UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

RAFAEL FRANÇA ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO A GERAÇÃO DE HIDRETOS ACOPLADA AO F AAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO

Vitória da Conquista, BA

2017

RAFAEL FRANÇA ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO A GERAÇÃO DE HIDRETOS ACOPLADA AO F AAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Santos Souza

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2017

RAFAEL FRANÇA ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO A GERAÇÃO DE HIDRETOS ACOPLADA AO F AAS PARA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 2017.

Prof. Dr. Anderson Santos Souza

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Daniel de Castro Lima

Universidade Estadual de Santa Cruz

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prefiro:

Ser um solitário da montanha a um rei do camarote

Um perdido em um lugar novo

exercitar a paciência na prática

Não pertencer a nenhum grupo

mas fazer parte de todos e respeita lós

Ter mais amigos loucos do que dinheiro

No lugar das palavras

o sábio silêncio das pedras

o olhar fixo da águia

a agilidade do rato

a sutileza das aranhas

a fragilidade das plantas

Falar menos, observar mais

Acordar não por um aparelho de celular

mas através dos raios de sol leve-mente

aquece meu rosto adormecido e ressaquiado

Ser o miserável mais viajado do planeta

do que o senhor mais rico do bairro

Caminhar e ver

abrir o coração e amar.

Devaneios Baratos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela oportunidade de estar realizando esse trabalho e por todas as bençõe concedidas.

Ao Professor Dr. Anderson Santos Souza, por todos os ensinamentos, confiança, e parceria durante todo o tempo, almém de orientador se demonstrou um grande amigo.

Ao professor Dr. Daniel de Castro Lima, por todo o auxilio que foi dado para o desenvolvimento do método, tanto em materiais e utensílios como também em conhecimento.

Ao professor Dr. Douglas Gonçalves da Silva, por ter cedido o espaço do seu laboratório e equipamentos para o preparo das amostras a serem analisadas.

Ao Grupo QUAMPA por todo o esforço para está sempre colaborando com o projeto e também pelo companheirismo e amizade formada, do laboratório para a vida.

Aos meus familiares, em especial a minha esposa Carina, por todo auxílio e compreensão durante todo o período desse trabalho, pois a mudança de humor era algo constante.

Ao programa de Pós-graduação em Biociências da UFBA e a todos os colaboradores que sempre com muito carinho e atenção me serviu.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESB pelo financiamento da pesquisa.

A todos a minha eterna gratidão.

ANDRADE, Rafael França. Desenvolvimento de método analítico usando a geração de hidretos acoplada ao F AAS para determinação de selênio. 56 f. il. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

RESUMO

Na busca por desenvolver um método analítico sensível, preciso e de baixo custo para a determinação de selênio foi proposta a análise por injeção em fluxo para a geração de hidretos acoplada a espectrometria de absorção atômica (FIA-HG-AAS). O sistema de Injeção em fluxo foi construído com materiais de baixo custo e se mostrou muito eficiente para a geração de hidretos e a posterior quantificação através do espectrômetro de absorção atômica. Foi feito um estudo das variáveis vazão do borohidreto de sódio, Vazão do ácido clorídrico (HCl), Vazão do gás de arraste, concentração do borohidreto de sódio, concentração do HCl e comprimento da bobina de reação que foram consideradas significativas para o desenvolvimento do método. Para validar o método analítico desenvolvido foram utilizados parâmetros analíticos em que foram obtidos os seguintes resultados, o limite de detecção de 2,52 $\mu g.L^{-1}$ e um limite de quantificação de 8,41 $\mu g.L^{-1}$ com uma frequência analítica de até 60 determinações por hora, a precisão do método foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD) em padrões de concentração 25,0 $\mu g.L^{-1}$ igual a 4,6% e para a concentração de 150 $\mu g.L^{-1}$, foi de 3,3%. O método proposto foi aplicado em amostras de castanha de caju de diferentes cidades do estado da Bahia a fim de avaliar a concentração de selênio em castanhas cultivadas em diferentes regiões do estado. Quatro amostras foram analisadas, e a concentração de selênio encontrada variou de 9,9 µg a 28,7 µg. A validação do método foi realizada através de teste de adição e recuperação de concentrações conhecidas de selênio em amostras de agua coletadas no rio Paraguaçu na cidade de Itaetê-Ba, foram obtidas recuperações quantitativas na faixa de 101,2% a 108,7% em concentrações de 25,0 $\mu g.L^{-1}$ e 50,0 $\mu g.L^{-1}$ de selênio respectivamente.

Palavras-chave: Selênio, geração de hidretos, injeção em fluxo, castanha de caju.

ANDRADE, Rafael França. Development of an analytical method using hydride generation coupled to FAAS for determining selenium. 56 f. il. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

ABSTRACT

In order to develop a precise, low cost and high sensitivity analytical method for the determination of selenium it was proposed an analysis using flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS). The flow injection system was built employing low cost materials and achieved huge efficiency of hydride generation and *subsequent* quantification by *atomic absorption spectrometry*. A study was carried out for a number of parameters considered significant for the development of the method, including the flow rate of sodium borohydride and *hydrochloric acid* (HCl), carrier gas flow rate, sodium borohydride and HCl concentrations, and reaction coil length. The *developed analytical method* was *validated using* analytical procedures that presented a detection limit of 2.52 $\mu g.L^{-1}$ and a quantification limit of 8.41 $\mu g.L^{-1}$ with an analytical frequency up to 60 determinations per hour. The precision of the method was estimated by calculating the relative standard deviation (RSD) in standard concentrations of 25.0 $\mu g.L^{-1}$ and 150 $\mu g.L^{-1}$, the RSD values were 4.6% and 3.3%, respectively. The proposed method was applied to cashew nuts samples harvested from cities in the state of Bahia with the purpose of evaluating the concentration of selenium in nuts grown in different regions. Four samples were analyzed, and the selenium concentration ranged from 9.9 µg to 28.7 µg. The validation of the method was performed by the recovery test determined by reference concentrations of selenium dissolved in water samples collected from Paraguaçu River in the city of Itaetê-Ba. The recovery values in selenium concentrations of 25.0 $\mu g.L^{-1}$ and 50.0 $\mu g.L^{-1}$ were 101.2% and 108.7%, respectively.

Keywords: Selenium, hydride generation, flow injection, cashew nut.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Benefícios do Selênio para a saúde. 5

Figura 2. Diagrama esquemático dos Tubos atomizadores 9

Figura 3. Diagrama esquemático do TS-FF-AAS. B: Bomba peristáltica, I: Válvula injetora, C: Tubo capilar, T: Tubo atomizador, Q: Queimador. 10

Figura 4. Divisão politica da Bahia em mesorregiões 16

Figura 5. Processo de decorticação das castanhas (a). Retirada das amendoas.....16

Figura 6. (a) Amêndoas após a decorticação; (b) Amêndoas pulverizadas 17

Figura 7: Diagrama esquemático do Sistema FIA-HG-F AAS proposto. Fonte: Próprio autor 18

Figura 8. Reator em bobina do sistema FIA. 19

Figura 9. Separador Gás/líquido do sistema FIA 19

Figura 10. Suporte metálico para o tubo de quartzo do sistema FIA 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do selênio 3

Tabela 2: Matriz de planejamento de dois níveis para teste de robustez. 24

Tabela 3: Valores reais do ponto central, máximo e mínimo utilizados no teste de robustez. 24

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Espectroscopia de Absorção Atômica

AFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CF – Fluxo Contínuo

RSD – Desvio Padrão Relativo

F AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

FI – Injeção em Fluxo

FIA – Análise por Injeção em Fluxo

FIA-HG-AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama combinada à Análise por Injeção em Fluxo

FANES - Espectrometria de Emissão Ótica em Forno com Excitação não Térmica

GFAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafita

HG – Geração de Hidretos

ICP OES - Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado

ICP MS - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

IDR - Ingestão Diária Recomendada

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MIP-OES - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido por Microondas

TS-FF-AAS - Thermospray Flame Furnace AAS

SUMÁRIO

RESUMO III
ABSTRACT IV
LISTA DE FIGURAS V
LISTA DE TABELAS VI
LISTA DE ABREVIATURAS VII
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2
2.1 SELÊNIO 2
2.2 ESSENCIALIDADE X TOXICIDADE 4
2.3 FONTES DE SELÊNIO 5
2.4 GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO 6
2.5 TRANSPORTE DE HIDRETOS VOLÁTEIS ..... **Erro! Indicador não definido.**
2.6 BOROHIDRETO DE SÓDIO 12
3. JUSTIFICATIVA 13
4. OBJETIVOS 14
4.1 OBJETIVO GERAL 14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14
5. MATÉRIAIS E MÉTODOS 15
5.1 INSTRUMENTAÇÃO 15
5.2 AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS 15
5.2.1 Extração das castanhas 16
5.2.2 Digestão das amostras 17
5.4 REAGENTES 20
5.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES 20
5.5.1 Solução de NaOH 0,05 M 20
5.5.2 Solução de HCl 4 M 20
5.5.3 Solução de $NaBH_4$ 0,25 % Alcalino 20
5.5.4 Solução padrão de selênio 20
5.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 21
5.6.1 Planejamento Univariado 21
5.7 FIGURAS DE MÉRITO 21
5.7.1 Linearidade 21

5.7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). 22
5.7.3 Precisão 22
5.7.4 Exatidão 23
5.7.5 Robustez 23
5.7.6 Frequência Analítica 23
5.7.7 Aplicação 23
6.0 REFERÊNCIAS 25
7.0 ARTIGO 1

1. INTRODUÇÃO

O selênio é um oligoelemento que está presente em alguns alimentos como castanha-do-brasil, rim bovino, frango, peixes e ovos, e sua concentração varia de acordo com a região em que esse alimento é cultivado, pois sua concentração no solo gera um ciclo que afeta as plantas e os animais que se alimentam destas (COMINETTI e COZOLLINO, 2009).

A essencialidade desse elemento em humanos só foi comprovada no ano de 1979 a partir de um caso clinico de um paciente com distrofia muscular desenvolvida através de um longo período sob nutrição parenteral total que apresentou melhora após a suplementação a base de selênio além da descoberta da doença de Keshan, em solos pobres em selênio em algumas regiões da China (CHEN et al. 1980). Oldfiel em 1987 também comprovou a partir de estudos que o selênio apresenta função anticarcinogênica.

Porém, seu nível considerado tóxico para o organismo é apenas 100 vezes maior do que a concentração essencial - Índice de Ingestão Diária (IDR) – segunda a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA – é de apenas 34 μg/dia, e o excesso de selênio no organismo humano pode favorecer o aparecimento de doenças relacionadas como também a fragilidade de unhas e cabelo, alterações gastrointestinais, fadiga e alterações do sistema endócrino, entre outros fatores.

As castanhas são consideradas excelentes fontes nutricionais de selênio, e dentre elas, a castanha-do-brasil se destaca, podendo conter até 510 $\mu g.g^{-1}$ de selênio (PRAUCHNER, 2014). Com o aumento da produção e do consumo de castanhas de caju no Brasil, e ainda a maior acessibilidade à população, em comparação à castanha-do-brasil, surge o interesse da quantificação de selênio em amostras de castanhas de caju produzidas no estado da Bahia.

O desenvolvimento de novos métodos analíticos vem trazendo respostas para problemas científicos, ambientais, médicos e agrícolas, além de tantos outros que decorrem muitas vezes por contaminação de metais tóxicos. Buscam-se também benefícios através da quantificação de elementos essenciais em amostras

alimentícias, controle de qualidade em análises clínicas e em produtos industrializados (MORETTO, 2001).

Dentre vários métodos utilizados para essa determinação de espécies químicas, podemos citar a espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (JUNIOR, 2008), espectrometria de fluorescência atômica (NAKAJARA, 1983; BISINOTI, 2006) e molecular (JOHANSSON, LUO e OLIN, 1995) além da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (THOMPSON et al. 1978; PAHLAVANPOUR et al. 1980; CRISPINO, 2005).

Além desses métodos citados, a geração de hidretos tem sido uma técnica de introdução de amostra muito utilizada, acoplada a vários métodos de detecção para a determinação de espécies químicas. A técnica mais utilizada acoplada à geração de hidretos é a espectrometria de absorção atômica.

Essa técnica apresenta várias vantagens em relação à introdução direta da amostra através da nebulização. Em conjunto com um sistema de injeção em fluxo fornece um aumento na sensibilidade da absorção atômica, além de um baixo custo, pois o sistema pode ser confeccionado com materiais alternativos, além da facilidade acoplamento e automação, dentre outras vantagens (TAKASE et al., 2002).

