-0,5)	3,8(0,866)		9,5(0)	0,4989		
11	4,0(0)	3,3(0,577)		7,0(-0,817)	0,3773		
12	2,5(-0,5)	2,8(0,289)		12,0(0,817)	0,1001		
13	4,0(0)	1,3(-0,577)		12,0(0,817)	0,0998		

Os valores das variáveis estudadas encontram-se antes dos valores codificados (entre parênteses) retirados da matriz de Doehlert para três fatores. Em VP, vazão de pré-concentração ( $\text{mL min}^{-1}$ ); CE, concentração do eluente ( $\text{mol L}^{-1}$ ) e pH da amostra.

A partir desta matriz de Doehlert, o modelo quadrático para a resposta analítica obtida pôde ser representado pela Equação 3.1.

$$\begin{aligned} \text{Absorbância (área)} = & -3,35511 - 0,04783VP - 0,01296VP^2 + 0,94312CE \\ & - 0,08124CE^2 + 0,62472pH - 0,03406 pH^2 - 0,03951VP CE \\ & + 0,02033VP pH - 0,03739CE pH \end{aligned} \quad (3.1)$$

Onde: VP é a vazão de pré-concentração ( $\text{mL min}^{-1}$ ); CE a concentração do eluente ( $\text{mol L}^{-1}$ ) e pH da amostra.

Uma análise de variância para este modelo foi feita e está demonstrada na Tabela 3.5. A ANOVA mostra dados do modelo quadrático acima e indica que não existe falta de ajuste no mesmo, uma vez que a razão das médias quadráticas (MQ) da falta de ajuste e do erro puro são menores que o valor de F crítico tabelado:  $(MQ_{\text{Falta de ajuste}}/MQ_{\text{Erro puro}}) = 4,8 < F_{3,2} = 19,16$  (valor crítico tabelado). Quando o oposto ocorre é indicativo que o modelo quadrático apresenta falta de ajuste e, portanto não deve ser utilizado (TARLEY et al., 2006).

Tabela 3.5 - Análise de variância (ANOVA) obtida da matriz de Doehlert.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Falta de ajuste	0,007748*	3	0,002583
Erro puro	0,001075	2	0,000538

\*Os dados foram obtidos com o programa STATISTICA 6.0.

Com o intuito de determinar a natureza dos pontos estacionários da função quadrática, o critério de Lagrange, um procedimento matemático foi utilizado. Este é baseado no cálculo da determinante Hessiana do modelo quadrático (FERREIRA et al., 2004). Existem pontos de máximo na equação quadrática quando  $\Delta_1 < 0$ ;  $\Delta_2 > 0$  e  $\Delta_3 < 0$ , calculados a partir das Expressões 3.1.

Expressões 3.1 -

$$\Delta_1 = \frac{\delta^2 Abs}{\delta VP^2}$$

$$\Delta_2 = \begin{bmatrix} \frac{\delta^2 Abs}{\delta VP^2} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta VP \delta CE} \\ \frac{\delta^2 Abs}{\delta CE \delta VP} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta CE^2} \end{bmatrix}$$

$$\Delta_3 = \begin{bmatrix} \frac{\delta^2 Abs}{\delta VP^2} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta VP \delta CE} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta VP \delta pH} \\ \frac{\delta^2 Abs}{\delta CE \delta VP} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta CE^2} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta CE \delta pH} \\ \frac{\delta^2 Abs}{\delta pH \delta VP} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta pH \delta CE} & \frac{\delta^2 Abs}{\delta pH^2} \end{bmatrix}$$

Os valores encontrados para  $\Delta_1$ ,  $\Delta_2$ , e  $\Delta_3$  foram -0,02592, 0,00265044 e -0,0003024 respectivamente, confirmando a presença de pontos de máximo no modelo quadrático.

Com o objetivo de obter estes pontos de máximo, um sistema de matrizes a partir do modelo quadrático foi montado. Entretanto, como a determinante desta matriz era muito próxima de zero, a mesma não pôde ser resolvida.

Por esta razão, a variável VP foi fixada em 4,0 mL min<sup>-1</sup>, este valor foi escolhido por propiciar frequências analíticas e pressões adequadas ao sistema de pré-concentração. Logo, uma nova equação com duas variáveis foi montada (Equação 3.2), e resolvendo a mesma, dois pontos de ótimo do sistema foram encontrados, os valores de 2,8 mol L<sup>-1</sup> para a CE e o pH de 8,8 para a amostra, estes valores foram fixados para o método.

$$\begin{aligned} \text{Absorbância (área)} &= -3,75379 + 0,78508CE - 0,08124CE^2 + 0,70604pH \\ &\quad - 0,03406pH^2 - 0,03739CE \text{ pH} \end{aligned} \quad (3.2)$$

A Figura 3.3 apresenta um gráfico com a superfície de resposta possibilitando a visualização dos pontos de ótimo do sistema.

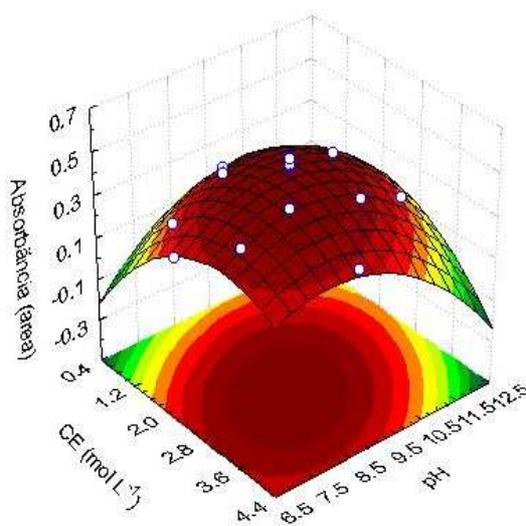


Figura 3.3 – Superfície de resposta, obtida da matriz de Doehlert, concentração do eluente ( $\text{mol L}^{-1}$ ) e pH da amostra.

### 3.3 ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO

O sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS demonstrou possuir um potencial de aplicação na especiação de selênio. Desta forma, com o objetivo de verificar um pH seletivo para a adsorção de selenato na resina trocadora de ânions, foi realizado um estudo do pH de pré-concentração das duas espécies (Figura 3.4).

