



UNICAMP



1150054979



T/UNICAMP D543q 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**QUANTIFICAÇÃO DE BAIXOS TEORES DE
SELÊNIO EM ALIMENTOS POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA**

VERA MARIA DA COSTA DIAS

TESE DE DOUTORADO

**ORIENTADOR: Prof. Dr. NIVALDO BACCAN
CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a SOLANGE CADORE**

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

I

200326234

UNIDADE	ICQ
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	D543q
V	EX
TOMBO BCI	54979
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/08/03
Nº CPD	

CM00188013-4

BIB ID 297159

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

D543q

Dias, Vera Maria da Costa

Quantificação de baixos teores de selênio em alimentos por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica / Vera Maria da Costa Dias. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Nivaldo Baccan

Co-orientadora: Solange Cadore

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Selênio. 2. Alimentos. 3. GFAAS. I. Baccan, Nivaldo. II. Cadore, Solange. III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Título.

***Dedico este trabalho a
Fernando, Leonardo e Paloma
e aos colegas da
CIENTEC.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Nivaldo Baccan por sua orientação sempre dedicada e sua amizade, que me fizeram uma pessoa e uma profissional melhor;

Agradeço também com muito carinho à Prof.^a Dr.^a Solange Cadore, minha co-orientadora e amiga, que incontáveis vezes me auxiliou em tantas dificuldades;

Serei para sempre profundamente grata à UNICAMP, a seus professores e funcionários, por tudo o que me proporcionaram;

À Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC, agradeço pela oportunidade de realizar meu doutorado e pela autorização para desenvolver o projeto de pesquisa nas suas instalações;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS, agradeço o apoio financeiro.

QUANTIFICAÇÃO DE BAIXOS TEORES DE SELÊNIO EM ALIMENTOS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

Vera Maria da Costa Dias

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Baccan

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Solange Cadore

RESUMO

A determinação de Se em alimentos tem especial interesse analítico porque se trata de um micronutriente essencial que, acima de certas concentrações, pode ser tóxico. A ET AAS é uma das técnicas instrumentais mais usadas visando à essa determinação. Porém, freqüentemente, o LD não é adequado, considerando que a maioria dos alimentos tem teor de Se bastante baixo.

O presente projeto de pesquisa desenvolveu diversos estudos voltados a aperfeiçoar a determinação de baixos teores de Se em alimentos, por ET AAS.

Primeiramente, foi desenvolvido um estudo sobre possíveis interferentes nessa determinação. Foi demonstrada a ocorrência de efeito de matriz, encontrando-se evidências da interação de concomitantes como Ca-P e Ca-Al.

Uma comparação entre vários possíveis modificadores químicos foi conduzida, escolhendo-se como melhor opção o emprego de Rh.

Métodos para a pré-concentração de Se foram desenvolvidos e avaliados, no sentido de contornar o efeito de matriz e melhorar o LD proporcionado pela ET AAS. Sugerem-se dois métodos que podem ser aplicados a alimentos. O primeiro, utiliza DDTC como complexante e $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ como sorvente do complexo Se-DDTC, que é eluído com etanol, fazendo-se a determinação de Se no eluato por ET AAS, na presença de Rh como modificador químico. O segundo, que é finalmente o método de escolha, substitui o DDTC por DDTP. Este método foi validado através da análise de materiais certificados e da participação em um exercício interlaboratorial de âmbito nacional. O procedimento envolve um EF igual a 65 e foi otimizado para determinar Se em alimentos sólidos com, pelo menos, $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se.

QUANTIFICATION OF LOW CONTENTS OF SELENIUM IN FOOD BY ELECTROTHERMAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Vera Maria da Costa Dias

Advisor: Prof. Dr. Nivaldo Baccan

Co-advisor: Prof. Dr. Solange Cadore

ABSTRACT

The determination of Se in food is a matter of analytical concern, because it is an essential micronutrient which may also be toxic, above a certain concentration. Aiming at such determination, ET AAS is one of the most widespread techniques that can be employed. However, the LD is frequently not adequate, considering that food samples usually have low Se contents.

This work involves several studies with the objective of improving the determination of low concentrations of Se in food, by ET AAS.

Firstly, a study on potential interferences was developed. It was demonstrated that a matrix effect occurs. Evidences were found that there are interactions between concomitants, for instance, Ca-P and Ca-Al.

A comparison among several chemical modifiers was established. The best results were achieved using Rh as a modifier.

Methods for Se preconcentration were developed and evaluated, in order to avoid the matrix effect and improve the LD. Two methods were suggested, which can be applied to food samples. The first one is based on the formation of the DDTC-Se complex, which is retained by $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. The complex is then eluted with ethanol and the eluate is collected for the determination of Se by ET AAS, using Rh chemical modifier. The second method, which is preferred, replaces DDTC with DDTP. This method was validated through the analysis of certified materials and by means of a national collaborative exercise. The procedure involves an EF equals to 65 and was optimised for Se determination in solid food samples having concentrations down to $0.05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Se}$.

CURRICULUM VITAE ABREVIADO

Nome: Vera Maria da Costa Dias

Formação: Licenciada e Bacharel em Química – UFRGS

Mestrado: Agronomia (Química de Solos) – UFRGS

Mestrado: Analytical Science – University of Hull – UK

Experiência profissional:

- Técnica da Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC – Porto Alegre – RS desde 1978, efetuando serviços tecnológicos principalmente para a indústria, trabalhando com espectrometria atômica e tendo exercido coordenação de laboratórios, de projetos e gerência do Departamento de Química.

Experiência didática:

- Professora do Curso de Licenciatura em Ciências – UFRGS (um ano)
- Professora do Curso de Especialização em Química Ambiental – PUCRGS (dois anos)
- Cursos de curta duração, promovidos por diversas instituições.

Associações de classe:

- Registro no CRQ – 5ª Região
- Sócia da SBQ
- Sócia da ABQ (tendo sido tesoureira e presidente da Regional RS)

Produção científica e tecnológica:

- Relatórios técnicos solicitados por pessoas jurídicas e físicas: mais de 1000
- Trabalhos apresentados em eventos, com resumos publicados: 13
- Publicações completas: 4

ÍNDICE GERAL

	Página
ABREVIATURAS.....	XXI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXV
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXXI
 CAPÍTULO 1	
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivo.....	2
 CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Selênio.....	3
2.1.1 Propriedades, abundância e usos.....	3
2.1.2 Importância biológica.....	4
2.1.3 Presença em alimentos.....	6
2.2 A determinação de selênio.....	8
2.2.1 Técnicas instrumentais para a determinação de Se	8
2.2.2 A ET AAS.....	9
2.2.2.1 Modificadores químicos.....	14
2.2.3 Separação e pré-concentração usando injeção em fluxo.....	21
2.2.3.1 Conceitos fundamentais de separação e pré-concentração por injeção em fluxo.....	21
2.2.3.2 Técnicas de coluna para separação e pré-concentração por injeção em fluxo.....	25
2.2.3.3 Separação em coluna e pré-concentração de Se.....	29
2.2.4 A determinação de Se em alimentos por ET AAS.....	33
2.2.4.1 O reagente complexante DDTC.....	39
2.2.4.2 O reagente complexante DDTP.....	40

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação.....	42
3.2 Reagentes e soluções.....	43
3.2.1 Água.....	43
3.2.2 Etanol.....	43
3.2.3 Soluções de HNO ₃	43
3.2.4 Soluções de Se.....	43
3.2.5 Solução de modificador químico de Rh.....	44
3.2.6 Solução de modificador químico de Ni.....	44
3.2.7 Solução de modificador químico de Pd.....	44
3.2.8 Solução de modificador químico de Ir.....	44
3.2.9 Soluções de DDTP.....	44
3.2.10 Soluções de DDTC.....	45
3.2.11 Materiais certificados.....	45
3.2.12 Outros reagentes.....	45
3.3 Procedimentos.....	46
3.3.1 Limpeza de vidraria e outros materiais.....	46
3.3.2 Forno de grafite.....	46
3.3.3 Digestão de amostras.....	47
3.3.3.1 Forno de microondas.....	47
3.3.3.2 Bomba de oxigênio.....	49
3.3.4 Preparação do CPG silanizado.....	49
3.3.5 Pré-concentração com DDTC ou DDTP.....	50

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do efeito de concomitantes na absorbância de Se.....	52
4.1.1 Estudo da presença isolada de P, Ca e Al sobre a absorbância de Se.....	54
4.1.2 Estudo da presença concomitante de P, Fe, Al e Cl.....	58
4.1.3 Determinação de Se em amostras reais.....	63
4.2 Estudo de modificadores químicos para a determinação de Se por ET AAS.....	67
4.2.1 Otimização da massa de Pd, Rh e Ir.....	67
4.2.2 Comparação entre Pd, Rh e Ir.....	70
4.2.3 Adição de Mg(NO ₃) ₂	72
4.2.4 Adição de ácido ascórbico a Rh e Ir.....	75
4.2.5 Preparação de um modificador permanente de Rh.....	76
4.3 Estudo da separação e pré-concentração de Se, visando à determinação em alimentos.....	80