Neste aspecto, esse trabalho propôs o desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para a geração de hidretos e posterior detecção através da espectrometria de absorção atômica com o auxilio de um tubo atomizador de quartzo posicionado sobre o queimador do F AAS para a determinação de selênio em amostras de castanha de caju.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SELÊNIO

O selênio, Se, cujo nome significa Lua, é um elemento representativo da família dos calcogênios (Família 16) da tabela periódica, descoberto em 1817 pelo químico francês Jöns Jacob Berzelius, possui propriedades físicas e químicas diferentes entre os elementos da mesma família, pois ocorre um transição de caráter

não-metálico para metálico. O oxigênio e o enxofre são ametais, o selênio e o telúrio apresentam algumas características metálicas e o polônio é radioativo que apresenta características de metal. São sólidos com estruturas complexas à temperatura ambiente, com exceção do oxigênio que é gasoso, apresentam diferentes variedades alotrópicas e possuem estado de oxidação variável (COMINETTI e COZOLLINO, 2009). Algumas propriedades do Selênio podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do selênio.

Propriedades do Selênio	
Propriedade	Valor
Número atômico	34
Configuração	$4s^2 4p^4$
Energia de ionização (kcal)	225
Raio Atômico (A)	1,17
Ponto de Fusão (°C)	217
Ponto de Ebulição (°C)	685
Massa Molar (g/mol)	78,96
Densidade (g/cm^3, 20°C)	4,81
Pressão de Vapor (mmHg, 356°C)	1

Fonte: MAHAN; ATSDR

O selênio é um elemento raro que representa apenas 0,09% da crosta terrestre, apesar de ser encontrado por todo o ambiente é distribuído de forma desigual pelo planeta (JUNIOR, 2008). Ocorre sob a forma de selenetos em alguns minerais, também está associado ao enxofre, as principais fontes são os minérios de cobre. Em águas naturais ocorre em concentrações na ordem de ng/L. Na sua forma elementar apresenta riscos quanto a incêndios e explosões na presença de agentes oxidantes com a emissão de gases irritantes ou tóxicos.

Por suas características de semicondutor, é muito utilizado na eletrônica, por ser mal condutor de eletricidade na ausência de luz e sua condutividade é aumentada quando iluminado ele se tornou um dos principais constituintes de células fotossensíveis e retificadores e também na metalurgia e na fabricação de pigmentos, vidros e cerâmicas. Tem sido bastante utilizado na fotografia e reprografia e também

como antioxidante em óleos lubrificantes e em formulações anticaspa (KIRK-OTHMER, 1992).

2.2 ESSENCIALIDADE X TOXICIDADE

A essencialidade do Se em animais só foi verificada em 1957, por Schwarz e Foltz, em que animais com deficiência de vitamina E se beneficiaram da suplementação desse elemento com relação à necrose hepática. Em 1973 foi estabelecida a importância desse mineral no sitio ativo da enzima glutationa peroxidase, que é um poderoso agente antioxidante que protege as células do corpo e reduz as substâncias tóxicas causadas pelo estresse oxidativo (GERMANO et. al. 2014). Em 1979 foi demonstrada também a sua essencialidade para os humanos, em um paciente com distrofia muscular, devido a um longo período sob nutrição parenteral total, demonstrou uma evolução em seu quadro clínico após suplementação com o Se. A descoberta da doença de Keshan, uma cardiomiopatia que afeta crianças que vivem em regiões de solos com deficiência desse mineral, também foi um decisivo fator para a comprovação da essencialidade desse mineral para os seres humanos (CHEN et al. 1980).

O selênio é um oligoelemento necessário aos seres humanos em pequenas quantidades e que desempenha uma função metabólica de proteção frente aos danos causados pelo estresse oxidativo e é proposto que a ingestão de nutrientes antioxidantes, frutas e vegetais, capazes de reduzir os radicais livres, responsáveis pelo estado oxidativo, de forma direta, como as vitaminas, ou de forma indireta, que é o caso dos minerais que atuam como co-fatores de enzimas antioxidantes, o principal papel dessas enzimas é agir na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (TEIXEIRA et al., 2016; VOLP et al., 2010; FERREIRA et al., 2002).

Pesquisas comprovam que o selênio é um dos principais constituintes da enzima 5’-deiodinaze, que atua no metabolismos dos hormônios da tireoide, e que a deficiência do iodo no organismo pode causar algumas síndromes e que são agravadas com a ausência simultânea do selênio (FERREIRA et al., 2002). Nos alimentos o selênio se encontra principalmente na forma de selenometionina, que é totalmente absorvida pelo organismo, já que na forma mineral ele é rapidamente excretado (VIARO, VIARO e FLECK, 2001).

Entretanto, o nível considerado tóxico desse elemento em nosso organismo é apenas 100 vezes maior do que as quantidades necessárias para as funções fisiológicas, que pode causar náuseas, problemas neurológicos, perda de cabelo, falhas respiratórios e até a morte (VIARO, VIARO e FLECK, 2001). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - determina que a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de selênio para um adulto, capaz de atender às necessidades nutricionais, seja de 34 µg (ANVISA, 2005).

A figura 1 mostra em resumo algumas dos principais benefícios do selênio para os seres humanos.

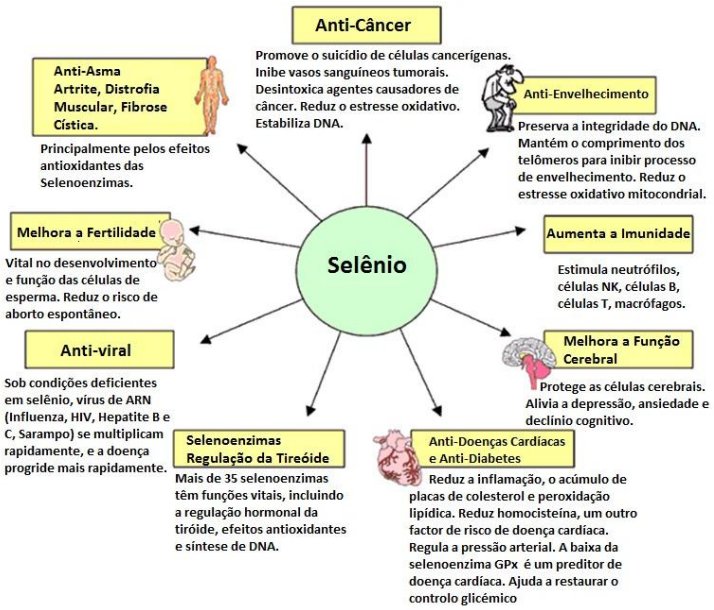

Figura 1. Benefícios do Selênio para a saúde. (Adaptado de Brezinski, 2013)

O intervalo entre o nível essencial e o nível tóxico é considerado pequeno, devido a isso se apresenta a grande importância do desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação e quantificação desse mineral em diversos alimentos, que devem ser consumidos com o objetivo de repor o selênio no organismo mantendo as suas funções essências e também controlar a ingestão de alimentos com alto teor de selênio evitando a intoxicação do individuo (COELHO e BACCAN, 2004).

2.3 FONTES DE SELÊNIO

A entrada do selênio na cadeia alimentar ocorre de maneira natural através do consumo de alimentos e de forma artificial pela atividade antrópica na agricultura,

indústria, o uso de medicamentos e cigarros que podem também inseri-lo na dieta humana (MOREIRA, 1994). Vários tipos de alimentos podem ser utilizados para a manutenção do teor de selênio no organismo, dentre eles temos rim bovino, carnes de aves, ovos, peixes e mariscos, cereais e farinhas, leites e derivados, castanha-do-brasil, dentre outros (COMINETTI e COZOLLINO, 2009).

A castanha faz parte do grupo das nozes verdadeiras, que são frutas secas espessas e muitas vezes as suas sementes se encontram recobertas por espinhos. As mais conhecidas além da castanha-de-caju são: amêndoas, pecã, castanha-do-pará, pistache, avelã, macadâmia e noz. Estes frutos costumam ter elevados teores de lipídeos (40% a 60%) e de proteínas (8% a 20%), exceto a castanha que o teor de proteínas fica em torno de 6% e de lipídeos apenas 2% a 3%. O nível de aminoácidos essências atende grande parte das necessidades de crianças e adultos além de outros nutrientes e substâncias funcionais que são benéficas à saúde, como ácidos graxos, fitoterois, altos teores de vitamina E e selênio (FREITAS e NAVES, 2010). A média de selênio encontradas em castanhas do Brasil foi de 204,0 µg/100g (SOUZA e MENEZES, 2004).

O Brasil está entre os cinco principais produtores mundiais de castanha de caju, os países que lideram o ranking são Índia e Vietnã. De toda a castanha de caju produzida no Brasil apenas 15% é para o mercado interno, distribuídos entre fábricas de sorvete, chocolate, supermercado e padarias, os outros 85% são absorvidos pelo mercado mundial, destacando-se os Estado Unidos e a União Europeia como principais consumidores, pois a castanha de caju é considerada um alimento de luxo e, como tal, a maior demanda encontra-se em países de elevada renda per capita (MELO et al., 1998).

2.4 GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO

Devido às concentrações nível traço do selênio presente na água, alimentos e diversas outras matrizes e ainda a toxicidade do selênio para os seres humanos quando a ingestão é superior à 400 µg/dia (PREDA et. al., 2015), tem-se a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos e confiáveis para monitorar o teor de selênio em diversos tipos de amostra. (COELHO e BACCAN, 2004).

A espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) possibilita uma efetiva separação entre o selênio e a matriz, uma vez que acontece a transformação da espécie de interesse em um composto volátil, e seu posterior transporte para a célula de atomização (TAKASE et al., 2002; SILVA, 2016).

A geração química de vapor é preferida em relação ao processo de nebulização, pois torna a técnica de absorção atômica mais eficiente, uma vez que o procedimento de introdução da amostra um fator muito relevante para esse sucesso. O nebulizador pneumático se baseia na formação de um aerossol líquido para a introdução da amostra no caminho óptico, mas a apresenta varias desvantagens, dentre elas é o consumo relativamente alto de amostra em que apenas 1% a 5% da solução introduzida é transformada em aerossol útil, efeito de memória, interferências induzidas pela câmara de pulverização e quando a amostra apresenta uma elevada viscosidade, um alto teor salino ou pequenos volumes, a utilização da nebulização não é recomendada (NAKAHARA, 2005).

A geração química de vapor também pode ser utilizada sem que a atomização seja realizada por meio da chama em um espectrômetro de absorção atômica, essa técnica é conhecida como geração de "vapor frio". Consiste na redução do íon mercúrico em mercúrio elementar, que será posteriormente carreado por uma corrente de gás (ar, N_2 ou Ar) até a célula de confinamento para a realização da quantificação do mercúrio através da absorção atômica, essa técnica foi desenvolvida por Poluektov et al. em 1963 e posteriormente aprimorada por Hatch e Ott em 1968.

Holak muito contribuiu muito para o desenvolvimento da técnica de geração de vapor químico. Em seu trabalho, o arsênio foi reduzido a arsina através da adição da amostra ácida em Zn metálico, o hidreto gerado na reação foi transportado para a atomização através da chama de um aparelho de absorção atômica (HOLAK, 1968).

Observou-se um aumento considerável da sensibilidade da espectrometria de absorção atômica – AAS – devido a maior eficiência de transporte do analito através da geração de hidretos – HG – onde toda a arsina carreada por um fluxo de gás inerte, nesse caso o argônio, pode ser introduzida no caminho óptico. (TAKASE et al., 2002).

A HG possibilita muitas vantagens, dentre eles podemos citar que minimiza interferências porque o analito é transferido para a célula de atomização purgado pelo gás inerte, pois é a única espécie volátil formada na reação após a separação da matriz. O sistema de introdução de amostra se mostra mais eficiente que o nebulizador pneumático convencional, dependendo do rendimento da reação e a eficiência do gás de purga e do transporte ao atomizador podendo atingir cerca de 100% do analito no atomizador. Apresentam maiores limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e qualquer equipamento de espectrometria atômica pode ser usado para a leitura, ainda há a possibilidade de acoplamento de sistemas de especiação e é passível de automação (GRECO, 2016).

Entretanto, algumas interferências podem ser encontradas ao longo do processo e estão relacionadas às diferentes fases, ou seja, interferências de fase condensada (reação de geração e liberação do vapor da solução), interferências na fase gasosa (concomitantes existentes na solução podem impedir a reação de geração de vapor ou a eficiência da purga, ao transporte do vapor) e interferências espectrais que podem ser fatores físicos que afetam a cinética da geração de vapor e o processo de atomização/leitura, como o pH do meio, as concentrações dos reagentes e o estado de oxidação do analito (COELHO, 1995; SILVA, 2016).