Este estudo revelou que somente os ânions selenato são pré-concentrados na resina trocadora de ânions em pH 2, sendo que selenito é pré-concentrado de forma significativa em pH acima de 6,0. Este fato está de acordo com o diagrama de distribuição das espécies (subseção 2.6) i.é., em  $\text{pH} < 2$ , o ácido selenoso encontra-se protonado, então, não há atração eletrostática com a resina.

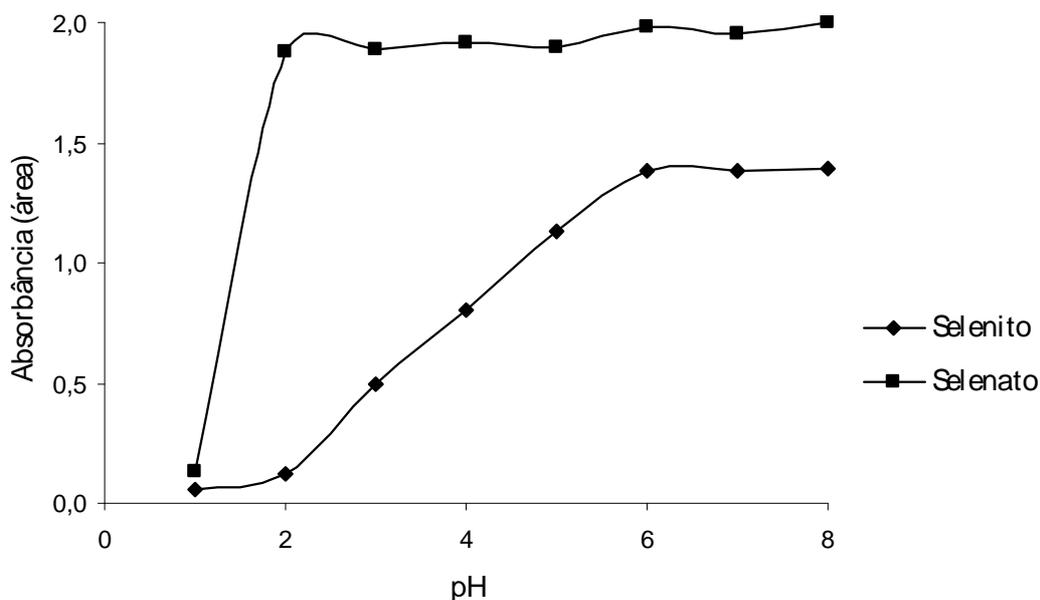


Figura 3.4 – Estudo do pH de adsorção dos ânions selenito (-♦-) e selenato (-■-) no sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS.

Desta forma dois valores de pH foram escolhidos para a especiação de selenito e selenato, baseando-se no fato de que em meio alcalino ambas as espécies estudadas são pré-concentradas na resina trocadora de ânions, e que, em meio ácido, somente selenato pode ser pré-concentrado de forma significativa na mesma.

O pH 2,0 foi escolhido de acordo com estudo do pH de pré-concentração e o pH 8,8 foi escolhido por ter sido otimizado anteriormente no estudo dos parâmetros envolvidos na pré-concentração de selenito.

Outra observação pode ser feita em pH acima de 6, onde sinais de absorbância maiores foram obtidos para selenato em relação à selenito. Este fato se deve, provavelmente, às diferentes afinidades das espécies em questão pela resina trocadora de ânions ou por possíveis interferências do meio do eluente nos ânions selenito, comentada posteriormente na subseção 3.3.3.4.

Desta forma, baseando-se na capacidade de adsorção na resina de selenito e selenato em pH acima de 6 e de somente este último em pH 2, justifica a utilização de um sistema com ponderação para o cálculo das concentrações, semelhante aos sistemas utilizados quando se aplica o princípio da aditividade das absorbâncias em espectrofotometria.

### 3.3.1 Curvas Analíticas para o Sistema de Especificação

A fim de obter uma correlação entre os sinais de absorvância obtidos nos valores de pH em questão, duas curvas analíticas do sistema de especificação de selênio foram construídas em meio alcalino; a partir de soluções padrão de selenito e selenato e uma terceira foi obtida em pH 2,0; a partir de soluções padrão de selenato.

Na construção da curva analítica de selenito (Figura 3.5), cinco soluções padrão foram preparadas e tamponadas em pH 8,8 com tampão borato  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ .

Da mesma forma foi obtida uma curva analítica de soluções de selenato (Figura 3.6).

Finalmente, na construção da curva analítica de selenato em pH 2,0 (Figura 3.7), cinco soluções padrão do mesmo foram preparadas e o pH das mesmas foi ajustado em 2,0 com solução diluída de ácido nítrico.

Com os dados das curvas analíticas e considerando o exposto na subseção 2.6, podem-se deduzir as equações para as determinações de Se (IV) e Se (VI) conforme a seguir:

$$C_{\text{Se(IV)}} = 7,1270A_2 - 7,2887A_1 + 0,03146 \quad (3.3)$$

$$C_{\text{Se(VI)}} = (A_1/0,1543) - 0,4388 \quad (3.4)$$

Onde:

C = concentração em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

$A_1$  = sinal de absorvância (área) em pH 2,0;

$A_2$  = sinal de absorvância (área) em pH 8,8.

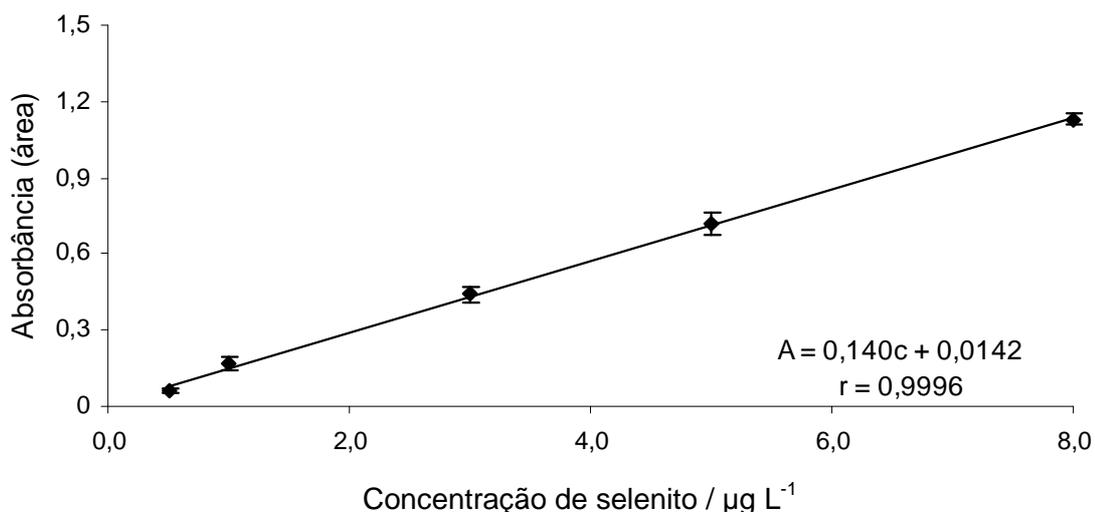


Figura 3.5 - Curva analítica obtida pela pré-concentração *in-line* à GFAAS de soluções de selenito em pH 8,8.