4.3.1 Digestão de amostras de alimentos.....	80
4.3.2 Pré-concentração de Se com reagentes imobilizados em CPG.....	83
4.3.2.1 Otimização da concentração do eluente NaOH.....	84
4.3.2.2 Influência do pH na retenção de Se pela coluna.....	86
4.3.2.3 Curvas analíticas com pré-concentração de Se em CPG silanizado e cálculo do EF.....	87
4.3.2.4 Verificação do desempenho do CPG silanizado na pré-concentração de Se a partir de matrizes reais.....	90
4.3.3 Pré-concentração de Se com DDTC-SiO ₂ -C ₁₈	91
4.3.3.1 Avaliação do efeito da presença do DDTC sobre a absorbância de Se.....	91
4.3.3.2 Influência do pH na formação do complexo Se-DDTC....	92
4.3.3.3 Otimização da concentração do DDTC.....	92
4.3.3.4 Curva analítica com pré-concentração de Se em DDTC-SiO ₂ -C ₁₈ e cálculo do EF.....	95
4.3.3.5 Aplicação do procedimento com DDTC-SiO ₂ -C ₁₈ a materiais certificados.....	96
4.3.4 Pré-concentração de Se com DDTP-SiO ₂ -C ₁₈	97
4.3.4.1 Avaliação do efeito da presença do DDTP sobre a absorbância de Se.....	97
4.3.4.2 Influência do pH na formação do complexo Se-DDTP....	99
4.3.4.3 Otimização da concentração do DDTP.....	100
4.3.4.4 Otimização do programa do forno de grafite para o trabalho com DDTP.....	101
4.3.4.5 Curva analítica com pré-concentração de Se em DDTP-SiO ₂ -C ₁₈ e cálculo do EF.....	102
4.3.3.6 Aplicação do procedimento com DDTP-SiO ₂ -C ₁₈ a materiais certificados.....	104
4.3.3.7 Aplicação do procedimento com DDTP-SiO ₂ -C ₁₈ a uma amostra "cega".....	105
4.3.5 Comparação entre DDTC e DDTP na pré-concentração de Se.....	106
4.3.5.1 Comparação entre DDTC e DDTP quanto ao efeito da acidez do meio.....	106
4.3.5.2 Efeito da presença de DDTC e DDTP na absorbância de Se.....	107
 CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	 109
 CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 113
 ANEXO – Procedimento proposto para a determinação de baixos teores de selênio em alimentos.....	 122

ABREVIATURAS

ACS.....	Sociedade Americana de Química (American Chemistry Society)
CE.....	Eletroforese capilar (Capillary Electrophoresis)
CE (página 24).....	Eficiência de concentração (Concentration Efficiency)
CI.....	Índice de consumo (Consumptive Index)
CPG.....	Vidro de porosidade controlada (Controlled Pore Glass)
DDTC.....	Dietil-ditiocarbamato
DDTP.....	Dietil-ditiofosfato
EDL.....	Lâmpada de descarga sem cátodo (Electrodeless Discharge Lamp)
EF.....	Fator de enriquecimento (Enrichment Factor)
ET AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
ETV-ICP-MS.....	Espectrometria de massas após vaporização eletrotérmica para a fonte de plasma indutivamente acoplado (Electrothermal Vaporization-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
FAAS.....	Espectrometria de absorção atômica com chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)
FD.....	Fator de diluição
FIA.....	Análise por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis)
GC.....	Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)
GC-MS.....	Espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HG.....	Geração de hidretos (Hydride Generation)
HG-AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry)
HG-AFS.....	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry)
HG-ET AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e geração de hidretos (Hydride Generation-Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
HG-ICP-MS.....	Espectrometria de massas com geração de hidretos e fonte de plasma indutivamente acoplado (Hydride Generation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
HPLC.....	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-ICP-MS.....	Espectrometria de massas com cromatografia líquida de alta eficiência e fonte de plasma indutivamente acoplado (High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
IC.....	Cromatografia de íons (Ion Chromatography)
IC-ICP-MS.....	Espectrometria de massas após cromatografia de íons e fonte de plasma indutivamente acoplado (Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

ICP-MS.....	Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
ICP OES.....	Espectrometria de emissão com fonte de plasma indutivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)
LCO.....	Lâmpada de catodo oco
LD.....	Limite de detecção
NAA.....	Análise por ativação com neutrons (Neutron Activation Analysis)
p.a.....	Pró-análise
PF.....	Ponto de fusão
PTFE.....	Politetrafluoroetileno
SiO ₂ -C ₁₈	Sílica gel com grupos octadecil imobilizados
STPF.....	Forno com plataforma à temperatura estabilizada (Stabilized Temperature Platform Furnace)
THGA.....	Atomizador de grafite aquecido transversalmente (Transverse Heated Graphite Atomizer)
UV-VIS.....	Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1 Desenho esquemático representando o procedimento de pré-concentração utilizado com DDTC-SiO ₂ -C ₁₈ ou DDTP-SiO ₂ -C ₁₈	51
Figura 4.1 Pulsos atômicos (sempre os mais altos) e de fundo, obtidos para 0,8 ng de Se, nas seguintes situações: A – sem adição de P; B – com adição de 1,5 µg de P; C – com adição de 4,2 µg de P. Modificador químico Pd (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C. P adicionado como NH ₄ H ₂ PO ₄	55
Figura 4.2 Efeito da presença de massas crescentes de Al como Al(NO ₃) ₃ sobre a absorbância integrada de 0,4 ng de Se. Modificador químico Pd (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C.....	56
Figura 4.3 Efeito da presença de massas crescentes de Al como AlCl ₃ sobre a absorbância integrada de 0,4 ng de Se. Modificador químico Pd (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C.....	57
Figura 4.4 Efeito da presença de massas crescentes de Al como AlCl ₃ sobre a absorbância integrada de 0,8 ng de Se. Modificador químico Pd (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C.....	58
Figura 4.5 Efeito da presença de massas crescentes de Al como AlCl ₃ sobre a absorbância integrada de 0,8 ng de Se. Modificador químico Rh (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1300 °C.....	58
Figura 4.6 Efeito simultâneo de massas crescentes de Ca e Al sobre a absorbância integrada de 0,8 ng de Se. Modificador químico Pd (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C.....	61
Figura 4.7 Pulsos atômicos (sempre os mais altos) e de fundo, obtidos para 0,8 ng de Se, nas seguintes situações: A – sem adição de Ca nem Al (área do pico atômico = 0,070 s); B – com adição de 2,6 ng de Al (área do pico atômico = 0,075 s); C – com adição de 1,5 µg de Ca (área do pico atômico = 0,064 s); D – com adição de 2,6 ng de Al e 1,5 µg de Ca (área do pico atômico = 0,054 s). Modificador químico Pd (5 µg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C. Ca adicionado como CaCl ₂ e Al como AlCl ₃	62

Figura 4.8 Concentração aparente de Se no material certificado BCR CRM 278 Pig Kidney (teor certificado de Se igual a $10,3 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$) após digestão, quando determinada por ET AAS, utilizando modificador químico Rh ($5 \mu\text{g}$). Pirólise a 1300°C	64
Figura 4.9 Fotos de três plataformas de L'vov, obtidas em microscópio Estereoscópico Zeiss Stemi SV 11 Apo, acoplado a Color Video Printer, marca Sony.....	69
Figura 4.10 Curvas de temperatura de pirólise para Se (2 ng), com diferentes modificadores químicos: $5 \mu\text{g}$ Pd ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$), $5 \mu\text{g}$ Rh (III) ($\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), $5 \mu\text{g}$ Rh (II) ($[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Rh}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e $4 \mu\text{g}$ Ir ($\text{IrCl}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$).....	70
Figura 4.11 Curvas de temperatura de pirólise para Se (2 ng), com diferentes modificadores: $5 \mu\text{g}$ Pd ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$), $5 \mu\text{g}$ Rh (III) (RhCl_3), e $4 \mu\text{g}$ de Ir ($\text{IrCl}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$), com THGA erodido (100 ciclos de uso anterior).....	71
Figura 4.12 Comparação entre o efeito do modificador Pd ($5 \mu\text{g}$) e o do modificador misto Pd+Mg ($5 \mu\text{g}$ de Pd + $3 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) na estabilização de 2 ng de Se, em tubos de grafite novos (médias de 10 repetições).....	72
Figura 4.13 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com $5 \mu\text{g}$ de Pd, com e sem a adição de $3 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	73
Figura 4.14 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com $5 \mu\text{g}$ de Rh, com e sem a adição de $3 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	74
Figura 4.15 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com $4 \mu\text{g}$ de Ir, com e sem a adição de $3 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	74
Figura 4.16 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com $5 \mu\text{g}$ de Rh (III) e diferentes massas de ácido ascórbico.....	75
Figura 4.17 Pulso atômico (o mais alto) e de fundo, obtidos com $0,8 \text{ ng}$ de Se. Modificador químico Rh ($5 \mu\text{g}$), temperatura de pirólise igual a 1300°C	79
Figura 4.18 Efeito da concentração de NaOH, empregado para eluir o Se retido em CPG silanizado, a partir de solução 10 ng mL^{-1} de Se.....	85
Figura 4.19 Efeito do pH na retenção de Se. Experimento feito bombeando alíquotas de 10 mL de soluções 2 ng mL^{-1} de Se (IV), por minicoluna recheada com 60 mg de CPG silanizado.....	87