Entretanto, a técnica de geração de hidretos pode ser considerada um meio alternativo para a melhoria da seletividade e sensibilidade para técnicas como a espectrofotometria e espectroscopia atômica (FIGUEIREDO, 2005).

A geração de vapor químico tem sido muito utilizado acoplado a diferentes técnicas de espectrométricas, dentre elas podemos citar a espectrometria de absorção atômica (AAS) (MORAES et al, 1995; FIGUEIREDO, 2005; ROSSI, CARAPELLI e NOGUEIRA, 2009; MACEDO, 2010) espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafita (GFAAS) (JUNIOR, 2008) espectrometria de fluorescência atômica (AFS) (NAKAJARA, 1983; BISINOTI, 2006), espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP-OES) (MATUSIEWICZ E SLANCHCINSKI, 2007) espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (THOMPSON et al. 1978; PAHLAVANPOUR et al. 1980; CRISPINO, 2005), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (VIEIRA et al., 2006) e a

espectrometria de emissão ótica em forno com excitação não térmica (FANES) (DITTRICH, FRANZ E WENNRICH, 1995). Devido à grande disponibilidade de espectrômetros de absorção atômica em laboratórios de pesquisa, esse método de acoplamento na geração de vapor se tornou muito popular (TAKASE *et al.*, 2002).

2.5 ATOMIZAÇÃO DO SELÊNIO

Dentre as dificuldades encontradas na elaboração da técnica de geração de hidretos, temos a interferência causada pela elevada absorção da chama do queimador no F AAS em comprimentos de onda característicos do analito. No caso do selênio e do arsênio, abaixo de 200 nm quando nebulizados e atomizados diretamente na chama (MACEDO, 2010).

Visando minimizar essa interferência Chu et al. desenvolveram uma técnica em que o hidreto de arsênio era carreado pelo argônio, não mais diretamente para a chama do atomizador mas para uma tubo de quartzo em forma de T. Esse tubo foi utilizado como célula de atomização, aquecido eletricamente e postado ao longo do caminho óptico do equipamento de absorção atômica.

Os tubos atomizadores surgiram como ideia de novas adaptações na espectroscopia atômica (Figura 1). Foram construídos tubos de diferentes materiais os quais são posicionados sobre o queimador do Espectrômetro de Absorção atômica com Chama - F AAS. São reportados como adaptações eficazes na melhoria da sensibilidade do F AAS. A melhoria é atribuída ao maior tempo de residência do átomo no caminho óptico, além disso, o tubo cria um ambiente quimicamente mais estável, que faz aumentar o número de átomos no estado neutro (MATUSIEWICZ, 1997).

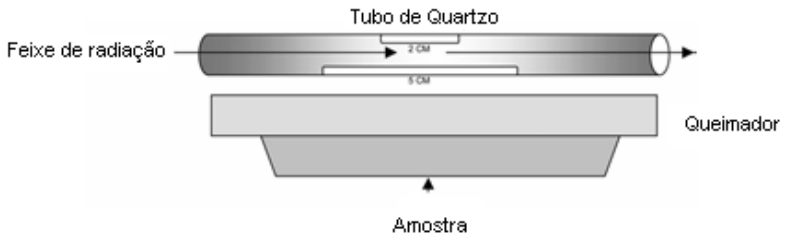

Figura 2. Diagrama esquemático dos Tubos atomizadores (Pereira e Arruda, 2003).

Os primeiros tubos atomizadores foram construídos por Watling, em 1978, ele usou um tubo de quartzo o qual possuía uma fenda na parte superior e outra

maior na parte inferior do tubo (figura 2), a introdução da amostra segue a forma convencional usando o nebulizador pneumático do equipamento. Watling conseguiu alcançar resultados entre 2 a 5 vezes superiores à forma convencional de leitura.

Petrucelli *et al.* compararam a performance de tubos atomizadores constituídos de diferentes materiais metálicos como Cr, Fe, Mo, Ni, Ti e W e também avaliou tubos constituídos de cerâmica. Petrucelli observou que os tubos de níquel e titânio apresentaram os melhores resultados, contudo o tubo de titânio possui uma vida útil muito curta em comparação com os outros.

Os experimentos pioneiros de Watling estimularam muitos outros pesquisadores a avançarem com modificações da proposta inicial. Gáspár e Bernedt implementaram o método de aprisionamento de átomo inserindo um tubo capilar de cerâmica ao tubo atomizador. O tubo capilar é responsável por transportar a amostra liquida (usando uma bomba peristáltica), como um jato de alta velocidade para dentro do tubo atomizador aquecido pela chama, onde é rapidamente vaporizada (figura 2). Os autores observaram que o novo método permitiu que toda a amostra fosse atomizada e o aumento do tempo de permanência do átomo no caminho óptico, melhorando os limites de detecção de cinco elementos determinados de 14 a 67 vezes. Este método ficou conhecido com TS-FF-AAS, acrônimo da expressão inglesa Thermospray Flame Furnace AAS.

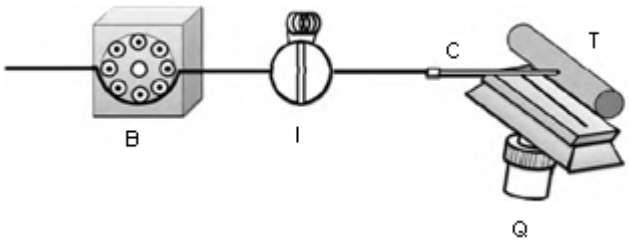

Figura 3. Diagrama esquemático do TS-FF-AAS. B: Bomba peristáltica, I: Válvula injetora, C: Tubo capilar, T: Tubo atomizador, Q: Queimador. (Pereira e Arruda, 2003).

Existem três formas distintas de transportar o hidreto formado para o equipamento de medição: através do sistema em batelada, por fluxo contínuo (CF) ou por injeção em fluxo (FI).

Um dos procedimentos de introdução da amostra no atomizador mais utilizado e que tem se mostrado muito eficaz para a diminuição de interferências é a

técnica da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) estabelecido por Ruzicka e Hansen em 1975, mas proposto pela primeira vez por Skeggs em 1957, em que a amostra é injetada em um fluxo continuo que a transporta em direção aos reagentes e segue até o detector. O FIA também foi utilizado por Cadore em 1986, que viu nesse método diversas vantagens como menor consumo de reagentes, maior eficiência de separação, simplicidade de operação, facilidade de automação destes sistemas, alta frequência analítica, melhor detectabilidade, diminuição no risco de contaminação e diminuição do efeito de interferentes e que mais tarde Moretto (2001) confirmou essas vantagens utilizando-o para a determinação de arsênio usando HG acoplado a AAS. Na busca da determinação de bismuto através da geração de hidretos, Astron em 1892 propôs um sistema FIA. Liversage *et al.* relataram em seu trabalho sobre a determinação de arsênio a utilização de um sistema FIA acoplado à técnica de geração de hidretos com detecção por espectroscopia de emissão atômica.

Devido o hidreto ser formado a partir de soluções, devemos ter um eficiente procedimento de separação entre a fase liquida e a fase gasosa, logo, diversos tipos de separadores tem sido propostos na literatura, como os separadores de membrana (CHAN e HONT, 1990) e os separadores de câmara (RIBEIRO et al. 2002). Uma analise comparativa da eficiência destes separadores gás/liquido foi feita por Krenzlov et al.

O transporte das espécies voláteis pode ser de duas formas: transferência direta e a coleta. A transferência direta acontece de forma que as espécies são transportadas diretamente para o atomizador, já a coleta, como o próprio nome já propõe, as espécies voláteis são capturadas em uma armadilha até que o processo tenha se completado e posteriormente são transportadas para a célula de leitura (DEDINA *apud* MACEDO, 2010).

O procedimento de coleta apresenta desvantagens, o que faz com que ele seja pouco utilizado, como por exemplo, o alto tempo consumido e o risco de contaminação, isso leva o procedimento da transferência direta para a preferência dos pesquisadores (TAKASE et al., 2002).

2.6 BOROHIDRETO DE SÓDIO

No inicio, a técnica de transformação do analito em uma espécie volátil a partir da produção de H_2 adicionando um metal em pó à amostra ácida apresentava algumas limitações como: apenas o As, Se e Sb eram reduzidos a hidretos, os brancos eram altos e as leituras eram pouco reprodutíveis (FIGUEREDO, 2005). Em 1972 Braman et al., através da utilização de soluções redutoras de borohidreto de sódio ($NaBH_4$) estabilizado em meio alcalino determinaram arsênio e antimônio. Dessa forma, o $NaBH_4$ começou a ser proposto como redutor em substituição às misturas metal-ácido, o borohidreto de sódio, em meio ácido, gera o hidrogênio nascente que posteriormente formará o hidreto desejado com o íon da espécie de interesse, que se encontra em solução, a partir da seguinte reação de redução:

$$NaBH_4 + HCl + 3H_2O \rightarrow H_3BO_3 + NaCl + 8H°$$

$$8\ H° + X^{m+} \rightarrow XH_m + H_2(\text{excesso})$$

X: representa a espécie de interesse.

Outros mecanismos foram propostos para a geração do hidreto, devido a discordâncias de outros pesquisadores, com a hipótese de formação do hidreto a partir do hidrogênio nascente. Sabe-se hoje que o mecanismo de formação do hidreto ocorre através da ação do hidrogênio ligado diretamente ao boro, por formação de alguns intermediários, de acordo com a seguinte reação (D'ULIVO *apud* MACEDO, 2010):

$$NaBH_4 + H_3O^+ + 2H_2O \rightarrow \text{intermediários} \rightarrow H_3BO_3 + H_2 \qquad (1)$$

$$NaBH_4/\text{intermediários} + A \rightarrow AH_n \qquad (2)$$

A: representa a espécie de interesse.

Para demonstrar que o hidrogênio ligado diretamente ao boro é o responsável pela formação do hidreto, Pergantis et al. usaram reagentes deuterados. Foi observado que a reação de As (III) e As (V) com $NaBD_4$ em HCl 3 mol L^{-1} e H_2O, obteve-se como principal produto AsD_3 e quando utilizou-se $NaBH_4$ em DCl e D_2O, foi obtido como principal produto o AsH_3. Assim, os autores puderam afirmar que a

transferência do hidrogênio ligado diretamente ao boro que promove a formação da arsina.

A utilização de $NaBH_4$ possibilitou uma ampliação no número de elementos que podem ser determinados através da geração química de vapor, onde temos o Se, Bi, Ge, Pb, Sn, e Te (DEDINA, 1995). Uma série de trabalhos posteriores foi desenvolvida incluindo a determinação de novos elementos por HGAAS, como por exemplo, In (LIAO e LI, 1993), o Cd (SANZ-MENDEL et al., 1995), P (TANAKA et al.,1996), Tl (WEI e JIANG, 1999), Cu, Au, Ag e Zn (LUNA et al., 2000).

O $NaBH_4$ em meio alcalino utilizado para a formação de hidretos voláteis é mais eficiente que os precursores metálicos, possui maior reprodutibilidade nas medidas e cinética de reação mais definida, possibilitando ainda automação.

Houve uma diminuição nos sinais de As e Se, ao longo do tempo, devido a degradação da solução aquosa de $NaBH_4$ (DEDINA, 1995). Lee e Choi, em 1996 propuseram a utilização de soluções de alcalinas de NaOH ou KOH para aumentar a estabilidade do $NaBH_4$, e que devem ser preparadas pouco antes do uso. Feng et al, em 1998, perceberam que a concentração do NaOH deve ser controlada a fim de não causar supressão do sinal analítico.

Dependendo do tipo de amostra, do método espectroscópico e do sistema FIA a ser utilizado a concentração de $NaBH_4$ tem variado na literatura de 0,25% a 10% (m/v) em soluções alcalinas de NaOH que podem variar de 0,1% a 2% (m/v) (MACEDO, 2010).

3. JUSTIFICATIVA

O selênio, elemento essencial para o organismo humano, é encontrado em baixas concentrações em amostras de interesse nutricional, e seu teor considerado tóxico é apenas cem vezes maior que o seu nível de essencialidade. Devido a isso há a necessidade de se desenvolver métodos analíticos com elevada sensibilidade para a determinação e quantificação desse mineral em amostras alimentícias.

A presente proposta visa explorar as vantagens na determinação de metais e não-metais já estabelecidas da espectrometria de absorção atômica com chama para o

desenvolvimento de estratégia analítica para determinação de selênio através da formação de hidretos.

A estrutura do sistema de injeção em fluxo geralmente é formada por equipamentos de alto custo, e esse trabalho tem como objetivo a confecção de um sistema de injeção em fluxo para a geração de hidretos com materiais de baixo custo e de fácil acesso que possa substituir de forma adequada e eficiente esses equipamentos.