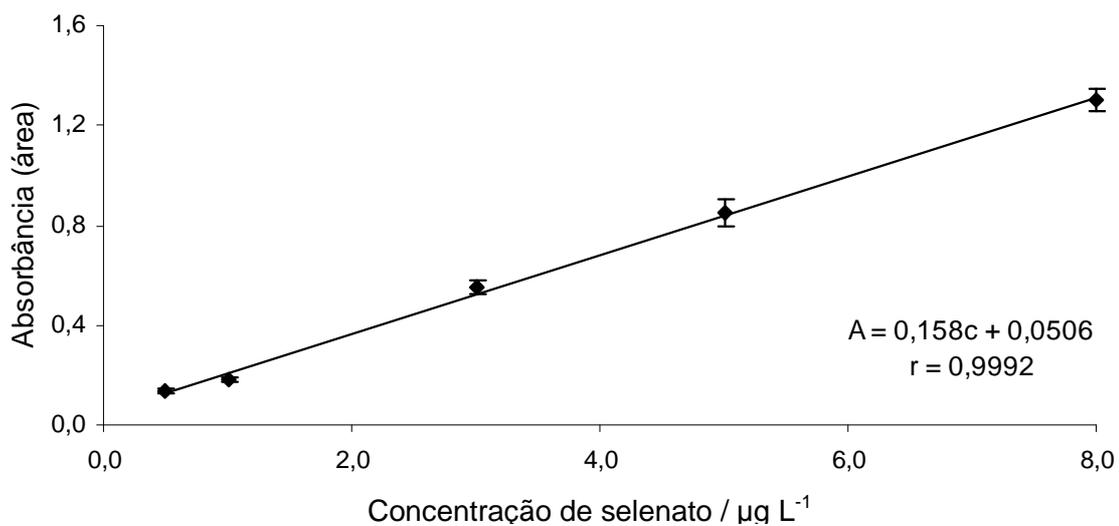


Figura 3.6 - Curva analítica obtida pela pré-concentração *in-line* à GFAAS de soluções de selenato em pH 8,8.

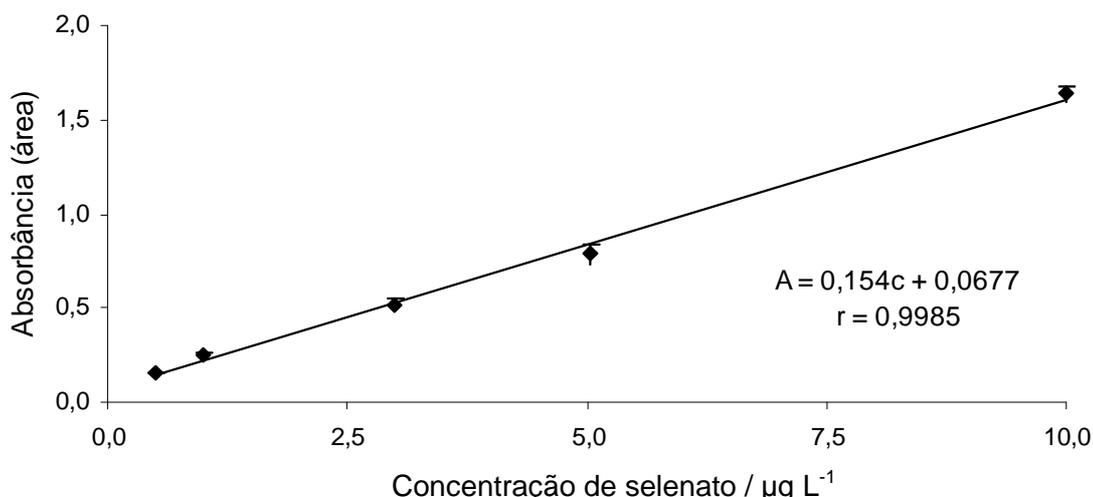


Figura 3.7 - Curva analítica obtida pela pré-concentração *in-line* à GFAAS de soluções de selenato em pH 2,0

### 3.3.2 Estudo de Concomitantes

Os concomitantes testados foram adicionados a padrões de selenito  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  e selenato  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados dados em termos de erro relativo percentual estão demonstrados na Tabela 3.6, os íons cloreto e nitrito causaram interferência somente quando os mesmos se encontravam na concentração máxima permitida pelo CONAMA, sendo que esta situação raramente ocorre. Os outros possíveis concomitantes testados não foram interferentes nas análises de selênio em padrões de águas naturais.

Tabela 3.6 - Influência de íons concomitantes na especiação de selênio.

Interferente	Concentração <sup>a</sup> 1		Concentração <sup>a</sup> 2		Concentração <sup>a</sup> 3	
	Se (VI)	Se (IV)	Se (VI)	Se (IV)	Se (VI)	Se (IV)
Cloreto	5,4% <sup>b</sup>	6,0%	7,1%	9,7%	60,1%	68,6%
Nitrito	9,7%	2,1%	7,1%	8,5%	62%	69,2%
Nitrato	7,8%	3,2%	6,5%	4,9%	7,8%	9,6%
Alumínio	2,9%	0,2%	0,8%	9,9%	6,8%	4,1%
Manganês	2,4%	3,3%	6,4%	4,4%	5,4%	4,4%

<sup>a</sup> concentrações de concomitantes segundo Tabela 2.3

<sup>b</sup> erro relativo percentual.

### 3.3.3 Figuras de Mérito do Sistema de Especificação

As figuras de mérito do sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS: precisão, exatidão, linearidades, limites de detecção e quantificação, fatores de pré-concentração, índices de consumo e eficiências de concentração, estão descritas a seguir.

#### 3.3.3.1 Precisão

Dois níveis de precisão foram avaliados no presente trabalho, repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas).