Figura 4.20 Curva analítica com pré-concentração de Se em CPG silanizado. Experimento feito bombeando alíquotas de 25 mL de soluções de Se (IV), por minicoluna recheada com 60 mg de CPG silanizado.....	88
Figura 4.21 Curva analítica sem pré-concentração de Se.....	89
Figura 4.22 Efeito da temperatura de pirólise sobre a absorbância de 0,8 ng de Se, com e sem 40 µg de DDTC e 5 µg de Rh.....	92
Figura 4.23 Otimização da concentração de DDTC para a pré-concentração de Se (a partir de soluções 2, 4 e 8 ng mL ⁻¹ de Se). Procedimento com injeção de 5 mL de solução.....	93
Figura 4.24 Otimização da concentração de DDTC para a pré-concentração de Se, a partir de solução 4 ng mL ⁻¹ . Procedimento com injeção de 5 mL de solução.....	94
Figura 4.25 Otimização da concentração de DDTC para a pré-concentração de Se, a partir de solução 2 ng mL ⁻¹ . Procedimento com injeção de 25 mL de solução.....	94
Figura 4.26 Curva analítica com pré-concentração de Se, obtida pelo procedimento do DDTC-SiO ₂ -C ₁₈ , com injeção de alíquotas de 25 mL de soluções de Se.....	95
Figura 4.27 Efeito da temperatura de pirólise sobre a absorbância de 0,8 ng de Se, com e sem 40 µg de DDTP e modificadores químicos.....	99
Figura 4.28 Otimização da concentração de DDTP para a pré-concentração de Se (a partir de soluções 2, 4 e 8 ng mL ⁻¹ de Se). Procedimento com injeção de 5 mL de solução.....	100
Figura 4.29 Curvas analíticas com pré-concentração de Se usando DDTP, a diferentes temperaturas de pirólise. Procedimento com injeção de 5 mL de soluções de Se.....	101
Figura 4.30 Curva analítica obtida com alíquotas de 25 mL de soluções de Se e DDTP 1 % m/v, e programa alternativo para o forno de grafite.....	102
Figura 4.31 Pulsos atômico e de fundo registrados nas seguintes situações: A -ponto zero ng mL ⁻¹ de Se, da curva analítica mostrada na Figura 4.30; B -ponto 2 ng mL ⁻¹ de Se, da mesma curva.....	103

Figura 4.32 Efeito da acidez em HNO_3 sobre a pré-concentração de Se com DDTP ou DDTC. Concentrações utilizadas: Se 6 ng mL^{-1} , DDTP 0,1% m/v e DDTC 1,5 % m/v. Modificador químico Rh ($5\mu\text{g}$).....	106
Figura 4.33 Efeito de massas crescentes de DDTP ou DDTC sobre a absorvância de 1 ng de Se, com o programa usual de temperatura e tempo do forno de grafite, na presença de $5 \mu\text{g}$ de Rh.....	107
Figura 4.34 Efeito da temperatura de pirólise sobre a absorvância de 0,8 ng de Se, com e sem $40 \mu\text{g}$ de DDTC ou DDTP, na presença de $5 \mu\text{g}$ de Rh.....	108

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 Programa usual de temperatura e tempo do forno de grafite, para a determinação de Se.....	46
Tabela 3.2 Programa opcional (sem pirólise) de temperatura e tempo do forno de grafite, para a determinação de Se após pré-concentração com DDTP-SiO ₂ -C ₁₈	47
Tabela 3.3 Programa do forno de microondas (seis frascos) para a digestão de amostras de alimentos (0,2 a 0,3 g).....	48
Tabela 3.4 Programa opcional do forno de microondas (seis frascos) para a digestão de amostras de alimentos (0,2 a 0,3 g).....	48
Tabela 4.1 Intervalos supostos de concentração de minerais em alimentos, para fins de estudo de interferência sobre Se.....	53
Tabela 4.2 Teores máximos finais das variáveis independentes (elementos químicos potencialmente interferentes) aplicados no experimento 2 ⁴ fatorial.....	60
Tabela 4.3 Resultados da aplicação do procedimento com DDTC-SiO ₂ -C ₁₈ a materiais certificados.....	96
Tabela 4.4 Volumes (µL) das soluções de partida, para constituição de cada solução estudada no forno de grafite, objetivando a escolha de um modificador químico para ser usado na determinação de Se em presença de DDTP.....	98
Tabela 4.5 Resultados da aplicação do procedimento com DDTP-SiO ₂ -C ₁₈ a materiais certificados.....	104

CAPÍTULO 1

1.1 - INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, a Química Analítica veio alterando seu enfoque na área de alimentos. Existindo já farta literatura e protocolos oficiais para a determinação dos componentes majoritários, como proteínas, gorduras e açúcares, os analistas voltam-se para a pesquisa de métodos visando à determinação de componentes de alimentos presentes em menores quantidades, mas nem assim menos importantes.

Esse trabalho normalmente emprega técnicas instrumentais modernas, que se tornaram disponíveis na segunda metade do século XX, sendo que algumas ainda se encontram em desenvolvimento.

Ao mesmo tempo, continua crescendo a atenção para o que os alimentos contêm, de forma global. Em outras palavras, não apenas componentes desejáveis ou necessários encontram-se nos suplementos, mas também estão presentes os indesejáveis, de diversas naturezas.

Alguns elementos, como o Se, apresentam uma dualidade de classificação: desejáveis até uma suposta concentração, porque são essenciais, porém indesejáveis a partir de certo nível, porque se tornam tóxicos. Quanto mais tênue for essa fronteira, mais responsabilidade recairá sobre o analista, com seus métodos de determinação.

Enquanto o Se, do ponto de vista médico e nutricional, parece apresentar essa fronteira entre essencialidade e toxicidade bastante estreita e difusa, para a Química Analítica trata-se de um elemento cuja determinação é dificultada por certas características, como será visto na revisão bibliográfica. Entre essas características estão volatilidade, baixas concentrações encontradas em

alimentos, normalmente na faixa de ng g^{-1} , e ocorrência de interferências nos métodos instrumentais.

Diversas estratégias têm sido estudadas para fazer frente a esse problema analítico. Na verdade, cada método de determinação proposto é sempre um conjunto de estratégias: no caso, obtida uma alíquota representativa da amostra, já que alimentos costumam ser matrizes bastante heterogêneas, em que forma introduzi-la no equipamento analítico e, sendo necessária a digestão total, como garantir-se contra perdas por volatilização e contaminações, como livrar-se de interferências e, finalmente, atingir limites de quantificação aceitáveis.

1.2 – OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo propor métodos analíticos confiáveis para determinar baixos teores de Se em alimentos por ET AAS, contornando o efeito de matriz e atingindo LD satisfatório. A estratégia principal assumida é a de escolher um eficiente modificador químico e identificar possibilidades para separação e pré-concentração do elemento, a partir de matrizes reais. Aspectos envolvendo a digestão da amostra também são considerados.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Selênio

2.1.1 – Propriedades, abundância e usos

O elemento Se, número atômico 34 e constituinte do grupo VI A da tabela periódica, tem ponto de fusão e ponto de ebulição iguais a 221 °C e 685 °C, respectivamente, apresentando números de oxidação -2, +4 ou +6 (1). Sua química é predominantemente não-metálica, com várias semelhanças à química do enxofre (2). Pode ocorrer em várias formas químicas. Como Se inorgânico, existe no meio ambiente como selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}). Selenetos orgânicos, como dimetil-seleneto, são especialmente importantes em sistemas aquáticos (3).

Trata-se de elemento presente na crosta terrestre em quantidade relativamente pequena, com abundância estimada entre 0,05 e 0,09 mg kg⁻¹ e disperso de maneira inconsistente em depósitos geológicos. O elemento não ocorre em qualquer grande depósito que possa ser considerado economicamente viável, embora seja detectável na maior parte dos materiais que compõem a Terra. É obtido comercialmente como sub-produto do refino eletrolítico de metais, envolvendo minérios de cobre, zinco e níquel (4).