A escolha do tema deu-se pela facilidade de adaptação de um sistema de geração de vapor químico ao F AAS, pois este equipamento se encontra disponível na infra-estrutura do *campus* Anísio Teixeira.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico com vista a ampliar as potencialidades da técnica da Geração de Hidretos para a determinação de selênio por meio da associação da mesma com a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama combinada à Análise por Injeção em Fluxo (FIA-HG-AAS) com vistas à aplicação em amostras de interesse nutricional.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método para determinação de selênio utilizando a geração de hidretos acoplado a um F AAS com redução em linha empregando o $NaBH_4$ como agente redutor em amostra de castanha de caju;
- Otimizar as variáveis para a metodologia de geração de hidretos: Vazão do $NaBH_4$, Vazão do padrão/amostra, vazão do gás de arraste, concentração do $NaBH_4$, concentração do HCl e comprimento da bobina de reação.
- Determinar as características analíticas após o processo de otimização do método desenvolvido, como: precisão, exatidão, robustez, sensibilidade, linearidade e frequência analítica;
- Aplicar os procedimentos otimizados para a determinação das espécies químicas estudadas em amostras reais;

5. MATÉRIAIS E MÉTODOS

5.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os procedimentos de pesagem foram realizados em balança de precisão da marca Shimadzu® modelo AY220. No processo de digestão das amostras utilizou-se um forno micro-ondas da marca Provecto Analítica, modelo DGT 100 plus. A água ultrapura utilizada foi obtida através do Purificador de água – Merck Millipore Milli-Q Reference, Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama – Analytik Jena novAA300 equipado com lâmpada de cátodo oco de selênio, Bomba peristáltica Gilson® Miniplus 3 (Villiers Le Bel, França) equipada com seis canais, Moedor Cuisinart modelo DCG-20BKN.

5.2 AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de castanha de caju foram adquiridas em diversas cidades da Bahia, buscando representar o maior número possível de mesorregiões políticas do estado. A figura 4 mostra a divisão política do estado e as cidades onde ocorreram as coletas.

A amostragem foi realizada em 17 (dezessete) cidades: Barreiras representando a região Extremo Oeste, Umburanas e Juazeiro representando a região do Vale do São Francisco, Itaetê representando a região do Centro-Norte, Euclides da Cunha representando a região Nordeste, Macaúbas, Caturama, Livramento de Nossa Senhora, Tanhaçu, Vitória da Conquista e Jequié representando a região Centro-Sul, Amélia Rodrigues representando a região Metropolitana de Salvador, Valença, Camassandi, Lage, Maraú e Arraial D'ajuda representando a região Sul da Bahia. A amostragem aconteceu entre os meses de janeiro a junho do ano de 2016.

A busca foi por amostras de castanhas *in natura*, retiradas diretamente do pseudofruto do caju, que não tivessem passado por nenhum tipo de tratamento térmico, a fim de assegurar as características originais da castanha.

Figura 4. Divisão politica da Bahia em mesorregiões. Fonte: Adaptado do Wikipedia

5.2.1 Extração das castanhas

Após a coleta as amostras foram levadas ao Laboratório de Química Analítica do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal da Bahia – IMS UFBA – Campus de Vitória da Conquista. No laboratório as castanhas foram secas em estufa numa temperatura de 60°C por um período de 72 horas, após a secagem houve o processo de decorticação das castanhas para a retirada das amêndoas, que foi realizada com o auxílio de um martelo.

As figuras abaixo demonstram o processo de decorticação das castanhas.

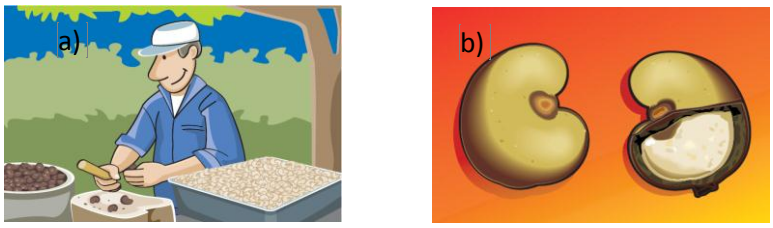

Figura 5. (a) Processo de decorticação das castanhas. (b) Retirada das amendoas. Fonte: Paiva, 2006

As amêndoas da castanha de caju foram posteriormente pulverizadas com o auxilio de um moinho de facas, para uma melhor homogeneização da amostra.

Figura 6. (a) Amêndoas após a decorticação; (b) Amêndoas pulverizadas. Fonte: Próprio autor

5.2.2 Digestão das amostras

O procedimento de digestão das amostras foi realizado por via úmida usando uma mistura de água ultrapura, ácido nítrico 65% (HNO_3) e peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) como fonte de calor utilizou-se um forno Micro-ondas com cavidade.

Vários testes foram realizamos com o objetivo de otimizar o procedimento de digestão das amostras. Os testes foram realizados com diferentes quantidades do ácido nítrico concentrado e do peroxido de hidrogênio, além da quantidade de amostra e o tempo de digestão no micro-ondas.

Adicionou-se ao frasco de digestão 0,1g da amostra da castanha pulverizada, 600 µL de H_2O, 1000 µL de HNO_3 e 600 µL de H_2O_2, nesta ordem. Os frascos foram levados ao forno micro-ondas e a digestão foi realizada em apenas 1 ciclo constituído de 3 corridas de 8 minutos com uma potência de 500w intercalados por uma corrida de 5 minutos numa potência de 0w afim de resfriar a cápsula. Após a abertura química as amostras foram avolumadas para 6,0 mL com HCl 4,0 $mol.L^{-1}$ em tubos falcon e armazenadas em refrigerador até o momento da determinação.

5.3 APRESENTAÇÃO DO SISTEMA PROPOSTO FIA-HG ACOPLADO AO F AAS

O diagrama do sistema proposto FIA-HG-F AAS para determinação de selênio é apresentado na figura 7. O sistema consiste de uma bomba peristáltica com tubos tygon®, usada para propulsionar as soluções; um reator bobinado construído com tubos de PTFE (2,0 mm d.i.) que promove a mistura entre as soluções; Tubos de PVC (1,016 e 1,52 mm d.i.) também foram usados no transporte das soluções pelo sistema; um separador gás/líquido para separar o hidreto de selênio gerado da solução que o originou; um cilindro de argônio, gás de arraste utilizado para levar o hidreto de selênio até a célula de quartzo; um fluxômetro para controle da vazão do gás de arraste; uma

célula de quartzo PerkinElmer em formato T (16 cm x 0,8 cm d.i.), usada para a atomização do analito, para o correto posicionamento da célula de quartzo sobre o queimador do F AAS foi confeccionado um suporte metálico que permite o ajuste o de altura da célula de quartzo, facilitando assim o ajuste do tubo para a correta passagem do feixe da lâmpada para a obtenção do sinal analítico.

A operacionalização do sistema foi iniciada pelo acionamento da bomba peristáltica que propulsiona, por meio de tubos tygon, um volume fixo do padrão/amostra de selênio na presença de HCl e por outro tubo era propulsionado uma solução de borohidreto de sódio 0,25%. As soluções entram em confluência quando passam juntas por um reator bobinado promovendo a formação do hidreto a partir da reação. Na sequência esta mistura reacional é dispensada num separador gás/líquido. Ao mesmo tempo em que a reação ocorre no reator bobinado, o fluxo de gás argônio é liberado dentro da mistura reacional presente no separador gás/líquido com o objetivo de impulsionar o hidreto de selênio, formado na reação, para dentro do tubo de quartzo, corretamente posicionado sobre o queimador, onde ocorre a atomização do selênio e sua subsequente atenuação do sinal analítico para a posterior quantificação. Logo após a reação se completar a solução residual do separador gás/líquido é drenada para o descarte.

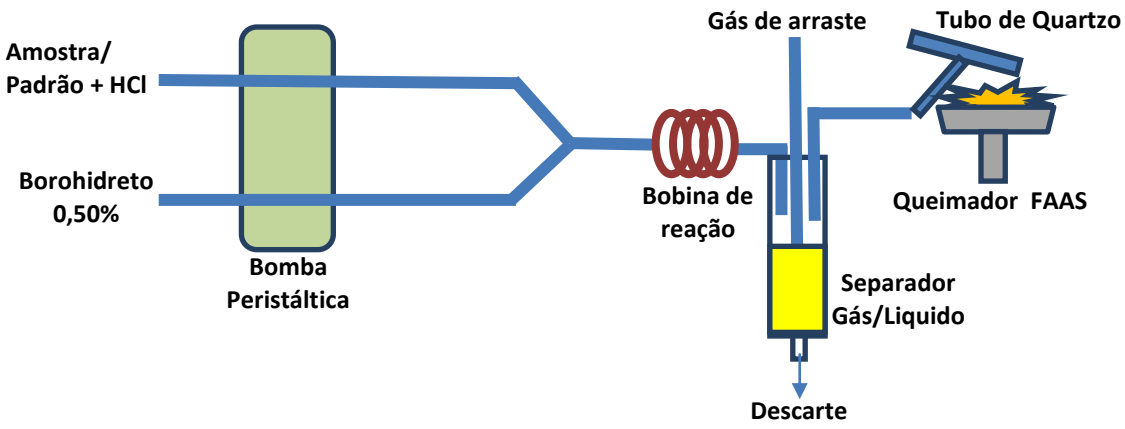

Figura 7: Diagrama esquemático do Sistema FIA-HG-F AAS proposto. Fonte: Próprio autor

As figuras 8, 9 e 10 são fotografias do sistema FIA-HG-F AAS proposto que mostram detalhes do separador gás/líquido, bobina de reação e tubo de quartzo, respectivamente.

Figura 8. Reator em bobina do sistema FIA.

Figura 9. Separador Gás/líquido do sistema FIA.

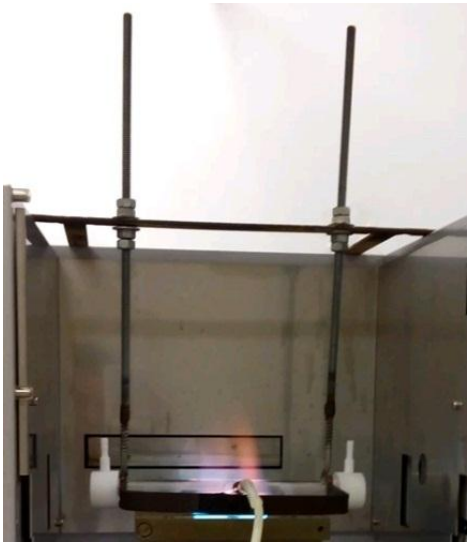

Figura 10. Suporte metálico para o tubo de quartzo do sistema FIA.

5.4 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico: peróxido de hidrogênio (Vetec®), ácido nítrico 65% (Sigma-Aldrich®), padrão de selênio para AAS 1000 mg/L, ácido clorídrico 32% (Fluka Analytical®) Borohidreto de sódio 96% (Aldrich Chemistry®), hidróxido de sódio P.A micropérolas 99% (Impex).

5.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Água deionizada proveniente de um sistema de purificação Mili-Q foi usada para o preparo de todas as soluções. As vidrarias utilizadas foram mantidas em solução de ácido nítrico a 10 % (v/v) durante 24 horas e enxaguada com água destilada.

5.5.1 Solução de NaOH 0,05 M

Pesou-se 2g de Hidróxido de Sódio (NaOH) e dissolveu-se em 100 mL água ultrapura, em seguida avolumou-se para 1000mL em balão volumétrico.

5.5.2 Solução de HCl 4 M

A solução de HCl a 4 M foi preparada através da diluição da solução padrão de HCl a 37% que é equivalente a 12 M. Para se preparar a solução a 4 M, tomou-se 196,5 mL da solução padrão e avolumou-se para 500 mL em com água ultrapura em um balão volumétrico apropriado.

5.5.3 Solução de $NaBH_4$ 0,25 % Alcalino

Pesou-se 0,25 g de Borohidreto de Sódio ($NaBH_4$) e dissolveu-se em 50 mL da solução de NaOH 0,05M em seguida avolumou-se para 100 mL em balão volumétrico apropriado.

5.5.4 Solução padrão de selênio

Todas as soluções de selênio utilizadas foram preparadas a partir de um padrão de selênio (Se^{+6}) a 1000 mg/L, onde através da retirada de diferentes alíquotas desta foram preparados os padrões avolumados sempre com HCl 4M e aquecidos a 80°C por um período de uma hora para a redução do íon Se^{+6} para o Se^{+4}.