##### 3.3.3.1.1 Precisão Intra-Corrída (Repetibilidade)

Os resultados da precisão intra-corrída foram avaliados em termos de coeficiente de variação e estão sumarizados na Tabela 3.7, como pode ser verificado o maior valor obtido foi de 4,4% para selenito. Segundo Peters, Drummer e Musshoff (2007) este valor é aceitável até 15%, quando se tratar de desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação de elementos raros e análises de rotina.

Tabela 3.7 - Resultados de precisão intra-dia (repetibilidade).

Espécie de Se	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV(%)*
Selenato	2,0	4,0
Selenito	2,0	4,4

\*coeficiente de variação (n = 6)

### 3.3.3.1.2 Precisão Intermediária (Precisão Inter-corridas)

A precisão inter-corrida foi determinada através da determinação das espécies de selênio estudadas em dois dias diferentes. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.8 e como pode ser verificado o maior coeficiente de variação obtido foi de 5,5% para selenito. Este resultado é considerado satisfatório de acordo com o trabalho de Peters, Drummer e Musshoff (2007).

Tabela 3.8 - Resultados de precisão inter-corridas (precisão intermediária).

Espécie de Se	CV* (%)
Selenato	4,2
Selenito	5,5

\* média dos coeficientes de variação obtidos em dois dias

### 3.3.3.2 Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada a partir da aplicação do mesmo em material de referência certificado. Os valores demonstrados pela Tabela 3.9 indicam que o resultado obtido está de acordo com o valor de referência certificado. Entretanto no certificado do mesmo não é citada qual a espécie de selênio encontrada, é mencionada somente a concentração de selênio total.

Tabela 3.9 - Resultado obtido após aplicação da metodologia proposta em material de referência certificado.

CRM	Valor de Se obtido (mg Kg <sup>-1</sup> )		Valor de Se certificado (mg Kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
	Se(VI)	Se(IV)	Total
Fígado de <i>Dogfish</i>	8,2 ± 0,06 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	8,3 ± 1,3

<sup>a</sup>(CANADA, 2009);

<sup>b</sup>desvio padrão relativo ( n = 3);

<sup>c</sup>ND, não detectado.

Os dados obtidos foram comparados com o valor certificado por meio do Teste-t, onde  $T_{\text{calculado}} 0,4850 < T_{\text{tabelado}} 4,303$ ; portanto estatisticamente não houve diferença entre os dados com um nível de confiança de 95%.

### 3.3.3.3 Linearidades, Limites de Detecção (LOD) e Limites de quantificação (LOQ) para o Sistema de Especificação

A linearidade do método para selenito foi determinada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ), obtido pelo gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações deste analito em meio alcalino. E a linearidade do método com relação aos íons selenato foi determinada a partir da curva analítica deste ânion em pH 2,0.

A Tabela 3.10 demonstra os parâmetros referentes à regressão linear para as duas espécies de selênio. Os valores de coeficientes de correlação obtidos para o sistema encontram-se de acordo com o estipulado ( $r$  mínimo aceitável = 0,99) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

Tabela 3.10 – Parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas analíticas de Se (IV) em pH 8,8 e Se (VI) em pH 2,0; empregando o sistema de pré-concentração para especificação de selênio.

Parâmetros	Curva analítica de Se (VI)	Curva analítica de Se (IV)
Faixa linear	0,5 a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$
Coeficiente linear	$6,88 \times 10^{-2}$	$1,42 \times 10^{-2}$
Coeficiente angular (m)	$1,54 \times 10^{-1} \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$	$1,40 \times 10^{-1} \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$
Coeficiente de correlação	0,9985	0,9996
LOD <sup>a</sup>	$3,1 \times 10^{-2} \mu\text{g L}^{-1}$	$4,9 \times 10^{-2} \mu\text{g L}^{-1}$
LOQ <sup>b</sup>	$1,0 \times 10^{-1} \mu\text{g L}^{-1}$	$1,6 \times 10^{-1} \mu\text{g L}^{-1}$

<sup>a</sup>LOD = (3  $\sigma$ /m)

<sup>b</sup>LOQ = (10  $\sigma$ /m)

### 3.3.3.4 Curvas Analíticas sem Pré-concentração

Duas curvas analíticas de soluções de selenito e selenato em meio igual ao do eluente, ácido nítrico  $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ , foram construídas sem a realização do procedimento de pré-concentração. O objetivo da construção das mesmas é a obtenção de dados para o cálculo do fator de pré-concentração do sistema, descrito na próxima subseção.

Desta forma, uma curva analítica sem pré-concentração (Figura 3.8) de soluções padrão de selenito foi construída.

A fim de obter o fator de pré-concentração do sistema para selenato, outra curva analítica sem pré-concentração (Figura 3.9) de soluções padrão deste ânion, também foi construída.

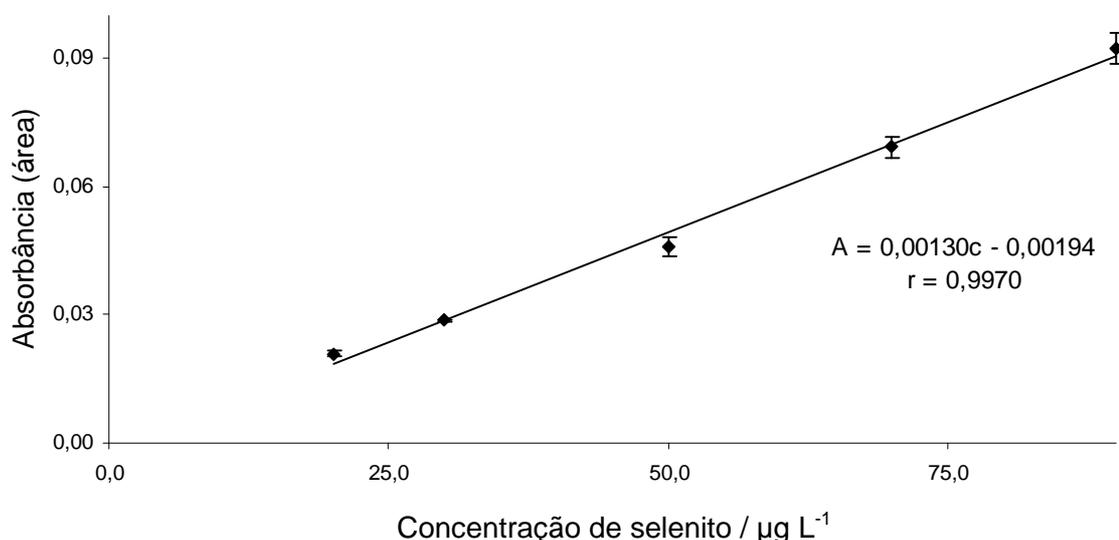


Figura 3.8 – Curva analítica construída sem pré-concentração de selenito em meio ácido nítrico  $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ .

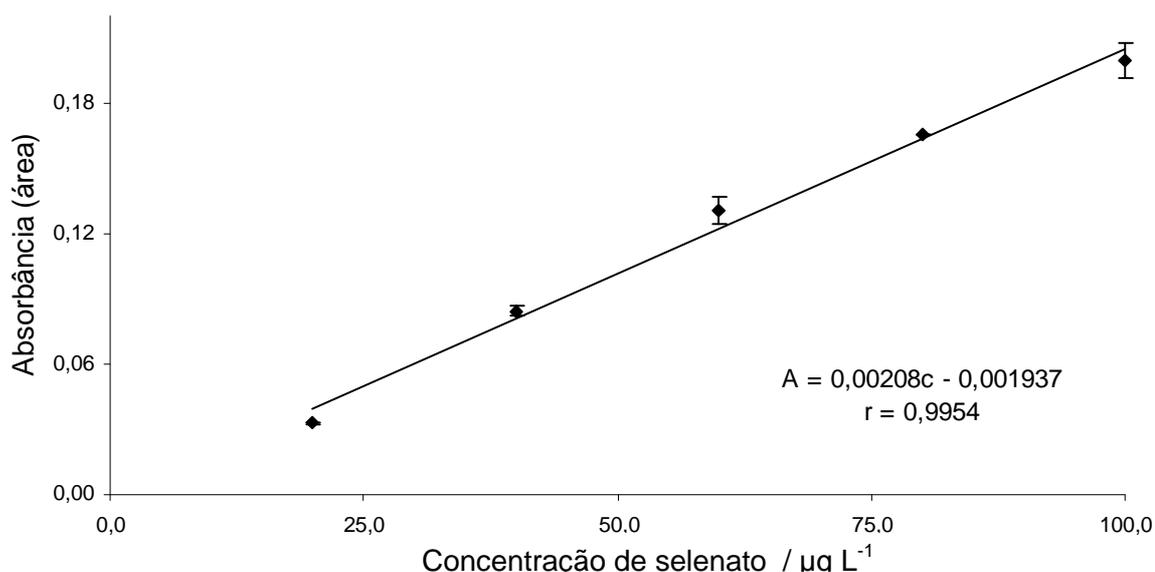


Figura 3.9 – Curva analítica construída sem pré-concentração de selenato em meio ácido nítrico  $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ .

Como pode ser observado, as duas equações lineares obtidas acima são diferentes. Foi constatado que o meio de ácido nítrico  $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ , produziu uma interferência negativa no sinal analítico de selenito levando à obtenção de um coeficiente angular menor para este analito com relação a selenato. Quando soluções padrão com concentrações iguais destes ânions foram preparadas em água desionizada, o sinal analítico de ambas as espécies sem pré-concentração foi o mesmo.

### 3.3.3.5 Fatores de Pré-concentração, Índices de Consumo e Eficiências de Concentração

No sentido de se avaliar a eficiência do sistema de pré-concentração em fluxo proposto, os parâmetros: fatores de pré-concentração, índices de consumo e eficiências de concentração foram obtidos e estão demonstrados na Tabela 3.11.

Nesta tabela também é demonstrada uma comparação do presente trabalho com três artigos já publicados sobre a especiação de selênio utilizando um sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS (YAN; SPERLING; WELZ (1999); STRIPEIKIS, et al. (2004) e PACHECO, et al. (2008).

Quanto maiores os valores de FP e EC e menores valores de IC, mais eficiente é o sistema de pré-concentração em fluxo, características demonstradas pelo presente trabalho, em relação aos três artigos semelhantes já relatados na literatura. Uma desvantagem do presente método diz respeito aos valores de limites de detecção superiores àqueles publicados.

Tabela 3.11 – Parâmetros avaliados com relação à eficiência do sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS para especiação de selênio.

Características	Presente trabalho		YAN; SPERLING; WELZ (1999)	STRIPEIKIS, et al. (2004)	PACHECO, et al. (2008)
	Se (IV)	Se (VI)	Se (IV)	Se (IV) e Se (VI)	Se (VI)
Fator de Pré-concentração (FP)	108	74	112	82	22
Índice de Consumo (mL)	0,056	0,081	0,038	0,11	0,046
Eficiência de Concentração (FP min <sup>-1</sup> )	37,0	25,4	20,53	8,2	14,7
Limite de detecção (ng L <sup>-1</sup> )	31 <sup>a</sup>	49	4,5	10	6

<sup>a</sup>Calculado pela fórmula:  $3\sigma/m$ . Sendo;  $\sigma$ , desvio padrão de dez medidas do branco e  $m$ , coeficiente angular da curva analítica;

### 3.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS SIMULADAS

Com o intuito de se verificar o desempenho do sistema, foram preparadas duas amostras com diferentes concentrações de selenito e selenato. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.12, pode-se notar que o sistema apresentou resultados satisfatórios uma vez que os valores obtidos nas análises foram condizentes com as concentrações simuladas.

Tabela 3.12 – Aplicação em amostras simuladas

Concentração simulada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		Concentração obtida ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
Se (IV)	Se (VI)	Se (IV)	Se (VI)
6,0	3,0	$6,4 \pm 0,10^*$	$2,9 \pm 0,07$
5,0	2,0	$5,1 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,07$

\*média  $\pm$  desvio padrão relativo (n = 3)

### 3.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

O método proposto foi empregado na especiação de Se em águas naturais, como rio e mina e também em amostras de medicamentos, os resultados estão descritos abaixo.

#### 3.5.1 Águas Naturais

A Tabela 3.13 apresenta os resultados obtidos para a determinação de Se (IV) e Se (VI) em amostras aquosas, bem como os resultados obtidos nos testes de adição e recuperação.

Como constatado pelos valores satisfatórios de recuperação das amostras enriquecidas, pode-se inferir que o método é capaz de monitorar teores de selênio em diferentes tipos de amostras de água doce.