O Se pode ser empregado na indústria de vidros, na metalurgia e em xerografia, entre outras áreas industriais. Na indústria eletrônica, as propriedades de ação fotovoltaica e fotocondutiva tornam o elemento útil na manufatura de fotocélulas, medidores de exposição para fins fotográficos e baterias solares. O Se é usado extensivamente para transformar corrente alternada em corrente contínua, na produção de retificadores. É utilizado na indústria de vidros para colorir e descolorir vidros e esmaltes. Em metalurgia, surge como aditivo a aços

inoxidáveis. Também é empregado para fins medicinais e cosméticos. Porém, o hidreto e outros compostos de selênio são extremamente tóxicos ao ser humano e lembram arsênio na sua ação (1).

2.1.2 – Importância biológica

Originalmente tido como elemento indesejável, mesmo antes de sua descoberta por Berzelius, no início do século XIX, sua toxicidade em relação a animais já era reconhecida. Relatos de Marco Polo, viajando pela China ocidental em 1295, descreviam uma doença em cavalos que hoje é conhecida com o nome de selenose. Essa toxicidade foi confirmada em muitos estudos posteriores. Na América do Norte, os primeiros relatos descreviam a intoxicação de cavalos que se alimentavam em pastos referidos como “áreas venenosas” e que mostravam sintomas como coxeadura, perda de pelos, fissura de cascos, cegueira e paralisia. Essa doença foi rastreada até as plantas comidas pelos animais, o que resultou na descoberta de que se tratavam de vegetais acumuladores naturais de Se (5).

Envenenamento de rebanhos por Se foi relatado em muitas partes do mundo, como China, EUA, Austrália, México, Canadá, Colômbia e Israel. A selenose é vista como um perigo real em áreas de criação, sob certas condições de solo. Também é reconhecido que o Se representa um risco para seres humanos que venham a consumir alimentos com alta concentração do elemento, por exemplo, carne de gado procedente de áreas seleníferas.

Foi, portanto, uma surpresa, quando surgiram as primeiras evidências de que o Se é um micronutriente essencial para seres humanos e animais. Na verdade, assim como existem no mundo áreas com excesso de Se, em outros lugares as populações sofrem pela deficiência do elemento. A China, por exemplo, está na condição desfavorável de possuir três áreas de doenças endêmicas relacionadas com Se: uma por excesso (selenose) e outras duas por deficiência (doença de Keshan e doença de Kashin-Beck) (5,6).

Assim, mais do que qualquer outro elemento, o Se exemplifica a dicotomia entre essencialidade e toxicidade. Ao longo das últimas décadas, o Se foi tido como elemento tóxico (anos 30); carcinogênico (anos 40); elemento essencial (anos 50) e anticarcinogênico (década de 60 em diante) (7).

Mais recentemente, o papel positivo do Se do ponto de vista imunológico tem sido estudado. A incidência de alguns tipos de câncer nos EUA tem sido ligada à deficiência de Se na dieta local em certas áreas (8). Seu papel como protetor, impedindo a absorção de metais pesados, também foi levantado. Uma dose de $0,02 \text{ mmol kg}^{-1}$ de HgCl_2 , que matou 39 entre 40 ratos, causou apenas uma morte entre 40 ratos que receberam também selenito de sódio (9).

Em tecidos animais, o Se ocorre parcialmente ligado a proteínas em uma forma não completamente compreendida, como seleno-análogos de aminoácidos sulfurados e como a principal estrutura de importância biológica, a glutatíon peroxidase. Essa enzima tem atividade em um grande número de tecidos, fluidos, células e frações subcelulares, em níveis que variam grandemente com as espécies, tecidos e status em termos de Se no organismo. A mais alta atividade ocorre comumente no fígado, seguido por eritrócitos, músculo cardíaco, pulmões e rins. Existe uma dependência dramática da atividade dessa enzima em relação ao Se ingerido na dieta. A enzima glutatíon peroxidase é responsável pela decomposição de H_2O_2 e peróxidos orgânicos, constituindo um mecanismo secundário de defesa contra as consequências da auto-oxidação dos lipídios, função desempenhada principalmente pelos tocoferóis (vitamina E) (6).

Em alimentos, a forma de Se a considerar é a de seleno-aminoácidos, por exemplo, selenometionina. Para a suplementação, normalmente são empregadas as formas inorgânicas selenito e selenato, tanto para seres humanos como animais. Aproximadamente 80 por cento do Se orgânico ingerido a partir de

alimentos parece ser absorvido. A absorção de formas inorgânicas é considerada menos eficiente, porém ainda alta (5).

Os níveis de Se em rações e forragens variam grandemente com a espécie da planta e com a quantidade do elemento no solo. A suplementação para animais inclui o uso de aditivos contendo Se para rações, provisão de misturas de sal com pequenas quantidades do elemento, injeções periódicas ou doses orais de sais de Se, tratamento do solo com compostos de Se, e outras providências (6).

Cuidado é sempre necessário ao buscar uma dieta saudável em termos da presença de Se, já que se acredita que pequenas doses continuadas são suficientes para invocar sintomas de envenenamento. A relativamente estreita faixa entre dose benéfica e dose danosa faz com que a suplementação seja extremamente difícil e, em se tratando de seres humanos, a auto-medicação decididamente perigosa (8).

A chamada "Medicina Ortomolecular", que se encontra sob forte questionamento entre os próprios médicos, recorre à suplementação com minerais, entre outras substâncias. Um dos minerais suplementados é justamente selênio, que pode ser encontrado como constituinte de produtos farmacêuticos, normalmente cápsulas para ingestão diária, contendo de 20 a 50 μg do elemento.

O esforço de pesquisa no sentido de desvendar os papéis biológicos e modo de ação do elemento Se tem sido incrementado, demonstrando o interesse que o assunto suscita em Biologia, Medicina e áreas afins (10).

2.1.3 – Presença em alimentos

Larga variação é encontrada em termos do conteúdo de Se nas dietas humanas e essas diferenças são quase que totalmente devidas ao nível do elemento nos solos agrícolas de cada país (5). A média *per capita* de absorção

diária do elemento foi calculada como sendo 25 μg na Nova Zelândia, onde a maior parte do solo agriculturável é pobre em Se, 60 μg no Reino Unido e 60 a 220 μg no sub-continente norte-americano. Mesmo dentro de limites de território restritos, como nas ilhas britânicas, grande variação no conteúdo de Se é encontrada no mesmo tipo de alimento. Por exemplo, no Reino Unido o teor em cereais varia de 0,03 a 0,23 mg kg^{-1} e, em carne e peixe, fica entre 0,09 a 0,38 mg kg^{-1} . Frutas, vegetais e leite têm concentrações de Se da ordem de 0,01 mg kg^{-1} . Castanhas do Pará, nozes, castanhas de caju e alguns tipos de amendoins costumam ser ricos em Se. Algumas amostras de castanhas do Pará chegaram a apresentar 53 mg kg^{-1} , sendo que o consumo diário de apenas uma unidade desse alimento seria suficiente para satisfazer a ingestão de Se recomendada por alguns institutos oficiais (5,8).

No Brasil, o limite máximo de tolerância para Se em alimentos foi estabelecido como 0,05 mg kg^{-1} (alimentos líquidos) e 0,30 mg kg^{-1} (alimentos sólidos) (11). Acredita-se que prolongada ingestão de mais de 3 mg diárias do elemento seria suficiente para invocar sintomas de envenenamento (8).

2.2 – A determinação de selênio

2.2.1 – Técnicas instrumentais para a determinação de selênio

Uma consulta à literatura atualizada em Química Analítica revela a grande multiplicidade de técnicas instrumentais e suas variantes que estão sendo empregadas para a determinação de Se, nas mais diversas matrizes, tais como amostras ambientais, biológicas, geológicas, ligas metálicas, alimentos e outras, seja visando à quantificação do elemento total ou especiação.

Despontam como favoritas para a determinação de Se as técnicas da ET AAS, incluindo a HG-ET AAS, e a ICP-MS, aí incluídas HPLC-ICP-MS, HG-ICP-MS, ETV-ICP-MS e IC-ICP-MS.

Em seguida, vêm a HG-AAS e métodos voltamétricos.

Ainda importantes são as tradicionais espectrofotometria no UV-VIS e fluorimetria, bem como ICP OES, incluindo HG-ICP OES.

Outras técnicas também utilizadas abrangem HPLC com detectores diversos, HG-AFS, GC-MS, GC com outros detectores, CE com detectores diversos, métodos polarográficos, NAA, IC com detectores diversos, além de mais algumas técnicas que são empregadas poucas vezes. Observa-se, de forma geral, o freqüente concurso de métodos mecanizados ou semi-mecanizados envolvendo injeção em fluxo, possibilitando o uso de reações e a obtenção de resultados que de outra forma seriam virtualmente inatingíveis.