5.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

5.6.1 Planejamento Univariado

Realizou-se o estudo das seguintes variáveis: concentração do $NaBH_4$ variando entre 0,25 e 0,75%; a vazão do padrão/amostra variando entre 3,20 e 11,40 $mL.min^{-1}$, a vazão da solução de $NaBH_4$ variando entre 1,80 e 11,40 $mL.min^{-1}$, a vazão do gás de arraste variando entre 30 e 50 $mL.min^{-1}$, o comprimento do reator em bobina variando entre 25 e 50 cm e a concentração do HCl variando entre 4,0 e 8,0 $mol.L^{-1}$.

5.7 FIGURAS DE MÉRITO

As figuras de mérito são uma exigência analítica que busca a confirmação da capacidade do método investigado em desempenhar com consistência o seu papel frente ao que se propõe.

Para a realização da validação do método analítico desenvolvido foram utilizados parâmetros analíticos como: linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, robustez entre outros que serão abordados a seguir (RIBANI, BOTTOLI, et al., 2004).

5.7.1 Linearidade

A linearidade é uma técnica de validação que mostra a capacidade de um método analítico fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico de concentração, obtidas através de padrões do analito. O intervalo corresponde à faixa entre os limites de quantificação superior e inferior.

A linearidade é expressa pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido por dados estatísticos, o valor mínimo aceitável do R2 deve ser igual a 0,99. A equação da reta ($y = ax + b$) é utilizada para se obter a resposta medida em absorbância (y), em que temos a concentração (x), a inclinação da curva de calibração (a) e a interseção com o eixo y (b) (PEREZ, 2010).

A curva de calibração para o método proposto foi realizada nas concentrações de 0 a 175 µg L-1 de selênio, com intervalo de 25 µg L-1.

5.7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

O limite de detecção determina a quantidade mínima de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado com exatidão.

Em métodos instrumentais de análise, a estimativa do LD pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base ou determinado através da relação do desvio padrão da resposta da leitura de um numero apropriado de amostras do branco com a inclinação da curva de calibração obtida a partir leitura dos padrões de concentração do analito para a obtenção da linearidade, como descreve a equação 1 (PEREZ, 2010).

Equação 1: $$LD = \frac{3\ x\ (Desvio\ Padrão)}{Inclinação\ da\ curva\ (a)}$$

O limite de quantificação expressa a menor quantidade do analito que pode ser determinada em uma amostra apresentando uma precisão e exatidão aceitável nas mesmas condições experimentais estabelecidas no método. Pode-se aplicar os mesmos critérios de LD em LQ, entretanto, considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1. O LD pode ser expresso pela Equação 2 (PEREZ, 2010).

Equação 2: $$LD = \frac{10\ x\ (Desvio\ Padrão)}{Inclinação\ da\ curva\ (a)}$$

5.7.3 Precisão

Através da avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra podemos definir a precisão do método aplicado. Pode ser expresso como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV %), conforme a Equação 3. Onde o valor máximo aceitável não deve ultrapassa 5 % (PEREZ, 2010).

Equação 3: $$RSD = \frac{Desvio\ Padrão}{Média} x100$$

5.7.4 Exatidão

A exatidão pode ser calculada através da porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do analito previamente adicionada à amostra, ou através da diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (PEREZ, 2010).

A recuperação pode ser calculada através da Equação 4. Onde (C_1) é a concentração determinada na amostra adicionada; (C_2) a concentração determinada na amostra não adicionada; e (C_3) a concentração adicionada.

Equação 4: $$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) x100$$

5.7.5 Robustez

A robustez é uma técnica que comumente utilizada para a validação de técnicas analíticas. Ela é definida como a capacidade que um experimento possui em reproduzir os mesmos resultados mesmo sofrendo variações quanto aos valores estabelecidos no processo de otimização (FERREIRA, BRUNS, et al., 2007).

Foi utilizada uma matriz de planejamento fatorial de dois níveis para a obtenção da robustez do método analisado, mostrada na Tabela 2, e também os níveis escolhidos para a suas variações, encontrados na Tabela 3.

5.7.6 Frequência Analítica

A frequência analítica expressa a quantidade de amostras que poderão ser analisadas no intervalo de tempo de 1 hora.

5.7.7 Aplicação

O método desenvolvido será aplicado em amostras de castanha de caju coletadas a partir de diferentes regiões do estado da Bahia previamente digeridas em forno micro-ondas.

Tabela 2: Matriz de planejamento de dois níveis para teste de robustez.

	[$NaBH_4$]	Vazão do $NaBH_4$	Vazão da amostra
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 3: Valores reais do ponto central, máximo e mínimo utilizados no teste de robustez.

	+	0	-
[$NaBH_4$] %	0,225	0,250	0,275
Vazão do $NaBH_4$ (mL/min)	2,90	3,20	3,50
Vazão da amostra (mL/min)	5,80	6,50	7,10

6.0 REFERÊNCIAS

ARRUDA, M. A. Z; FIGUEIREDO, E. C. Atomic spectrometry based on metallic tube atomizers heated by flame: Innovative strategies from fundamentals to analysi, **Spectrochimi Acta Part B.** 477–481, 2009.

ANSTRON, O. Flow injection analysis for the determination of bismuth by atomic absortion spectometry with hydride generation, **Anal. Chem.** 190, 1982.

BRAMAN, R. S.; JUSTEN, L. L.; FOREBACK, C. C.; **Anal. Chem**. 44, 2195, 1972.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº269. **Dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.** Publicado no Diário Oficial da União no dia 22 de setembro de 2005. Brasília, DF, 2005.

BISINOTI, M. C. et al. Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio. **Quím. Nova [online]**. vol.29, n.6, pp.1169-1174. ISSN 0100-4042, 2006

BREZINSKI, D. Health Benefits of Selenium. **PHD on NOVEMBER 12**, 2013.

BROWN, R.; GRAY, D.J.; TYE, D. **Water Air Soil Pollut** 80: 1237. doi:10.1007/BF01189787, 1995.

CHEN, X.; YANG, G.; CHEN, J. **Biol Trace Elem Res** 2: 91. doi:10.1007/BF02798589, 1980.

CHU, R. C.; BARRON, G. P.; BAUMGARNER, P. A. **Anal. Chem**. 44, 1476, 1972.

COELHO, N. M. M. **Pré-concentração e determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica com geração de Hidretos em um sistema de análise por injeção em fluxo**. Tese de doutorado, Instituto de química, UNICAMP, São Paulo. Brazil, 1995.

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

COMINETTI, C.; COZOLLINO, S. M. F. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes – Selênio, **ILSI**, Brasil, 2009.

CRISPINO, C. C. **Determinação de As, Sb e Se em material agronômico por espectrometria de emissão óptica acoplada a plasma induzido com geração de hidretos (HG-ICP-OES)**. Dissertação de Mestrado, UFSC, São Carlo, SP, 2005.

DA SILVA, J. P. R. et al. **Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para pré concentração de cd sobre resina de xad-4 modificada com fenilfluorona e determinação por espectrometria de absorção atômica**. Quim. Nova, Vol. 39, No. 5, 561-566, 2016.

DEDINA, J.; TSALEV, D. L.; **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**, John Wiley & Sons: New York, 1995.

DITTRICH, K.; FRANZ, T.; WENNRICH, R. Simultaneous determination of hydride forming elements by furnace atomic nonthermal excitation spectrometry (FANES). **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy** 50 1655 – 1667, 1995.

D'ULIVO, A. Chemical vapor generation by tetrahydroborate (III) and other borane complexes in aqueous media - A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation, **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy** 59 793 – 825, 2004.

DUNDAR, M. S.; ALTUNDAG, H. Selenium content of Turkish hazelnut varieties: Kara Fındık, Tombul and Delisava. **Journal of Food Composition and Analysis** 17, 707–712, 2004.

FENG, Y. L. et al. Off-Line Separation and determination of inorganic arsenic species in natural water by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry with hydride generation combined with reaction of arsenic (V) and L-cysteine, **Analytica Chimica Acta**, 375, 167 – 175, 1998.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica [online]**. vol.11, n.3, pp.172-177. ISSN 1680-5348. http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892002000300006, 2002.

FIGUEREDO, E. C. **Ampliando a potencialidades de geração de hidretos**. Dissertação (Mestrado), UNICAMP, São Paulo. Brazil, 2005.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Rev. Nutr.**, Campinas, 23(2):269-279, mar./abr., 2010.

GARRIDO, M. L.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, C. J.; J. **Anal. At. Spectrom.** 13, 295, 1998.

GARRIDO, M. L.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, C. J.; J. **Anal. At. Spectrom.** 13, 1145, 1998.

GASPAR, A.; BERNDT, H. Thermospray Fame Furnace Atomic Absorption Spectrometry (TS-FF-AAS) – ca simple method for trace element determination with microsamples in the µg L concentration range, **Spectrochimica Acta Part B** 55, 587-597, 2000.

HATCH, W. R.; OTT, W. L. **Anal. Chem**. 40, 2085, 1968.

HERSHEY, J.W.; KELIHER, P.N. Observations on Arsenic and selenium Determinations Using Hydride Generation Atomic Absorption and/or Plasma Emission Spectrometry. **Appl Spectrosc. Rev.**, 25, 213-228, 1989-90.

HOLAK, W.; Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry. **Anal. Chem**. 41, 1712, 1969.

JUNIOR, A. G. **Determinação de selênio subterrânea utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafita (GFAAS) e geração de hidretos (HGAAS)**. Dissertação (Mestrado), USP, São Paulo, 2008.

LEE, D. K.; CHOI, B. S. Effect of hydrochloric acid concentrations on the hydride generation efficiencies in ICP-AES, **Bulletin of the Korean Chemical Society** 17, 964 -966, 1996.

LIAO, Y.; LI, A. **J. Anal. At. Spectrom.** 8, 633, 1993.

LIVERSAGE, R. R.; VAN LOON, J. C.; ANDRADE, J. C. A flow injection/hydride generation for the determination of arsenic by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, **Anal. Chem. Acta** 161, 275, 1984.

LUNA, A. S.; STURGEON, R. E.; CAMPOS, R. C. **Anal. Chem**. 72, 3523, 2000.

LUNA, A. S. **Expandindo as fronteiras da geração química de vapor [recurso eletrônico]: medidas de arsênicos, cádmio, cobre, ouro, prata e zinco por absorção atômica no tubo de quartzo após a redução dos íons aquosos com tetrahidroborato de sódio**. Tese (Doutorado), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

KRENZELOK, M.; RYCHLOVSKY, P. Comparison of hydride generation/ gas-liquid phase separator system for continuos hydride generation in atomic absorption spectrometry, **Collect. Czech. Chem. Commun**. 63, 164, 1998.

MACEDO, S. M. **Estratégias analíticas para a analise de especiação de arsênio, antimônio e selênio em amostras ambientais usando amostragem por suspenção e HG AAS**. Tese (Doutorado), Instituto de química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 2010.

MAHAN, B. H. Química — um curso universitário. **Editora Edgard Blücher Ltda**, 2a ed. São Paulo, Brasil, 1975.

MATUSIEWICZ, H. Atom trapping and in situ preconcentration techniques for flame atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B** 52 1711–1736, 1997.

MELO, M.L.P. et al. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (anacardium occidentale l.) crua e tostada. **Ciênc. Tecnol. Aliment. [online].** vol.18, n.2, pp.184-187. ISSN, 1998.

MOREIRA, M. B. **Determinação de selênio em peixes do rio Madeira por voltametria de redissolução catódica**. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília. Brasília, 1994.

MORETTO, A. L. **Determinação de arsênio por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos em sistema de injeção em fluxo**. Tese de Doutorado, Unicamp, SP, 2001.

NAKAHARA, T. **Spectrochim. Acta Rev.** 14, 95, 1991

NAKAHARA, T. **Prog. Anal. At. Spectrosc**. 6, 163, 1983.

NAKAHARA, T. **Development of Gas-Phase Sample-Introduction Techniques for Analytical Atomic Spectrometry.** Analytical Sciences, Vol. 21. p. 477-484, 2005.

OLDFIELD, J. E. Selenium word atlas (Update edition). **Selenium-Tellurium Development Association (STDA)**, 2002.

PAHLAVANPOUR, B.; THOMPSON, M.; THORNE, L. Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony and bismuth in soils and sediments by volatile hydride generation and inductively coupled plasma emission spectrometry. **Analyst**, v. 105, n. 1253, p. 756-761, 1980.

PAIVA, F. F. de A. Processamento da castanha de caju, **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF, 2006.

PEREIRA, M. G.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in Preconcentration Procedures for Metal Determination Using Atomic Spectrometry Techniques , **Microchim. Acta** 141, 115–131, 2003.

PERGANTIS, S. A. et al. Investigation of arsine-generating reactions using deuterium-labeled reagents and mass spectrometry, **Talanta** 44, 1941-1947, 1997.