Uma vez que as concentrações de selênio variam amplamente de uma região geográfica para outra, pode-se concluir que as amostras de água de rio sem enriquecimento não apresentaram resultados de concentração de selênio, provavelmente devido aos baixos níveis deste elemento na região geográfica estudada. Saygi et al. (2007) encontraram os valores de  $0,09$  e  $0,012 \mu\text{g L}^{-1}$  de selenito e  $0,06$  e  $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$  de selenato, respectivamente em águas engarrafadas e em um rio na Turquia.

Tabela 3.13 - Resultados dos testes de adição e recuperação das espécies de selênio em amostras de águas naturais.

Amostra	Enriquecimento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		Valor encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		Recuperação (%)	
	Se (IV)	Se (VI)	Se (IV)	Se (VI)	Se (IV)	Se (VI)
Água de mina	-	-	$2,2 \pm 0,03^a$	ND <sup>b</sup>	-	-
	3,0	-	$5,5 \pm 0,05$	ND	105	-
Água de mina	-	-	ND	ND	-	-
	1,0	5,0	$1,0 \pm 0,01$	$5,2 \pm 0,01$	99	104
Rio Sapucaí	-	-	ND	ND	-	-
	3,0	3,0	$3,0 \pm 0,07$	$3,3 \pm 0,05$	99	109
Rio Verde	-	-	ND	ND	-	-
	5,0	1,0	$5,5 \pm 0,08$	$1,1 \pm 0,07$	110	109

<sup>a</sup>média  $\pm$  desvio padrão relativo (n = 3)

<sup>b</sup>ND: valor não detectado.

### 3.5.2 Selênio Quelato

O método proposto foi empregado na determinação de selenito e selenato em amostras de matéria-prima para medicamentos.

Os resultados estão descritos na Tabela 3.14 e como pode ser observado os valores de concentração de selenito estão de acordo com o laudo do fabricante, sendo que selenato não foi detectado, o que está em concordância com Deg (2007) o qual menciona que pode ser encontrado selenito ou selenato quelado com aminoácidos para uso como medicamento.

Esta amostra poderia ser analisada sem um procedimento de pré-concentração para determinação de selênio total, devido aos altos níveis do analito na mesma, entretanto, os procedimentos de diluição e pré-concentração favorecem a redução de possíveis interferentes na análise de selenito e selenato, uma vez que o método foi otimizado para os mesmos.

Tabela 3.14 - Resultado da análise de selênio quelato.

Amostra	Valor encontrado (%)		Certificado de análise do fornecedor (%)	Diferença (%)	
	Se (IV)	Se (VI)		Se (IV)	Se (VI)
Pimpinela	0,5 ± 0,08 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	0,54	9,3	-
Pharma Ervas	0,5 ± 0,09	ND	0,57	5,3	-

<sup>a</sup>média ± desvio padrão relativo (n = 3)

<sup>b</sup>ND: valor não detectado.

## 4 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do sistema de pré-concentração *in-line* à GFAAS para especiação de selênio foi realizado.

Vários métodos sobre especiação de selênio descritos na literatura utilizam uma etapa de redução de selenato a selenito. A mesma é geralmente realizada com uma solução concentrada de HCl sob aquecimento por vários minutos (YAN; SPERLING; WELZ, 1999; DIAS; CADORE; BACCAN, 2003), tornando o sistema moroso, sujeito a perdas do analito, contaminação da amostra, além de necessitar de um consumo maior de reagentes. Neste sentido, uma das principais vantagens do presente trabalho, consiste no fato do mesmo dispensar esta etapa de redução, uma vez que a especiação realizada pelo mesmo é baseada nos diferentes valores de pH de pré-concentração da amostra.

Outras vantagens dizem respeito à eficiência do sistema de pré-concentração das espécies de selênio demonstrada através dos valores obtidos de 108 e 74 vezes para os fatores de pré-concentração,  $5,6 \times 10^{-2}$  e  $7,1 \times 10^{-2}$  mL, para os índices de consumo, eficiências de concentração de 37 e 25,4 FP min<sup>-1</sup>;  $4,9 \times 10^{-2}$  e  $3,1 \times 10^{-2}$  µg L<sup>-1</sup> para os limites de detecção, respectivamente para selenito e selenato.

O método apresentou seletividade satisfatória, uma vez que as interferências mais severas foram observadas apenas para as concentrações mais altas dos interferentes Cl<sup>-</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Quanto à exatidão, não houve diferença significativa em 95% do nível de confiança entre os resultados obtidos pelo presente método e o valor certificado do material de referência de fígado de *Dogfish*. O teste de adição e recuperação apresentou resultados satisfatórios, dentro da faixa de 99 a 110% para as amostras de águas.

Adicionalmente, os maiores coeficiente de variação obtidos com a precisão intra-corrída (4,4%) e inter-corrídas (5,5%) podem ser considerados adequados.

O fato do método não ter quantificado as duas espécies de selênio nas amostras naturais, serve de estímulo para trabalhos posteriores empregando diferentes tipos de amostras ou modificando o presente trabalho no sentido da pré-concentração de um maior volume de amostra com o intuito de melhorar o limite de detecção do método.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFKHAMI, A.; MADRAKIAN, T. Kinetic-spectrophotometric determination of selenium in natural water after preconcentration of elemental selenium on activated carbon. **Talanta**, v. 58, p. 311 – 317, 2002.

ALLAN, C.; LACOURCIERE, G. M.; STADMAN, C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 19, p. 1-16, 1999.

AMAI, R. S. et al. Assessment of nanocomposite alumina supported on multi-wall carbon nanotubes as sorbent for on-line nickel preconcentration in water samples. **Sep. Purif. Technol.**, v. 58, p. 122 – 128, 2007.

ARPADJAN, S.; VUCHKOVA, L.; KOSTADINOVA, E. Sorption of Arsenic, Bismuth, Mercury, Antimony, Selenium and Tin on Dithiocarbamate Loaded Polyurethane Foam as a Preconcentration Method for Their Determination in Water Samples by Simultaneous Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **The Analyst**, v. 122, p. 243 – 246, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1996.

BOHRER, D. et al. Comparison of graphite furnace and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of selenium status in chicken meat. **Food Chem.**, v. 104, p. 868-875, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de jun. 2003a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução RE nº 357, de 17 de março de 2005**. “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.” Disponível em: < [www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm](http://www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm).> Acesso em: jan. 2008.