2.2.2 – A Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica

A escolha instrumental para a determinação de Se tem recaído freqüentemente sobre a ET AAS. A técnica, além de amadurecida, utiliza instrumental hoje bastante comum em laboratórios do mundo inteiro (o que ainda não ocorre com a ICP-MS) e apresenta características indispensáveis para a finalidade pretendida, como baixo LD, boa exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, embora com todo o refinamento instrumental, ainda há a necessidade de contornar interferências e, às vezes, o LD garantido pelo equipamento é insuficiente.

As bases da espectrometria de absorção atômica foram lançadas há meio século, por A. Walsh (12). A então nova técnica (1955) utilizava uma chama para produzir o vapor atômico estável necessário à quantificação da absorção do analito, presente na amostra. Pouco depois, considerando as dificuldades em atomizar elementos refratários, B. L'vov propôs usar um forno de grafite aquecido como meio de atomização, idéia que só foi realmente posta em prática em 1967 por M. Massmann, materializando a técnica da ET AAS (13).

A partir daí, seguiu-se pouco mais de uma década em que um grande número de trabalhos foram publicados explorando o forno de grafite, e outros atomizadores eletrotérmicos, para a atomização do analito, comprovando a grande sensibilidade da técnica.

O desenvolvimento da ET AAS, entretanto, foi retardado pela dificuldade em lidar com as interferências inerentes e ocorreu, então, um período de estagnação.

Renovado ímpeto foi registrado a partir da década de 80, com o surgimento de novos conceitos e de notável melhoria instrumental, por exemplo, a correção de fundo pelo efeito Zeeman, que se tornou então comercialmente disponível (14).

Do ponto de vista conceitual, um grande avanço da ET AAS foi registrado a partir da apresentação do conceito STPF, estabelecido por W. Slavin e colaboradores, em 1981 (15), e consolidado em seguida (16, 17).

Esse conceito, hoje amplamente utilizado, enseja uma especial abordagem à técnica, resultante do uso de características instrumentais individuais, que são entretanto mutuamente dependentes umas das outras. Embora o conceito não se refira especificamente a uma parte determinada do equipamento, o aparelho precisa ser compatível com o sistema completo STPF, que pode ser resumido da seguinte forma:

- emprego da plataforma de L'vov, que retarda a atomização até a condição de isothermicidade no ambiente do forno ser atingida;
- uso de modificadores químicos, que facilitam a análise alterando no atomizador o comportamento termoquímico do analito e da matriz onde ele se encontra, contribuindo para a remoção da última;
- alta taxa de aquecimento, que acelera o estabelecimento de temperatura estável para atomização;
- rápida eletrônica, que propicia a medida exata de sinais transientes;
- possibilidade de interromper o fluxo de gás interno, para maximizar o tempo de residência dos átomos do analito no atomizador;
- medida da área do pulso atômico (em lugar da altura) para computar todos os átomos do analito passando através do atomizador, independentemente da taxa de volatilização, que pode ser dependente da matriz.

Além dessas características, o emprego de um poderoso sistema de correção de fundo é indicado, bem como o uso da correção automática da linha base.

Já na década de 90, os esforços para o aperfeiçoamento da ET AAS continuaram ocorrendo em várias frentes: busca de modificadores químicos mais eficientes, desenvolvimento de atomizadores alternativos ou novas propostas para a construção e posicionamento do forno de grafite, modificação da superfície dos atomizadores de grafite, diferentes possibilidades para a introdução da amostra, acoplamento da ET AAS a outras técnicas, separação e pré-concentração do analito, além do aprofundamento de estudos teóricos.

No que se refere a modificadores químicos, grande volume de trabalho foi desenvolvido ainda nos anos 80, conforme abrangente revisão publicada em 1990 (18). O tema continua com intensidade, agora muitas vezes ligado à modificação da superfície dos atomizadores de grafite, com vistas à obtenção de modificadores duradouros ("permanentes") ou à adsorção de analitos injetados em fase vapor ("in situ trapping"). Uma revisão sobre trabalhos publicados a partir de 1990 é apresentada adiante, em tópico especial.

Em termos de desenvolvimento de atomizadores alternativos, propostas contemplando diversos novos formatos, materiais de construção e presença de dispositivos auxiliares vêm sendo apresentadas. Alguns desses trabalhos, por exemplo, descrevem o atomizador tipo "forno-filtro", construído para separar a zona de reação da zona de observação, usando um filtro de grafite poroso. São obtidas consideráveis melhorias em sensibilidade, que podem ainda ser aumentadas tampando-se o orifício de injeção, durante o programa de forno. O novo atomizador atinge melhor desempenho para elementos voláteis e, quando comparado ao comercialmente difundido THGA, pode aumentar o sinal analítico em até 2,8 vezes sem o tampão ou 4,8 vezes com o tampão, dependendo do elemento considerado (19, 20).

Outro novo atomizador, entre tantas possibilidades, é o do tipo “dois estágios”: Construído com grafite, apresenta uma parte superior aquecida transversalmente e uma inferior, aquecida longitudinalmente. Pode propiciar limites de detecção comparáveis aos obtidos através de NAA (21).

Entre propostas de atomizadores metálicos para ET AAS, destacam-se os trabalhos referentes ao uso de filamento de tungstênio, cuja principal vantagem seria o baixo custo e a não-formação de carbetos refratários. Entretanto, há um considerável nível de interferências a serem contornadas e modificadores químicos estão sendo estudados com esse objetivo (22, 23).

Embora na ET AAS a maneira mais comum de introduzir a amostra no equipamento seja sob forma de solução líquida, outros meios são também possíveis e há muitos trabalhos publicados fazendo referência a essa questão. Pode-se, por exemplo, introduzir a amostra em suspensão de partículas sólidas em um líquido (“slurry technique”) ou suspensão de partículas sólidas em um gás (menos comum), ou na forma de gás ou vapor, ou ainda diretamente no estado sólido.

A introdução de amostras sólidas, diretamente ou em suspensão, tem atraído de longa data os pesquisadores, pois não requer a digestão do material. Pode, no entanto, gerar elevado sinal de fundo e reduzir a vida útil do atomizador. Problemas como falta de homogeneidade da amostra e tamanho de partícula têm que ser enfrentados, além de cuidados especiais para o controle da precisão e calibração. Apesar de todas essas dificuldades, desde os anos 80 resultados satisfatórios têm sido registrados na literatura, para certas matrizes e analitos. No caso de suspensões líquidas, dispersantes adequados são propostos e a agitação é realizada de várias formas, através de agitadores magnéticos ou ultrassônicos. Vários trabalhos referentes a essa área, publicados de 1997 em diante, foram tabulados (24).

Por outro lado, há notável interesse na introdução do analito em estado de vapor, principalmente envolvendo a geração do hidreto respectivo, que é imediatamente conduzido ao atomizador e aí acumulado, possibilitando pré-concentração. Essa estratégia é alcançada em ET AAS através do acoplamento com HG, o que normalmente exige mecanização. Estão em estudo recobrimentos metálicos para o atomizador, com a função de fixar os hidretos "in-situ".

O acoplamento da ET AAS com técnicas de injeção em fluxo vem propiciando importantes desenvolvimentos, entre os quais merece destaque a separação e pré-concentração do analito em linha. Uma das estratégias mais utilizadas nessa área é a extração em fase sólida, que será revisada em separado, adiante. Porém, é interessante observar que a ET AAS em si corresponde a um detector que funciona de forma descontínua, pela própria definição e instrumentação da técnica. Assim, o acoplamento da ET AAS com técnicas de injeção em fluxo tem características de sistema próprias. Tais sistemas se diferenciam de outros aplicáveis, por exemplo, a FAAS, ICP OES etc, cuja detecção funciona em base contínua. Recentemente, uma revisão sobre ET AAS acoplada com técnicas de injeção em fluxo foi publicada (25).

Outra linha de pesquisa, retomada ao final dos anos 90 e ensejada por novas facilidades instrumentais disponíveis, refere-se ao estudo de fontes contínuas como fontes de radiação primária para AAS, o qual poderá determinar um importante avanço na ET AAS. Entre as principais vantagens dessas fontes contínuas, poderiam ser listadas: informações espectrais detalhadas no entorno da linha analítica; medida e correção de fundo verdadeiramente simultâneas; disponibilidade de linhas secundárias de mesma intensidade da linha primária; determinação de elementos para os quais não existe LCO ou outras fontes de linhas espectrais, por exemplo, elementos radioativos; melhores LD e intervalo linear, e capacidade multi-elementar(26).

Dependendo da matriz e do LD que precise ser alcançado, a determinação de Se por ET AAS pode ou não ser feita com recursos de separação e pré-concentração. Como o interesse analítico desce a níveis cada vez mais baixos de concentração e, por outro lado, a busca de especiação tem sido freqüente, boa parte dos trabalhos atualmente publicados envolvendo a determinação de Se por ET AAS inclui algum recurso para melhorar o LD imposto pelos espectrômetros disponíveis comercialmente.