PEREZ, M. A. F. **Validação de métodos analíticos: como fazer? Por que ela é importante**. Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens. Vol. 22. N°3 ITAL. 2010.

PETRUCELLI, G. A. et al. "Tube atomizers in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: Characterization using X-ray fluorescence, scanning electron microscopy and chemometrics," **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** 21, 1298–1304, 2006.

POLUEKTOV, N. S.; VITKUN, R. A. **Zh. Anal. Khim**, 18, 33, 1963.

POLUEKTOV, N. S.; VITKUN, R. A.; ZELYUKOVA, Y. A.; **Zh. Anal. Khim**, 19, 937, 1964.

PREDA, C. et al. **Environmental Engineering and Management Journal** 15, 4, 913-921, 2016.

RIBEIRO, A. S.; ARRUDA, A. Z.; CADORE, S. A. Quartz tube atomizer with tungsten coil: new system for vapor atomization in atomic absorption spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom.** 17, 1, 2002.

RODRIGUES, A. C. et al. Quantificação de Selênio e Zinco em frutos oleaginosos. **52° Congresso Brasileiro de Química**. Recife-PE, 2012.

ROSSI, N. L. C.; CARAPELLI, R.; NOGUEIRA, A. R. de A. Estratégias de preparo de amostra de carne bovina para a determinação de selênio com a utilização de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos. **Jornada Científica-Embrapa São Carlos**, São Carlos, SP, 2009.

RUSICKA, J.; HANSEN E. H., Flow injection analysis, **Jonh Wiley e Sons, New York**, 1981.

SANZ-MEDEL, A.; et al. **Anal. Chem**. 67, 2216, 1995.

SILVA, L. O. B. **Estratégias analíticas para determinação de cobre e cádmio em amostras ambientais empregando espectrometria de absorção atômica com geração de vapor químico.** Salvador- BA. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia- UFBA, 2016.

SOUZA M.L.; MENEZES H.C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciênc Tecnol Aliment**. 24 (1):120-8. doi: 10.1590/S0101-20612004000100022, 2004.

TANAKA, T.; et al. **Anal. Sci**. 12, 77, 1996.

TAKASE, I.; et al. Geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, Vol. 25, No. 6B, pg. 1132-1144, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; et al. Consumo de antioxidantes em participantes do ELSA-Brasil: resultados da linha de base. **Rev. bras. epidemiol. [online]**. vol.19, n.1, pp.149-159. ISSN 1415-790X. http://dx.doi.org/10.1590/1980-5497201600010013, 2016.

THOMPSON, M. et al. Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tellurium in aqueous solution by introduction of the gaseous hydrides into an inductively coupled plasma source for emission spectrometry. Part I. **Preliminary studies. Analyst**, 103(1227), 568-579, 1978.

VALCARCEL, M.; CASTRO, M. D. L. Continuous separation techniques in flow injection analysis : A review, **Journal of Chromatography**, 393, 3-23, 1987.

VIARO, R. S.; VIARO, M. S.; FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciên. Biol. e da Saúde**, Santa Maria, v.2, n.1, p.17-21, 2001.

VIEIRA, M. A. et al. Determination of Hg and Se in biological materials by chemical vapor generation electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry using isotope dilution calibration after microwave-assisted digestion with Aqua Regia. **J. Braz. Chem. Soc. [online].** vol.17, n.5, pp.923-928. ISSN 0103-5053, 2006.

VOLP, A. C. P. et al. Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica. **Rev. Nutr. [online].** vol.23, n.4, pp.581-590. ISSN 1678-9865. , 2010.

WATLING, R.J. Use of a slotted tube for determination of lead, zinc, cadmium, bismuth, cobalt, manganese, and silver by atomic– absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta** 97, 395–398, 1978.

WEI, M. T.; JIANG, S-J.; **J. Anal. At. Spectrom**. 14, 1177, 1999.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, 42, 1573-1580, 2009.

7.0 ARTIGO

Desenvolvimento de métodos analíticos usando a geração de hidretos acoplada ao F AAS para determinação de selênio

Andrade, Rafael França [a];Souza, Anderson Santos*[a]

[a]*Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Universidade Federal da Bahia, 45.029-094 Vitória da Conquista (BA), Brazil*

*Autor para correspondência

Endereço de e-mail: andsouza@ufba.br;andsouza@pq.cnpq.br (A.S. Souza)

Resumo

Na busca por desenvolver um método analítico sensível, preciso e de baixo custo para a determinação de selênio foi proposta a análise por injeção em fluxo para a geração de hidretos acoplada a espectrometria de absorção atômica (FIA-HG-AAS). O sistema de Injeção em fluxo foi construído com materiais de baixo custo e se mostrou muito eficiente para a geração de hidretos e a posterior quantificação através do espectrômetro de absorção atômica. Foi feito um estudo das variáveis vazão do borohidreto de sódio, Vazão do ácido clorídrico (HCl), Vazão do gás de arraste, concentração do borohidreto de sódio, concentração do HCl e comprimento da bobina de reação que foram consideradas significativas para o desenvolvimento do método. Para validar o método analítico desenvolvido foram utilizados parâmetros analíticos em que foram obtidos os seguintes resultados, o limite de detecção de 2,52 $\mu g.L^{-1}$ e um limite de quantificação de 8,41 $\mu g.L^{-1}$ com uma frequência analítica de até 60 determinações por hora, a precisão do método foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD) em padrões de concentração 25,0 $\mu g.L^{-1}$ igual a 4,6% e para a concentração de 150 $\mu g.L^{-1}$, foi de 3,3%. O método proposto foi aplicado em amostras de castanha de caju de diferentes cidades do estado da Bahia a fim de avaliar a concentração de selênio em castanhas cultivadas em diferentes regiões do estado. Quatro amostras foram analisadas, e a concentração de selênio encontrada variou de 9,9 µg a 28,7 µg. A validação do método foi realizada através de teste de adição e recuperação de concentrações conhecidas de selênio em amostras de agua coletadas no rio Paraguaçu na cidade de Itaetê-Ba, foram obtidas recuperações quantitativas na faixa de 101,2% a 108,7% em concentrações de 25,0 $\mu g.L^{-1}$ e 50,0 $\mu g.L^{-1}$ de selênio respectivamente.

Palavras-chave: Selênio, geração de hidretos, injeção em fluxo, castanha de caju.

1. Introdução

O selênio é um oligoelemento que está presente em alguns alimentos como castanha-do-brasil, rim bovino, frango, peixes e ovos, e sua concentração varia de acordo com a região em que esse alimento é cultivado, pois sua concentração no solo gera um ciclo que afeta as plantas e os animais que se alimentam destas[1].

A essencialidade desse elemento em humanos foi comprovada a partir da evolução de um paciente com distrofia muscular após a suplementação a base de selênio. Outra evidencia foi a descoberta da doença de Keshan, em solos pobres em selênio em algumas regiões da China[2].

Oldfiel em 1987 comprovou a partir de estudos que o selênio apresenta função anticarcinogênica, além de diversos outros benefícios estudados por outros pesquisadores[3]. Porém, seu nível considerado tóxico para o organismo é apenas 100 vezes maior do que a concentração essencial - Índice de Ingestão Diária (IDR) – segunda a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA – é de apenas 34 µg[4], e o excesso de selênio no organismo humano pode favorecer o aparecimento de doenças relacionadas como também a fragilidade de unhas e cabelo, alterações gastrointestinais, fadiga e alterações do sistema endócrino, entre outros fatores[1].

Devido a essa pequena diferença de concentração no organismo entre a essencialidade e toxicidade do selênio e aos baixos níveis de selênio encontrados em alimentos e outras matrizes que se busca a cada dia métodos mais sensíveis e precisos para a determinação desse mineral[5]. Dentre vários métodos utilizados para essa determinação, podemos citar a espectrometria de absorção atômica por forno de grafite[6], espectrometria de fluorescência atômica[7,8] e molecular, além da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado[9, 10, 11].

A geração de hidretos é uma técnica de introdução da amostra que tem sido muito utilizada, acoplada a vários métodos de detecção, na qual, a técnica mais utilizada é a espectroscopia de absorção atômica. A geração de hidretos apresenta varias vantagens em relação à introdução direta da amostra através da nebulização, juntamente com um sistema de injeção em fluxo, fornece um aumento na

sensibilidade da absorção atômica, além de um baixo custo e a facilidade acoplamento e automação[12].

Neste aspecto, esse trabalho propôs o desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para a geração de hidretos e a posterior detecção do analito através da espectrometria de absorção atômica com o confinamento do hidreto gerado em um tubo de quartzo posicionado sobre o queimador do F AAS para a determinação de selênio em amostras ambientais e alimentícias.

Experimental

Instrumentação

As medidas de absorvância foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama, Analytik Jena®, modelo novAA300, equipado com lâmpada de cátodo oco de selênio e lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo. As leituras foram realizadas em 196 nm com abertura da fenda 0,8 nm e corrente de lâmpada de 7,0 mA, usando um queimador para chama ar-acetileno.

O sistema em fluxo foi desenvolvido usando uma bomba peristáltica Gilson® Miniplus 3 (Villiers Le Bel, França) equipada com seis canais; Tubos Meinhard® de PVC (1,016 e 1,52 mm d.i.) ; tubos de PTFE (2,0 mm d.i.); cilindro de gás argônio; fluxômetro; célula de quartzo PerkinElmer em formato T (16 cm x 0,8 cm d.i.), suporte metálico para o posicionamento do tubo de quartzo sobre o queimador, produzido de maneira artesanal, e um separador gás/líquido produzido de maneira artesanal usando uma seringa de polietileno com capacidade 60 mL.

A digestão das amostras foi realizada em um forno micro-ondas da marca Provecto Analítica, modelo DGT 100 plus e a água ultrapura utilizada foi obtida através do Purificador de água – Merck Millipore Milli-Q Reference.

Amostragem

As amostras de castanha de caju in natura foram coletadas em quatro diferentes cidades da Bahia (Vitória da Conquista, Macaúbas, juazeiro e Umburanas) na busca de avaliar a concentração de selênio de amostras cultivadas em diferentes regiões.

Preparo das amostras

Após a coleta as amostras foram colocadas para secar em estufa numa temperatura de 60°C por um período de 72 horas, após a secagem houve o processo de decorticação das castanhas para a retirada das amêndoas, realizada com o auxilio de um martelo e posteriormente pulverizadas com o auxilio de um moinho de facas, para uma melhor homogeneização da amostra.

As amostras de castanha de caju coletadas passaram por um procedimento de digestão realizado por via úmida usando uma mistura de 600 µL água ultrapura, 1000 µL de ácido nítrico 65% (v/v) e 600 µL peróxido de hidrogênio 30% (v/v) para uma massa de 0,1 g da amostra. Como fonte de calor utilizou-se um forno Micro-ondas com cavidade com 1 ciclos de 3 steps de 8 min intercalados com *step's* de resfriamento. Após a abertura química as amostras foram avolumadas para 6 mL com HCl 4,0 $mol.L^{-1}$ em tubos falcon e armazenadas em refrigerador até o momento da determinação por um período de 48 hrs.

Reagentes e Padrões

As soluções utilizadas foram preparadas com água ultra-pura (18.2 $M\Omega\ cm^{-1}$), e reagentes de grau analítico. As vidrarias usadas, e outros materiais, foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO_3 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich®) durante 24 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura.

Ácido nítrico 32% (v/v) (Sigma-Aldrich®) e peróxido de hidrogênio 30% (v/v) (Vetec®). Estas soluções foram usadas para digestão das amostras.

A solução de $NaBH_4$ 0,25 % (m/v) (Aldrich Chemistry®) foi preparada em NaOH 0,05 $mol.\ L^{-1}$ (Impex®). Esta solução foi preparada diariamente.

A solução de HCl 4 $mol.L^{-1}$ foi preparada através da diluição da solução padrão de HCl a 32% (Fluka Analytical®).

A solução estoque de selênio VI 1000mg/L foi adquirida da Sigma-Aldrich®. Todas as soluções de selênio utilizadas foram preparadas a partir deste padrão de selênio através da retirada de diferentes alíquotas da solução padrão para a preparação dos padrões desejados, avolumados sempre com HCl 4 $mol.L^{-1}$.

Procedimento analítico

O procedimento analítico para determinação de Se requereu uma pré-redução da espécie de selênio VI para Selênio IV antes da formação do hidreto. A pré-redução consistiu em adicionar à solução padrão/amostra 417 µL de HCl 32 % e avolumar para 6 mL para obter uma solução em uma concentração de 4 $mol.L^{-1}$ que foi posteriormente aquecida em Banho Maria por 60 min. à 80ºC.