BURGUERA, M.; BURGUERA, L. J. On-line electrothermal atomic absorption spectrometry configurations: recent developments and trends. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 62, p. 884-896, 2007.

CANADA. National Research Council Canada. **DOLT-4: Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals**. Ottawa, Ontario, may. 2008. Disponível em: <[http://inms-ienm.nrc-cnrc.gc.ca/calserv/crm\\_files\\_e/DOLT-4\\_e.pdf](http://inms-ienm.nrc-cnrc.gc.ca/calserv/crm_files_e/DOLT-4_e.pdf)>. Acesso em: mar. 2009.

CANKUR, O.; YATHAVAKILLA, S. K. V.; CARUSO, J. A. Selenium speciation in dill (*Anethum graveolens* L.) by ion pairing reversed phase and cation exchange HPLC with ICP-MS detection. **Talanta**, v. 70, p. 784-790, 2006.

CHERNOFF, R. Supplement: women and micronutrients: addressing the gap throughout the life cycle. Micronutrient requirements in older women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, n. 5, p. 1240-1245, 2005.

COELHO, N. M. M.; BACCAN, N. Determinação de ultratraços de selênio em urina por geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica em fluxo. **Eclética**, v. 29, n. 1, p. 7-14, 2004.

DEG. **Quelato de selênio**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.deg.com.br/pdf/index.php?txtAnexo=Literatura>> Acesso em: abr. 2007.

DENG, et al. Determination of selenomethionine in selenium-enriched yeast using capillary electrophoresis on-line coupled with electrochemiluminescence detection. **Microchim. Acta**, 2008.

DIAS, V. M.; CADORE, S.; BACCAN, N. Determination of selenium in some food matrices by electrothermal atomic absorption spectrometry after preconcentration with diethyldithiophosphate. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 18, p. 783 – 786, 2003.

ENCINAR, J. R. et al. Determination of Selenomethionine and Selenocysteine in Human Serum Using Speciated Isotope Dilution-Capillary HPLC-Inductively Coupled Plasma Collision Cell Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 6635-6642, 2004.

FANG, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration**. Nova York: VCH, p. 1-12, 1993.

FANG, Z.; SPERLING, M.; WELZ, B. Flow Injection On-line Sorbent Extraction Pre-concentration for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 5, p. 639 – 646, 1990.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.

FIGUEIREDO, et al. A homemade Autosampler/Injector Commutador for Flow Injection Analysis. **J. Autom. Methods Manage Chem.**, p. 1-4, 2006.

GÓMEZ-ARIZA, J. L. et al. Column-switching system for selenium speciation by coupling reversed-phase and ion-exchange high-performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 889, p. 33-39, 2000.

GÓMEZ, M. M. et al. Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation-atomic absorption spectrometric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 374, p. 241-251, 1998.

GORDEEVA, V. P. et al. X-ray fluorescence determination of As, Bi, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Se, V and Zn in natural water and soil extracts after preconcentration of their pyrrolidinedithiocarbamates on cellulose filters. **Talanta**, v. 61, p. 315-329, 2003.

GUERIN, T.; ASTRUC, A.; ASTRUC, M. Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques. **Talanta**, v. 50, p. 1-24, 1999.

INGLE JR, J. D.; CROUCH, S.R. **Spectrochemical Analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1988.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical methods: definitions and terminology. ICH Q2 A, 1994.**

IP C. et al. In Vitro in Vivo Studies of Methylseleninic Acid: Evidence That a Monomethylated Selenium Metabolic Is Critical for cancer Chemoprevention. **Cancer Res.**, v. 60, p. 2882-2886, 2000.

JURESA, D.; KUEHNELT, D.; FRANCESCONI, K. A. Consequences of Vapor Enhancement on Selenium Speciation by HPLC/ICP-MS. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 8569-8574, 2006.

JITMANEE, K. et al. DRC<sup>TM</sup>ICP-MS coupled with automated flow injection system with anion exchange minicolumns for determination of selenium compounds in water samples. **Talanta**, v. 73, p. 352 – 357, 2007.

KOBAYASHI, Y.; OGRA, Y.; SUZUKI, K. T. Speciation and metabolism of selenium injected with <sup>82</sup>Se-enriched selenite and selenate in rats. **J. Chromatogr. B**, v. 760, p. 73-81, 2001.

KREMER, D.; ILGEN, G.; FELDMANN, J. GC-ICP-MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of <sup>77</sup>Se-enriched selenite: monitoring of in-vivo methylation of selenium. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 509-515, 2005.

KUBOTA, T.; OKUTANI, T. Determination of selenium content in natural water by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with molybdate-form anion exchange resin. **Anal. Chim. Acta**, v. 351, p. 319 – 324, 1997.

KUBOTA, T.; SUZUKI, K.; OKUTANI, T. Determination of total selenium content in sediments and natural water by graphite furnace-atomic absorption spectrometry after collection as a selenium (IV) complex on activated carbon. **Talanta**, v. 42, p. 949 - 955, 1995.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LI, S.; DENG, N. Separation and preconcentration of Se(IV)/Se(VI) species by selective adsorption onto nanometer-sized titanium dioxide and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 374, p. 1341 – 1345, 2002.

LI, Y. et al. Simultaneous speciation of selenium and mercury in human urine samples from long-term mercury-exposed populations with supplementation of selenium-enriched yeast by HPLC-ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 22, p. 925–930, 2007.

LIU, et al. Keshan disease – a review from the aspect of history and etiology. **Jpn. J. Hygiene**, v. 56, n. 4, p. 641 – 648, 2002.

LIANG, L. et al. Selenium speciation by high-performance anion-exchange chromatography-post-column UV irradiation coupled with atomic fluorescence spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1118, p. 139-143, 2006.

MACHADO, L. F. R.; JACINTHO, A. O.; GINÉ, M. F. Geração eletroquímica do hidreto de selênio em sistema de injeção em fluxo com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama AR-GLP. **Quím. Nova**, v. 23, n. 1, p. 30-33, 2000.

MACHÁT, J.; KANICKÝ, V.; OTRUBA, V. Determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with pneumatic nebulization. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 372, p. 576-581, 2002.

MALEKI, N.; SAFAVI, A.; DOROODMAND, M. M. Determination of selenium in water and soil hydride generation atomic absorption spectrometry using solid reagents. **Talanta**, v. 66, p. 858-862, 2005.