Esse recurso pode ser, por exemplo, o emprego de um modificador químico especialmente escolhido, “permanente” ou não, ou a pré-concentração do analito, preferentemente em linha, em alguma de suas múltiplas formas, como extração em fase sólida, “in situ trapping” do hidreto de selênio, e outras.

2.2.2.1 – Modificadores químicos

O objetivo geral do uso de modificadores químicos em ET AAS é facilitar a análise através da alteração “in situ” (“modificação”) do comportamento termoquímico do analito e da matriz onde ele se encontra. Inevitavelmente, o efeito de qualquer modificador é complexo e diverso, assim todos os quatro componentes do sistema analítico são afetados: o analito, a matriz, o atomizador (a camada superficial) e a fase gasosa. Com o emprego de modificadores químicos busca-se contornar certas características desfavoráveis do:

- analito (volatilidade extremamente alta ou baixa);
- matriz (interferentes, sinal de fundo difícil de manejar);
- atomizador (ausência temporal ou espacial de isothermalidade);
- fase gasosa (por exemplo, a pressão parcial de certos componentes ativos)(18).

Os modificadores químicos podem ser adicionados à amostra em um momento oportuno durante o ciclo de aquecimento, ou serem previamente

misturados à amostra, antes da introdução dessa no atomizador. Podem também preceder à amostra, no tubo de grafite. São praticadas várias formas de pré-introdução do modificador.

Quer pela importância biológica do elemento Se, quer por suas características químicas próprias, muitos trabalhos contemplam o desenvolvimento de modificadores químicos adequados para sua determinação por ET AAS.

Estudo pioneiro da atomização em forno de grafite, publicado por Ediger em 1975, indicou a utilização de Ni como modificador químico na determinação de Se por ET AAS (27), evitando dessa forma perdas significativas do elemento. Muitos autores começaram a estudar metais mais refratários e nobres em lugar de Ni, para essa finalidade, com destaque para Pd, e um modificador "mais universal" foi proposto por Schlemmer e Welz: Pd - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (28). Como já foi comentado, grande volume de pesquisa foi realizado ainda antes de 1990 (18) e o assunto modificação química continua atraindo atenções.

Outros metais com características semelhantes a Pd, como Ru, Rh, Pt e Ir, também foram experimentados.

Por exemplo, uma comparação entre os modificadores Ir, Ir - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e Pd - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi realizada, visando à determinação de Se em sangue, com introdução separada e em seqüência do modificador e da amostra, e um passo intermediário de lavagem do amostrador. A sensibilidade mais alta, aliada à mais alta temperatura de pirólise possível (1400 °C) foi obtida com Ir - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (29).

Outro trabalho estudou o efeito de Pd, Pt, Rh, Ru e Ir, adicionados simultaneamente ao analito (como cloretos) e também de forma pré-reduzida, sobre o comportamento de Se (IV). A eficiência de modificação dos cloretos, exceto RhCl_3 , foi verificada como sendo muito baixa, ficando RuCl_3 com os piores

resultados. Para todos esses modificadores na condição pré-reduzida, as temperaturas de pirólise máximas atingidas foram semelhantes, em torno de 1200 °C. Porém, houve registro de perdas de Se com modificadores Rh e Ru pré-reduzidos. As temperaturas de atomização otimizadas e as massas características obtidas também não diferiram significativamente (essas últimas variaram de 27,5 a 38,6 pg, com EDL). Não foi observada correlação entre os pontos de fusão dos modificadores e as temperaturas de pirólise e atomização otimizadas (30).

Alguns autores sugeriram a adição de redutores, como ácido ascórbico, a modificadores químicos cuja principal função é prevenir a vaporização do analito durante as etapas de secagem e pirólise, tipicamente o caso do emprego dos modificadores Ni, Pd ou Pt para baixar a pressão de vapor de analitos de baixo PF, como Se, As e outros. Tais tipos de modificadores e analitos podem formar ligas ou compostos intermetálicos cujos PF chegam a 1000 °C ou mais. Com a presença de um redutor, a formação de liga seria promovida, porque analito e modificador seriam reduzidos mais cedo, ao longo do programa de aquecimento, e isso poderia aumentar a absorbância registrada. A adição de ácido ascórbico à Pt levou a um aumento significativo da absorbância de Se. Porém, isso não ocorreu quando o mesmo redutor foi adicionado a Ni. Por outro lado, o redutor experimentado como modificador único levou a péssimo resultado, quase anulando a absorbância de Se (31).

Um estudo comparativo entre Ru, Rh e Pd para a estabilização térmica de 18 analitos, incluindo Se, foi efetuado. A alta eficiência dos três modificadores (massa utilizada em cada caso: 4 µg) foi comprovada para a estabilização térmica de Se (temperatura de pirólise otimizada: 1250 °C nos três casos) e outros analitos voláteis. A adição de 200 µg de ácido ascórbico possibilitou um aumento da temperatura de pirólise, na determinação de Se, para 1300 °C (Pd) e 1350 °C (Ru e Rh) (32).

A eficiência de Rh e Pd, preparados em solução de ácido cítrico, foi comparada também na determinação de Se em tecidos biológicos ricos em P. Os resultados foram melhores com o emprego de Rh (20 µg), cuja adição foi capaz de contornar adequadamente a interferência de fosfato e de gerar a melhor massa característica (20 pg, com LCO de alta intensidade). Os modificadores não foram pré-reduzidos, apenas foram introduzidos em solução e submetidos ao programa do forno de grafite simultaneamente à solução da amostra. As temperaturas de pirólise utilizadas foram 800 °C (Pd) e 1000 °C (Rh) (33).

Alguns compostos orgânicos, empregados isoladamente, foram experimentados como modificadores químicos. Da mesma forma como ácido ascórbico, citado anteriormente, o surfactante Triton X-1000 também não é viável como modificador químico único na determinação de Se, além de não haver vantagem em adicioná-lo a Ni, Pd ou Pt (31). Porém, bons resultados foram obtidos com o emprego isolado de glicose: possibilitou pirólise a 1300 °C, com significativa redução da interferência devida ao P (34). Observa-se, entretanto, que o efeito da glicose em termos de massa característica é desfavorável.

A adição de auxiliares de queima, principalmente $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, a Ni, Cu, Pd ou a outros metais nobres, constituindo modificadores mistos, vem desde os trabalhos pioneiros em ET AAS, voltados à modificação química. Esses estudos também continuaram na década de 90. Entre outras propostas, o modificador Ni (5 µg) - $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ (3 µg) foi sugerido, para a determinação de Se em urina. Temperatura de pirólise de 1400 °C (solução padrão aquosa) e 900 °C (urina diluída 1:3) foi possível, havendo a remoção ou diminuição de interferências causadas por sulfato, fosfato e íons metálicos concomitantes. A massa característica relatada foi igual a 30 pg (35).

Nos últimos anos, intensificou-se a busca de modificadores duradouros, ("permanentes"), para a determinação de vários analitos, mas freqüentemente

desenvolvidos para fixação "in situ" de hidretos, visando à determinação de As, Se e outros elementos por HG – ET AAS.

Ainda nos anos 80, diversas contribuições surgiram, no sentido da preparação de recobrimentos (os feitos com Pd pareciam promissores) capazes de reter hidretos na HG – ET AAS, porém havia muito o que aperfeiçoar. Por exemplo, os recobrimentos às vezes necessitavam ser preparados a cada novo ciclo de aquecimento e/ou tinham efeito deletério sobre o tubo de grafite. Assim, os anos 90 foram cenário para o desenvolvimento de reagentes que gerassem recobrimentos permanentes e de fácil e rápida aplicação no tubo de grafite, de preferência mecanizável.

Um modificador permanente (duração de 300 ciclos), preparado através de uma única injeção manual de 100 μ L de solução de Pd e Ir, totalizando 50 μ g de Pd e 50 μ g de Ir, foi proposto para a determinação de Se, As e Bi por HG – ET AAS (36). São vantagens evidentes o fácil preparo e a duração do recobrimento, que permite um dia inteiro de trabalho sem interrupção. Porém, a massa característica de Se que resultou é alta (61 pg, medida com EDL e uma alça de amostragem de 500 μ L), em comparação a, por exemplo, valores citados anteriormente nesta revisão.

Bulska e Jedral propuseram tubos com o interior eletrogalvanizado com Pd ou Rh, para a estabilização térmica de Se, As e Si em solução aquosa. Vantagens práticas do uso dos tubos eletrogalvanizados foram demonstradas através de estudos de estabilização térmica, valores de massa característica e vida útil da cobertura galvanizada. A investigação mostrou que a pré-injeção de solução do modificador no tubo e aquecimento a 1000 °C não é tão efetiva quanto a eletro-redução em um banho eletrolítico. A superfície do grafite, previamente tratada por galvanoplastia com Pd ou Rh, pode comportar-se como o modificador correspondente, funcionando como um modificador químico sólido. Para Se, a eletrodeposição de Rh resultou em um modificador permanente para 160 ciclos de

aquecimento (apenas 20, para deposição térmica), com massa característica igual a 28 pg (LCO) e temperatura de pirólise até 1400 °C (37).