Conforme o esquema apresentado na Figura 1, três mililitros da amostra/padrão acidificada com HCl 4,0 $mol.L^{-1}$ foram impulsionados por uma bomba peristáltica através de tubos tygon, assim como a solução de $NaBH_4$ 0,25% (m/v) em NaOH 0,05 $mol.L^{-1}$. As vazões das soluções foram 6,50 e 3,20 $mL.min.^{-1}$, respectivamente. Ao chegarem à bobina de reação, por meio dos tubos de polietileno que compõem o sistema, entram em confluência, aumentando a velocidade de reação para formação o hidreto desejado. Posteriormente, o hidreto de selênio gerado foi separado da fase líquida através de um separador gás/liquido e foi carreado para o tubo de quartzo com o auxílio de um fluxo de argônio, controlado por um regulador de fluxo de gás, posicionado sobre o queimador do F AAS.

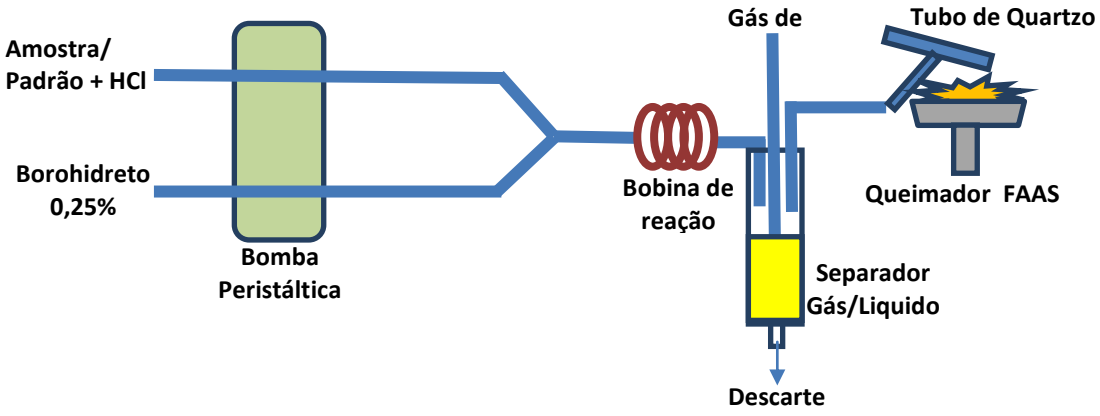

Figura 1. Representação esquemática do sistema de FIA HG AAS proposto para a determinação de selênio.

Resultados e discussão

A avaliação das condições experimentais para a determinação de selênio utilizando o sistema FIA HG AAS foi realizada através de um planejamento experimental univariado, e os fatores avaliados foram: concentração do $NaBH_4$, concentração do HCl, vazão do padrão/amostra, vazão do $NaBH_4$, vazão do gás de

arraste e comprimento da bobina de reação. A solução padrão de selênio utilizada para este estudo foi 20 $\mu g.L^{-1}$, utilizando sempre um volume fixo de 3,0 ml para cada padrão/amostra e $NaBH_4$ suficiente para que a reação ocorresse completamente.

Estudo dos fatores dependentes do método

A concentração do $NaBH_4$ deve ser otimizada para que se possa conhecer as melhores condições para a formação do hidreto, que é essencial para o sistema, como pode ser visto nas equação abaixo:

$$NaBH_4 + H_3O^+ + 2H_2O \rightarrow \text{intermediários} \rightarrow H_3BO_3 + H_2 \quad (1)$$

$$NaBH_4/\text{intermediários} + A \rightarrow AH_n \quad (2)$$

A: representa a espécie de interesse.

Dessa forma, a concentração do $NaBH_4$ foi investigada na faixa de 0,25% a 0,75%. Os resultados de absorvância obtidos a partir da leitura do padrão ácido de selênio na concentração de 20,0 $\mu g.L^{-1}$ estão apresentados na figura 2.

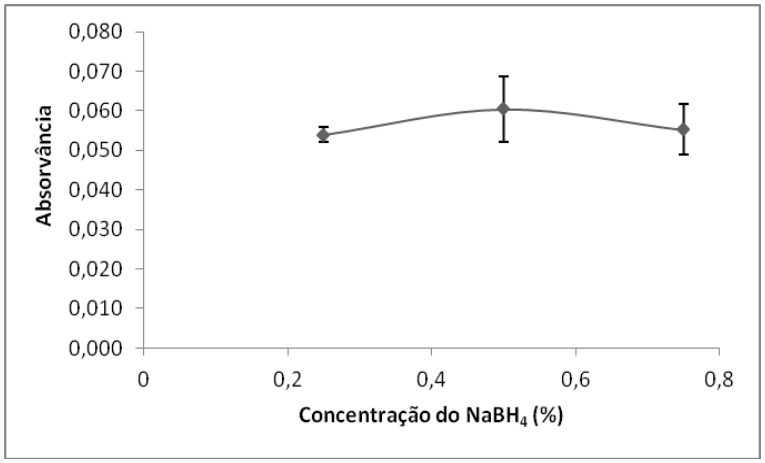

Figura 2. Estudo do efeito da concentração do $NaBH_4$.

Condições experimentais: Concentração do HCl: 6,0 $Mol.L^{-1}$, Bobina da reação: 25 cm, Vazão do $NaBH_4$: 3,20 $mL.min^{-1}$, Vazão do padrão/amostra: 6,50 $mL.min^{-1}$, Vazão do gás de arraste: 40 $ml.min^{-1}$.

O teste T de *student* foi aplicado aos resultados obtidos e percebeu-se que não há variação significativa entre os valores de absorvância para as diferentes concentrações de borohidreto de sódio, em nível de confiança de 95%. A concentração de 0,25% foi escolhida para continuidade do trabalho, pois, nessa concentração pode se observar uma

maior repetibilidade dos resultados. Quanto maior a concentração de borohidreto de sódio, maior será a quantidade de hidrogênio, o excesso de hidrogênio pode ocasionar uma maior perturbação no sistema causando uma diluição do hidreto na célula de quartzo além uma variação no sinal analítico, gerando maiores valores de desvio padrão. Podemos ainda levar em consideração um menor consumo de reagentes ao se escolher uma menor concentração de $NaBH_4$ para a realização dos experimentos.

O HCl foi utilizado na redução do Se(VI) a Se(IV) seguido de aquecimento em banho-maria por 1 hora em uma temperatura de 80°C. A concentração do HCl foi avaliada utilizando concentrações na faixa de 4 a 8 $mol.L^{-1}$.

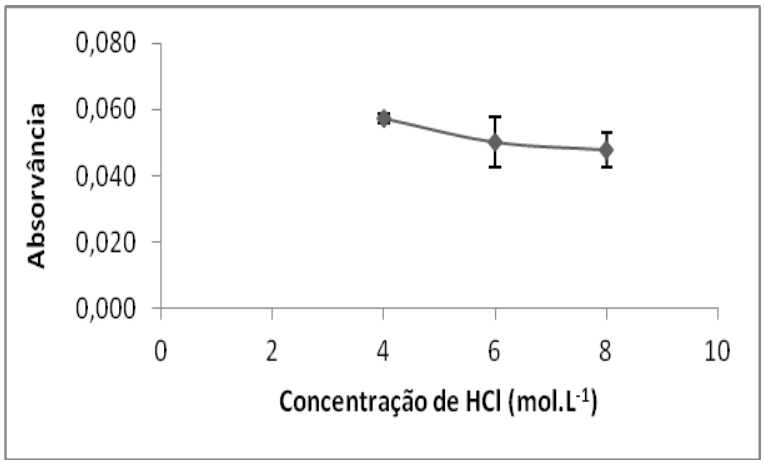

Figura 3. Efeito da concentração do HCl

Condições experimentais: Concentração do $NaBH_4$: 0,25% (m/v), Bobina da reação: 25 cm, Vazão do $NaBH_4$: 3,20 $mL.min^{-1}$, Vazão do padrão/amostra: 6,50 $mL.min^{-1}$, Vazão do gás de arraste: 40 $ml.min^{-1}$.

A partir dos resultados obtidos para o estudo da concentração do HCl apresentados na figura 3 observou-se que não houve variação significativa do sinal analítico para as diferentes concentrações estudadas, o que foi confirmado através do teste T de *Student*, em um nível de confiança de 95%. Desta forma, foi escolhida, para os estudos posteriores, a concentração do ácido clorídrico de 4,0 $mol.L^{-1}$. A escolha da menor concentração também pode ser justificada pelo menor consumo de reagentes.

Para o estudo da influência da vazão da amostra sobre o sistema foi aplicada vazões na faixa de 1,8 a 11,4 $mL.min^{-1}$. A variação das vazões foram realizadas através do aumento da rotação da bomba peristáltica. A figura 4 apresenta o resultado para o estudo da vazão da amostra. Observa-se um aumento do sinal analítico ao se aumentar a

vazão de 1,8 a 6,5 mL.min^{-1}. Contudo, após a vazão de 6,5 mL.min^{-1} o sinal analítico apresenta um decréscimo.

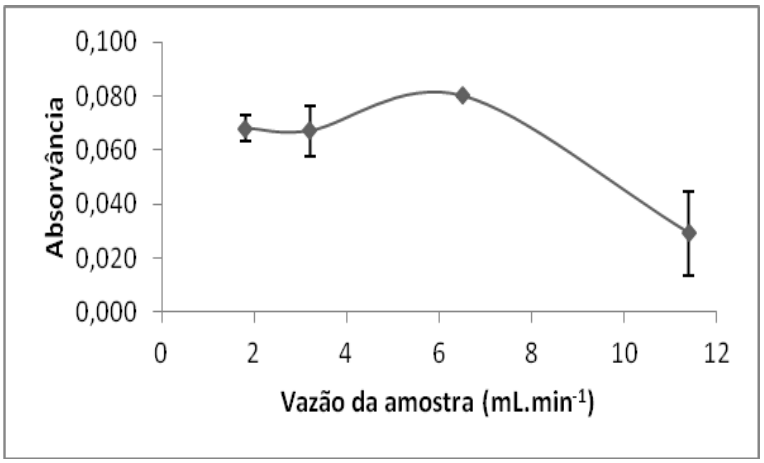

Figura 4. Estudo da vazão do padrão/amostra.

Condições experimentais: Concentração do HCl: 4,0 Mol.L^{-1}, Concentração do $NaBH_4$: 0,25% (m/v), Bobina da reação: 25 cm, Vazão do $NaBH_4$: 3,20 mL.min^{-1}, Vazão do gás de arraste: 40 ml.min^{-1}.

Esta diminuição no sinal é esperada porque em elevadas vazões ocorre diminuição do contato entre o padrão/amostra e a solução redutora no momento da reação na bobina, reduzindo assim a quantidade de hidretos que podem ser formados, consequentemente ocorre a redução da quantidade de átomos de selênio no momento da determinação. A vazão de 6,5 mL.min^{-1} foi escolhida pois além de apresentar a maior atenuação do sinal analítico, também apresentou o menor desvio padrão entre os dados.

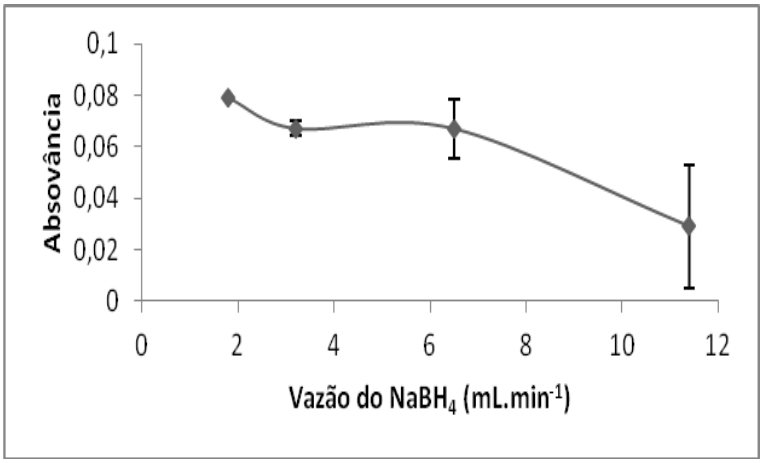

Figura 5. Estudo da vazão do $NaBH_4$.

Condições experimentais: Concentração do HCl: 4,0 Mol.L^{-1}, Concentração do $NaBH_4$: 0,25% (m/v), Bobina da reação: 25 cm, Vazão do padrão/amostra: 6,50 mL.min^{-1}, Vazão do gás de arraste: 40 ml.min^{-1}.