MATUSIEWICZ, H.; KRAWCZYK, M. On-line Hyphenation of Hydride Generation with in situ Trapping Flame Atomic Absorption Spectrometry for Arsenic and Selenium Determination. **Anal. Sci.**, v. 22, p. 249-253, 2006.

MORENO, M. E.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C. Speciation of inorganic selenium in environmental matrices by flow-injection analysis-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **J. Anal. Spectrom.**, v. 15, p. 681 – 686, 2000.

MOSCOSO-PÉREZ, et al. Pressurized liquid extraction followed by high performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry for arsenic and selenium speciation in atmospheric particulate matter. **J. Chromatogr. A**, v. 1215, p. 15-20, 2008.

MOUNICOU, et al. Analysis of selenized yeast for selenium speciation by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-CZE-ICP-MS). **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 17, p. 15-20, 2002.

OHLWEILER, O. A. **Química Inorgânica**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1971.

OLSEN, S. et al. Combination of Flow Injection Analysis with Flame Atomic-absorption Spectrophotometry: Determination of Trace Amounts of Heavy Metals in Polluted Seawater. **The Analyst**, v. 108, n. 1289, 905 – 917, 1983.

PACHECO, P. H., et al. Selective determination of inorganic selenium species in parenteral solutions using L-methionine as retaining agent in GFAAS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 23, p. 397 – 401, 2008.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Sci. Int.**, v. 165, p. 216 – 224, 2007.

PYRZÍNSKA, K.; DRZEWEZ, P.; TROJANOWICZ, M. Preconcentration and separation of inorganic selenium species on activated alumina. **Anal. Acta**, v. 363, p. 141 – 146, 1998.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUEIROZ, et al. Flow system with in-line separation/preconcentration coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry with W-Rh permanent modifier for copper determination in seawater. **Anal. Chim. Acta**, v. 463, p. 275-282, 2002.

REPETTO, M. R.; REPETTO, M. **Tabla de Concentraciones de xenobioticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnostico toxicológico.** Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Area de Toxicología de la Universidad de Sevilla. España, 2005.

SABÉ, R.; RUBIO, R.; GARCÍA-BELTRÁN, L. G. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. **Anal. Chim. Acta**, v. 419, p. 121-135, 2000.

SAYGI, K. O. et al. Speciation of selenium(IV) and selenium (VI) in environmental samples by the combination of graphite furnace atomic absorption spectrometric determination and solid phase extraction on Diaion HP-2MG. **Talanta**, v. 71, p. 1375-1381, 2007.

SHIOBARA, Y.; SUZUKI, K. T. Binding of selenium (administered as selenite) to albumin after efflux from red blood cells. **J. Chromatogr. B**, v 710, P. 49-56, 1998).

SHRIVER, D. F. **Química Inorgânica**. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 2003.

STOZHKO, N. Y. et al. Ceramic Composite Electrode for Determination of Selenium (IV) by Stripping Voltammetry. **J. Anal. Chem.**, v. 61, n. 2, p. 158 – 165, 2006.

STRIPEIKIS, J., et al. Determination of selenite and selenate in drinking water: a fully automatic on-line separation/pre-concentration system coupled to electrothermal

atomic spectrometry with permanent chemical modifiers. **Anal. Chem. Acta**, v. 502, p. 99 – 105, 2004.

STURUP, S.; HAYES, R. B.; PETERS, U. Determination and application of a simple routine method for the determination of selenium in serum by octopole reaction system ICP-MS. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 381, p. 686-694, 2005.

SUVARDHAN, K. et al. Selenium determination in various vegetable samples by spectrophotometry. **Food Chem.**, v. 103, p. 1044-1048, 2007.

SUZUKI, K. T. et al. Simultaneous tracing of  $^{76}\text{Se}$ -selenite and  $^{77}\text{Se}$ -selenomethionine by absolute labeling and speciation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 217, p. 43-50, 2006.

SUZUKI, K. T.; ISHIWATA, K.; OGRA, Y. Incorporation of selenium into selenoprotein P and extra cellular glutathione peroxides: HPLC-ICP-MS data with enriched selenite. **The Analyst**, v. 124, p. 1749-1754, 1999.

SUZUKI, K. T. Metabolomics of selenium: Se Metabolites Base on Speciation Studies. **J. Health Sci.**, v. 51, n. 2, p. 107-114, 2005.

SUZUKI, K. T.; SOMEKAWA, L.; SUZUKI, N. Distribution and reuse of  $^{76}\text{Se}$  selenosugar in selenium-deficient rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 216, p. 303-308, 2006.

SVEHLA, G. **Vogel's: Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis**. 5. ed. London: Longman, 1979.

TARLEY, C. R. T. et al. Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd(II) determination at  $\text{ng L}^{-1}$  levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, p. 1305-1313, 2006.

WANG, R. et al. Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer. **Anal. Chim. Acta**, v. 590, p. 239-244, 2007.

WAKE, et al. Modern preconcentration methods for the determination of selenium species in environmental water samples. **Trends Anal. Chem.**, v. 23, n. 7, p. 491-500, 2004.

WHO. **Selenium.** Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123\\_chap10.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap10.pdf)> Acesso em: abr. 2009.

WHO. **Selenium in Drinking-water.** Disponível em <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/selenium.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/selenium.pdf)> Acesso em: nov. 2008.

YAN, X. SPERLING, M., WELZ, B. On-Line coupling of Flow Injection Microcolumn Separation and Preconcentration to Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry for Determination of (Ultra)trace Selenite and Selenate in Water. **Anal. Chem.**, v. 71, p. 4353 – 4360, 1999.

YU, C. et al. Simultaneous speciation of inorganic selenium and tellurium by inductively coupled plasma mass spectrometry following selective solid-phase extraction separation. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 19, p. 419 – 413, 2004.

XIA Y. et al. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. **Am. Soc. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 829-834, 2005.

XIONG, C.; HE, M.; HU, B. On-line separation and preconcentration of inorganic arsenic and selenium species in natural water samples with CTAB-modified alkyl silica microcolumn and determination by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 772 – 779, 2008.

ZHANG, L. et al. Inorganic speciation of As(III, V), Se(IV, VI) and Sb(III, V) in natural water with GF-AAS using solid phase extraction technology. **Talanta**, v. 72, p. 723-729, 2007.

ZHENGJUN, G. et al. Flow injection kinetic spectrophotometric determination of trace amounts of Se (IV) in seawater. **Talanta**, v. 66, p. 1012-1017, 2005.