A preparação de um modificador permanente de Ir por deposição do vapor desse metal na superfície interna do atomizador de grafite foi descrita por Rademeyer, Radziuk e outros. O vapor foi obtido em aparato especial, dotado de fonte de alta voltagem e corrente contínua, a partir de um cátodo sólido de Ir e com o tubo de grafite ligado ao polo positivo, produzindo-se descargas em atmosfera de Ar. As características desse tipo de modificador foram comparadas e demonstradas como superiores às de outro, obtido por injeções de solução de Ir. Com uma deposição de 9700 µg de Ir pelo método do vapor, 700 ciclos foram possíveis, mantendo constante a absorbância de 1 ng de Se, com resposta equivalente a de modificadores recomendados, adicionados a cada ciclo. Temperatura de pirólise de até 1400 °C foi obtida com esse tipo de modificador (38).

Os modificadores Ni, Cu e Pd foram ainda comparados para a estabilização de Se em diferentes estados de oxidação. Os melhores resultados para amostras com matriz orgânica, onde Se (II) está presente, foram obtidos com Pd, reduzido termicamente no forno de grafite ou eletrodepositado, obtendo-se massa característica entre 50 e 55 pg (LCO). Em termos de forma de preparação do modificador permanente, o Pd termicamente depositado durou por apenas 10 ciclos (porém, apenas 10 µg de Pd haviam sido empregados), garantindo estabilização térmica das formas de Se até 1200 °C, enquanto que o eletrodepositado suportou 500 ciclos, sem perda de sensibilidade e propiciando estabilidade até 1300 °C (39).

Outros autores prepararam modificadores permanentes com 50 µg de Pd + 50 µg de Ir, 100 µg de Ir ou 100 µg de Ir + 20 µg de Mg, através da adição de soluções ao tubo de grafite, seguida de pré-redução térmica, utilizando ciclos completos de secagem/pirólise/atomização. Obtiveram bons resultados na fixação

do hidreto de Se para determinação por HG – ET AAS, com os modificadores à base de Ir ou Ir-Mg (massa característica igual a 47 e 58 pg, respectivamente, utilizando LCO), relatando uma duração de 400 ciclos do modificador permanente (40).

Um recobrimento com 250 µg de W + 200 µg de Rh, aplicado sobre a plataforma integrada de um THGA, resultou em modificador permanente adequado para Se, Cd e Pb, resistindo até cerca de 350 ciclos (massa característica obtida para Se: 42 pg, com EDL). Os metais W e Rh foram aplicados em solução e pré-reduzidos termicamente, mediante um programa de forno com vários passos de aquecimento (41).

Um trabalho envolvendo determinação multielementar de elementos formadores de hidretos por HG – ET AAS utilizou tubos recobertos com Ir, para determinação simultânea de Se e Bi, ou então As, Bi e Sb (42).

Recobrimento de Ir foi ainda empregado com sucesso como modificador químico, estabilizando Se em soluções contendo cloretos. Tanto o recobrimento feito por redução térmica, como por eletrodeposição, pôde ser usado. A formação de compostos C – Ir – Cl⁻ seria responsável pela estabilização de Se em presença de cloretos, quando o modificador permanente é empregado (43).

Além dos metais nobres, também os elementos formadores de carbeto, como Zr, Nb, Ta e W, continuam sendo experimentados para a confecção de modificadores permanentes, utilizando técnicas de impregnação ou injeção direta no tubo ou plataforma.

Para fixação de hidretos em HG – ET AAS, recobrimentos com esses metais formadores de carbeto, de uma forma geral, não foram aprovados (40). Porém, uma comparação entre resultados obtidos com tubos tratados com Pd ou Zr, com a finalidade específica de reter H₂Se para determinação de Se por HG – ET AAS, concluiu que ambas as possibilidades são factíveis (44).

Modificador permanente à base de Zr foi também experimentado em análise multielementar por HG – ET AAS, mas não foi possível empregá-lo de forma universal (42).

2.2.3 – Separação e pré-concentração usando injeção em fluxo

2.2.3.1 – Conceitos fundamentais de separação e pré-concentração por injeção em fluxo

Antes de restringir o assunto à separação e pré-concentração de Se, convém lançar uma vista geral sobre conceitos fundamentais de injeção em fluxo, que então se aplicam.

Uma definição de FIA, corrente no início dos anos 80 (uma década depois de haver sido primeiramente descrita) era (45): “um método baseado na injeção de uma amostra líquida em uma corrente contínua e não-segmentada de líquido adequado, em movimento. A amostra injetada forma uma zona, que é então transportada a um detector, que continuamente registra a absorbância, potencial de eletrodo, ou qualquer outro parâmetro físico, na medida em que ele muda como resultado da passagem do material da amostra através da célula de fluxo. A técnica é baseada na combinação de injeção da amostra, dispersão controlada e acerto exato do tempo”.

No entanto, o grande progresso da técnica fez com que essa definição ficasse ultrapassada, por não acomodar importantes modalidades de FIA que foram surgindo. Uma nova definição foi proposta (46): “técnica não-cromatográfica e quantitativa de análise em fluxo, realizada através da manipulação reprodutível das zonas da amostra e dos reagentes, em uma corrente sob condições termodinamicamente não equilibradas”.

Os métodos que utilizam FIA, quando aplicados para separação e pré-concentração do analito, têm muitas vantagens sobre os correspondentes executados em batelada ou mesmo em formas contínuas. Os seus méritos foram sumarizados da seguinte maneira (47):

- alta taxa de processamento de amostras, uma a duas ordens de magnitude mais alta que procedimentos em batelada, com tempos de operação curtos (10 a 200 s) por determinação;
- altas eficiências de enriquecimento para sistemas de pré-concentração, tipicamente 5 a 50 vezes mais altas do que para procedimentos em batelada;
- baixo consumo de amostra, uma a duas ordens de magnitude menos do que em procedimentos de batelada;
- baixo consumo de reagentes, uma a duas ordens de magnitude menos do que em procedimentos de batelada;
- alta reprodutibilidade, tipicamente na faixa 1-3 % (desvio padrão relativo);
- operação automática simples, permitindo implementação com sistemas de monitoramento contínuo e uso em controle de processos;
- baixo risco de contaminação, devido aos sistemas fechados e inertes usados (característica muito importante para análise em nível de traços);
- possível melhoramento em seletividade, por aplicação de discriminação cinética;
- pequeno espaço de bancada exigido, aparelhos pequenos.

Os métodos de injeção em fluxo utilizados para separação podem ser classificados de acordo com o tipo de interface através da qual a transferência de massa tem lugar. Os tipos de separação mais conhecidos são (47):

- líquido-líquido – extração por solvente (partição)
diálise

- líquido-gás – difusão do gás
 geração de hidreto
 geração de vapor frio
- líquido-sólido – troca iônica
 adsorção
 extração por sorvente
 precipitação-dissolução
 coprecipitação-dissolução
 eletrodeposição-redissolução

A maior parte das técnicas pode ser também classificada de acordo com o meio usado para separação, por exemplo, técnicas de membrana, de coluna ou de filtração.

Alguns critérios definidos ao longo do desenvolvimento da técnica são utilizados para avaliar sistemas de pré-concentração (48-50) e os mais difundidos são apresentados a seguir.

O *fator de enriquecimento* – EF, é um critério freqüentemente usado para avaliar sistemas de pré-concentração e, teoricamente, é igual à razão entre a concentração do analito no concentrado C_e e na amostra original, C_s :

$$EF = C_e/C_s$$

Na prática, a concentração do analito no concentrado é normalmente desconhecida. Assim, uma aproximação geralmente aceita é a que define EF como sendo a razão entre as inclinações das porções lineares das curvas analíticas antes e depois da pré-concentração.

Altos fatores de enriquecimento não estão necessariamente associados com altas eficiências, porque os primeiros podem ser alcançados mediante longos

períodos de pré-concentração ou consumindo grandes volumes da amostra. Dessa forma, o critério da *eficiência de concentração* – CE serve para avaliar e comparar as eficiências de sistemas diversos, sendo definido como o produto entre o fator de enriquecimento e a frequência de amostragem, em número de amostras analisado por minuto:

$$CE = EF (f/60)$$

Esse valor indica o fator de enriquecimento do analito alcançado pelo sistema em um minuto.

O parâmetro *índice de consumo* – CI refere-se a outro aspecto da eficiência do sistema, que é a eficiência do consumo da amostra. Foi definido como sendo o volume da amostra, em mililitros, consumido para alcançar uma unidade de EF, sendo expresso por:

$$CI = V_s/EF$$

onde V_s é o volume da amostra consumido para obter o valor de EF.