O efeito da vazão do $NaBH_4$ sobre o sistema FIA, foi testado no intervalo de 1,8 a 11,40 para $mL.min^{-1}$, através de diferentes diâmetros dos tubos tygon® usados na propulsão das soluções, como mostra a figura 5,

Com base nos resultados obtidos neste estudo, observou-se que quanto maior a vazão do $NaBH_4$ no sistema, menor é o valor da absorvância obtido na determinação do selênio. Isso acontece pelo fato de que quanto maior a vazão do $NaBH_4$, maior será o volume da solução redutora no sistema, isso faz com que se tenha um aumento considerável de gás hidrogênio, diminuindo a resposta obtida, devido a uma possível diluição do hidreto de selênio no tubo de quartzo. Desta forma, escolheu-se a vazão, para o borohidreto de sódio, de 3,20 $ml.min^{-1}$ como vazão ótima para a continuidade do trabalho, visando também um menor consumo de reagentes.

A avaliação da influência da vazão do gás de arraste, responsável por aumentar a pressão interna no separador gás/liquido impulsionando o hidreto gerado até o tubo de quartzo, foi estudada na faixa entre 30 e 50 $mL.min^{-1}$, com o auxilio de um fluxômetro, acoplado ao sistema desenvolvido, para o maior controle da vazão do gás de arraste.

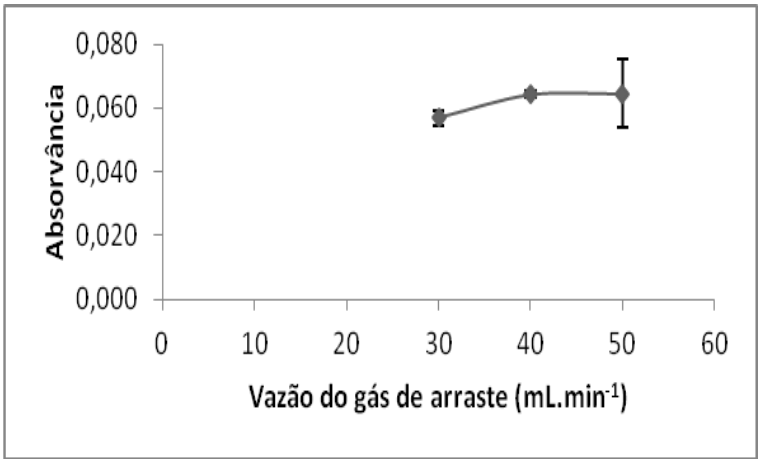

Figura 6. Estudo da vazão do gás de arraste.

Condições experimentais: Concentração do HCl: 4,0 $Mol.L^{-1}$, Concentração do $NaBH_4$: 0,25% (m/v), Bobina da reação: 25 cm, Vazão do padrão/amostra: 6,50 $mL.min^{-1}$, Vazão do $NaBH_4$: 3,20 $mL.min^{-1}$.

A partir dos resultados obtidos neste experimento foi escolhida a vazão de 40,0 $mL.min^{-1}$, visto que as respostas obtidas não apresentaram variação significativa, verificado através de uma análise de significância por meio do teste T de *Student*. A

escolha da vazão se deu através da análise do desvio padrão das absorvâncias, em que na vazão de 40,0 $mL.min^{-1}$ observou-se uma maior repetibilidade dos resultados.

O comprimento da bobina de reação foi estudo a partir de dois comprimentos distintos, 25,0 e 50,0 cm. Verificou-se que o se aumentar da bobina de reação ocorre uma diminuição do sinal analítico, visto que há um aumento considerável no tempo de residência da mistura reacional na bobina, o que pode desfazer o hidreto gerado antes mesmo de chegar ao separador gás líquido[13], fazendo também com que haja uma diminuição na frequência analítica do método. Sendo assim, preferiu-se trabalhar com a bobina reacional em um comprimento de 25,0 cm.

Características analíticas do método proposto

A curva de calibração externa foi construída para as concentrações de selênio de 25,0 a 175,0 $\mu g.L^{-1}$ obtendo um coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,9975 e a equação da reta é y = 0,0043x - 0,015, em que y representa o valor da absorbância e x representa a concentração de selênio. A precisão do método foi avaliada, através do desvio padrão relativo (DPR) para a concentração de 25,0 $\mu g.L^{-1}$, foi de 4,6% (n=10) e para a concentração de 150,0 $\mu g.L^{-1}$, foi de 3,3% (n=9). O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados, e são respectivamente 2,5 $\mu g.L^{-1}$ e 8,4 $\mu g.L^{-1}$ (n=18). A frequência analítica do método é de 60 determinações por hora.

Para avaliar se o método proposto é capaz de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos foi investigada a robustez. A robustez foi avaliada usando um planejamento fatorial de dois níveis para três variáveis, totalizando onze experimentos. Os níveis escolhidos para este estudo foram aplicados com base nas variáveis significativas, fazendo variar os valores de concentração do $NaBH_4$, vazão do $NaBH_4$ e vazão do padrão/amostra em ± 10 %, os níveis escolhidos são mostrados na tabela 1.

Através da análise do gráfico de Pareto, figura 8, foi observado que o sistema proposto é robusto para uma variação de ± 0,025% na concentração de $NaBH_4$, ± 0,32 $mL.min^{-1}$ na vazão de $NaBH_4$ e ± 0,65 $mL.min^{-1}$ na vazão da amostra, tendo em vista que o *p* valor é menor que 0,05.

Tabela 1. Matriz de Planejamento fatorial 2^3 para Concentração de $NaBH_4$, vazão do $NaBH_4$ e vazão da amostra.

Experimentos	[$NaBH_4$] %	Vazão do $NaBH_4$ $mL.min^{-1}$	Vazão da amostra $mL.min^{-1}$
1	0,275	3,50	5,80
2	0,225	3,50	5,80
3	0,275	2,90	5,80
4	0,225	2,90	5,80
5	0,275	3,50	7,10
6	0,225	3,50	7,10
7	0,275	2,90	7,10
8	0,225	2,90	7,10
9	0,250	3,20	6,50
10	0,250	3,20	6,50
11	0,250	3,20	6,50

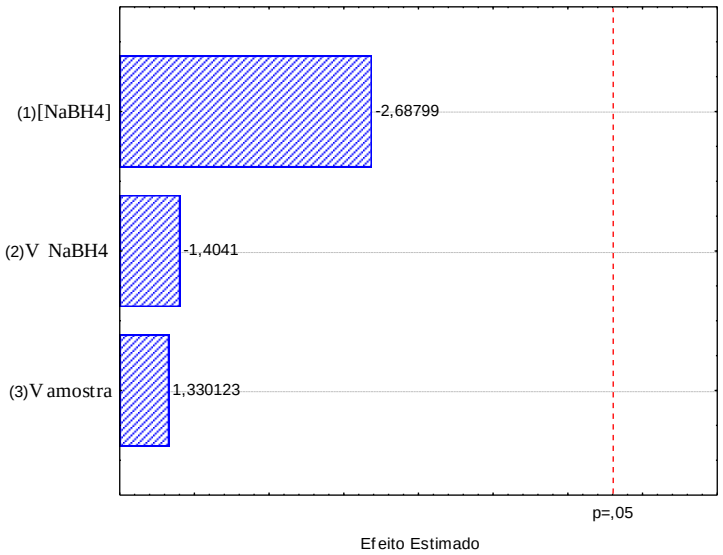

Figura 7. Gráfico de Pareto utilizado na interpretação da robustez do método analítico

Foram realizados ensaios de adição e recuperação de concentrações conhecida do padrão de selênio a fim de avaliar a exatidão do método proposto. Consiste na recuperação de quantidades conhecidas do analito após a adição de quantidade

conhecidas em amostras, para a posterior determinação. A recuperação do selênio através da aplicação em amostras de água do Rio Paraguaçú na cidade de Itaetê-Ba, em que foram adicionados 25 e 50 $\mu g.L^{-1}$ de selênio. A tabela 2 mostra os resultados obtidos, em que houve uma recuperação maior que 100% nas determinações de selênio.

Tabela 2. Ensaio de recuperação de Se^{+4}

Amostra	Se adicionado ($\mu g\ L^{-1}$)	Se encontrado ($\mu g\ L^{-1}$)	Recuperação (%)
Água	0,00	0,67	---
	25,00	25,86 (± 1,38)	108,7
	50,00	55,00 (± 2,24)	101,2

n=4

Análise das amostras de castanha de caju

O sistema desenvolvido foi aplicado em amostras de castanhas de caju de cidades de diferentes regiões do estado da Bahia. A tabela 3 mostra a concentração de selênio encontrada em cada amostra de castanha de caju analisada evidenciando uma variação na concentração de Se de região para região. A composição do solo de cada região pode ser um fator que contribua para que as castanhas de caju possuam diferentes concentrações de selênio[1].

Tabela 3. Resultado da concentração de Se obtida nas amostras de castanha de caju coletadas em municípios da Bahia.

Amostra	Cidade	Concentração (µg/100g)
1	Vit. da Conquista	13,4 ± 1,55
2	Macaúbas	13,8 ± 1,57
3	Juazeiro	28,7 ± 2,29
4	Umburanas	9,9 ± 0,96

n=4

Conclusão

O método desenvolvido e validado neste estudo usando a análise por injeção em fluxo para a geração de hidretos acoplado a espectrometria de absorção atômica se mostrou simples e de fácil operação, além do baixo custo quando comparado a

equipamentos convencionais utilizados para a geração de hidretos, pois foi, em sua grande parte, confeccionado artesanalmente com materiais alternativos. O método proporcionou a determinação de selênio em um grande número amostras de forma rápida e precisa com um baixo consumo de reagentes e baixas gerações de resíduos químicos. Através dos resultados obtidos, a proposta de trabalho foi potencialmente útil na determinação de selênio em amostras de castanhas de caju, mostrando-se uma excelente alternativa para o monitoramento de selênio em amostras de alimentos, ambientais, clínicas, dentre outras matrizes.

Referências

[1] COMINETTI, C.; COZOLLINO, S. M. F. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes – Selênio, **ILSI, Brasil**, 2009.

[2] CHEN, X., YANG, G., CHEN, **J. Biol Trace Elem Res,** 1980.

[3] OLDFIELD, J.E.. Selenium word atlas (Update edition). **Selenium-Tellurium Development Association (STDA)**, 2002.

[4] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº269. **Dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Publicado no Diário Oficial da União no dia 22 de setembro de 2005. Brasília, DF, 2005

[5] PREDA, C. et al. **Environmental Engineering and Management Journal 15**, 4, 913-921, 2016.

[6] JUNIOR, A. G. **Determinação de selênio subterrânea utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafita (GFAAS) e geração de hidretos (HGAAS).** Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

[7] NAKAHARA, T.; **Prog. Anal. At. Spectrosc**. 6, 163, 1983.

[8] BISINOTI, M. C. et al. Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio. **Quím. Nova [online].** vol.29, n.6, pp.1169-1174. ISSN 0100-4042, 2006.

[9] THOMPSON, M. et al. Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tellurium in aqueous solution by introduction of the gaseous hydrides into an inductively coupled plasma source for emission spectrometry. Part I. **Preliminary studies. Analyst**, 103(1227), 568-579, 1978.

[10] PAHLAVANPOUR, B.; THOMPSON, M.; THORNE, L.. Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony and bismuth in soils and sediments by volatile hydride generation and inductively coupled plasma emission spectrometry. **Analyst**, vol. 105, n. 1253, p. 756-761, 1980.

[11] CRISPINO, C.C. **Determinação de As, Sb e Se em material agronômico por espectrometria De emissão óptica acoplada a plasma induzido com geração de hidretos (HP-ICP-OES).** Dissertação (Mestrado),. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2005.

[12] TAKASE, I. et al. A Geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, Vol. 25, No. 6B, pg. 1132-1144, 2002.

[13] COELHO, N. M. M.; BACCAN, N.. Determinação de ultratraços de selênio em urina por geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica em fluxo. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v.29, n.1, p.7-14, 2004.

8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido e validado neste estudo usando a análise por injeção em fluxo para a geração de hidretos acoplado a espectrometria de absorção atômica se mostrou simples e de fácil operação, além do baixo custo quando comparado a equipamentos convencionais utilizados para a geração de hidretos, pois foi, em sua grande parte, confeccionado artesanalmente com materiais alternativos. O método proporcionou a determinação de selênio em um grande número amostras de forma rápida e precisa com um baixo consumo de reagentes e baixas gerações de resíduos químicos. Através dos resultados obtidos, a proposta de trabalho foi potencialmente útil na determinação de selênio em amostras de castanhas de caju, mostrando-se uma excelente alternativa para o monitoramento de selênio em amostras de alimentos, ambientais, clínicas, dentre outras matrizes.