Outros parâmetros têm sido ainda propostos para avaliar sistemas de injeção em fluxo para pré-concentração e os meios utilizados para a separação. Por exemplo, alguns autores ainda empregam ensaios em batelada, para avaliar a capacidade de troca de enchimentos de coluna.

Outra característica importante de sistemas de injeção em fluxo para pré-concentração é que eles podem ser operados com base no tempo ou no volume. Ou seja, o volume de amostra sendo processado pode ser determinado fixando-se o intervalo de tempo para introdução da amostra no sistema de pré-concentração, sob uma vazão definida da corrente da amostra. Mas também pode ser determinado usando-se uma corrente carregadora para deslocar um certo volume de amostra, definido através de uma alça de amostragem. Ambas as abordagens

têm mostrado bons resultados, com pequenas vantagens de uma sobre a outra, dependendo dos objetivos e condições de trabalho.

2.2.3.2 – Técnicas de coluna para separação e pré-concentração por injeção em fluxo

Técnicas tradicionais de separação e pré-concentração, entre elas as baseadas em troca iônica e adsorção, utilizaram-se de colunas, ao longo de décadas. A mecanização dessas técnicas significou uma revolução nos procedimentos, atraindo muitos pesquisadores para, por exemplo, a montagem de sistemas de injeção em fluxo e a procura de materiais que pudessem funcionar adequadamente como enchimentos para as minicolunas desses sistemas, visando a separar a matriz e pré-concentrar o analito, nas aplicações mais diversas.

Em 1983, um trabalho pioneiro nessa área foi publicado, tendo como objetivo pré-concentrar metais pesados a partir de água de mar poluída, usando uma minicoluna de Chelex-100, com detecção por FAAS (51).

Essas técnicas de pré-concentração em linha usando minicolunas são baseadas em sorção: o analito é de alguma forma capturado e retido na coluna adequada, sendo oportunamente liberado para detecção, pela passagem de eluente adequado.

Muitos tipos diferentes de materiais de enchimento para minicolunas têm sido investigados. Geralmente, eles retêm o analito através de um dos seguintes mecanismos: troca iônica, adsorção e extração por sorvente.

Uma resina de troca iônica é um material insolúvel (inorgânico ou orgânico) contendo íons lábeis que se trocam reversivelmente com outros íons em uma solução posta em contato. Esse material insolúvel tem uma estrutura polimérica,

que é um tipo de esqueleto, suportado por ligações cruzadas de uma cadeia a outra. Sobre esse esqueleto, os grupos de troca iônica são sustentados. Quanto maior o número desses grupos por unidade estrutural, maior é a capacidade de troca do material (52).

Os grupos de troca iônica presentes em resinas de troca catiônica são grupos ácidos, por exemplo, $-\text{SO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$. As resinas de troca aniônica têm grupos básicos, por exemplo, amônio quaternário, aminas alifáticas e aromáticas. Muitos tipos de trocadores de íons têm sido preparados e um número considerável está disponível comercialmente. Para fins práticos, eles são classificados como trocadores catiônicos fracamente e fortemente ácidos, e como trocadores aniônicos fracamente e fortemente básicos. Embora alguns trocadores naturais existam, os sintéticos são muito mais importantes e têm emprego generalizado, encontrando muitas aplicações industriais. Extensas listas de nomes comerciais e propriedades dos trocadores de íons sintéticos podem ser encontradas em textos especializados (52-54).

Em Química Analítica, os trocadores de íons têm sido usados para muitos propósitos. Considerando a aplicação em técnicas de pré-concentração, a falta de seletividade que esses materiais costumam apresentar causa limitações ao seu emprego.

Essa falta de seletividade fez com que, de longa data, fosse desenvolvido um considerável número de resinas de troca iônica contendo grupos estruturais conhecidos por formar complexos com metais. Mesmo na falta de especificidade real, algumas dessas resinas quelantes de troca iônica podem na prática mostrar-se satisfatórias, porque as afinidades pelos íons mudam com o pH e assim um certo grau de separação pode ser possível, através da escolha apropriada do meio (52, 53).

Uma resina de troca iônica convencional retém os íons por atração eletrostática. Quando resinas quelantes são usadas, ligações covalentes são formadas entre o agente complexante e os íons, significando maior intensidade nas forças de interação binária. Na pré-concentração em coluna, conseqüentemente, utilizando-se resinas quelantes o analito é retido mais firmemente. Isso pode ser vantajoso, mas também pode levar a dificuldades na eluição.

Várias resinas quelantes têm sido preparadas e caracterizadas para pré-concentração em linha. Os primeiros pesquisadores empregaram resinas que já estavam comercialmente disponíveis, como a Chelex-100 (51). Esse material é uma resina quelante de troca iônica contendo grupos iminodiacetato. Porém, suas propriedades mecânicas (como inchamento e contração variando com a força iônica) são desfavoráveis para trabalho em linha.

Na procura por resinas quelantes mais específicas e com propriedades mecânicas mais aceitáveis, vários grupos funcionais têm sido imobilizados em diferentes suportes. Uma das resinas quelantes mais usadas desde os anos 80, para pré-concentração em linha, é a 8-hidroxiquinoleína imobilizada em suportes orgânicos (estireno-divinil-benzeno, celulose, etc) ou sílica (55). Essa resina pode ser usada como uma referência para comparação com outras resinas mais recentemente propostas (56). Porém, suportes orgânicos não costumam ter as melhores propriedades físicas para procedimentos em linha.

As vantagens de suportes de sílica para a imobilização de reagentes foram sumarizados (55):

- sílica é prontamente modificada por vários agentes silanizantes, permitindo a imobilização de vários grupos funcionais;

- como o grupo ligante encontra-se na superfície do suporte, altas taxas de troca são geralmente obtidas;
- sílica oferece excelente resistência ao inchamento, à medida em que varia a composição do solvente, que tem pequeno efeito sobre o suporte em pH menor que 9.

A estrutura tridimensional da sílica tem o átomo de silício no centro de um tetraedro, com átomos de oxigênio em cada um dos quatro vértices. A ligação química Si-O é muito forte e os tetraedros podem se ligar entre si. Isso ocorre porque os átomos de oxigênio são bivalentes e cada um pode se ligar a dois átomos de silício. O resultado é uma cadeia rígida, com anéis de tetraedros. Na superfície, os átomos de oxigênio estão parcialmente livres para se ligarem, porque possuem apenas uma ligação comprometida com silício. A sílica hidrolisada tem grupos silanol na superfície (57).

A própria sílica tem algumas propriedades de troca iônica, mas as interações com a maioria dos íons metálicos são fracas, por causa da baixa acidez dos grupos silanol e características doadoras pouco pronunciadas dos átomos de oxigênio da superfície. Através da modificação da superfície da sílica, outros grupos como $-NH_2$, $-SH$, $-CN$ podem ser introduzidos (58).

Sílica-gel e CPG, que é basicamente uma forma especial de sílica-gel com porosidade controlada, têm sido largamente usadas como suporte em resinas quelantes para procedimentos de pré-concentração em linha (55, 56).

Sílica modificada com agentes silanizantes (compostos orgânicos de silicone que prontamente se ligam aos grupos silanol superficiais) pode ser utilizada como meio pré-concentrador. Porém, melhores resultados têm sido obtidos quando à sílica silanizada se adiciona o reagente bifuncional glutaraldeído e, através dele, um quelante é imobilizado. Bons resultados na pré-concentração de metais têm sido dessa forma relatados por vários autores, utilizando materiais

quelantes diversos, imobilizados sobre sílica: 8-hidroxiquinoleína (55), algas (59), proteínas (60), etc.

Outro método de coluna para separação e pré-concentração por injeção em fluxo que tem sido muito empregado é o baseado em extração por sorvente. Nessas montagens, uma fase sólida constituída por um sorvente hidrofóbico coleta complexos do analito, formados em fase aquosa. Os complexos metálicos são depois eluídos por um solvente orgânico, por exemplo, metanol ou etanol. Um sistema bastante conhecido que opera dessa forma é o constituído pelo complexante DDTC e o sorvente $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, mais metanol como eluente (61). Outro sistema emprega o complexante DDTP, o sorvente $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ e metanol (62).

2.2.3.3 – Separação em coluna e pré-concentração de selênio

A grande maioria dos trabalhos publicados ao longo de mais de uma década de pesquisa visando à separação e pré-concentração em linha dirigiu-se a metais que formam espécies catiônicas em solução. Poucos trabalhos contemplaram a pré-concentração de elementos que formam espécies aniônicas e, dentre esses, uma pequena minoria se referiu a Se.

Um trabalho estudando uma resina feita de metalotionina (proteína com propriedades quelantes, composta principalmente de cisteínas) imobilizada em CPG concluiu que, além de boas possibilidades para a pré-concentração em linha de diversos metais, também esse material acumulava ânions cromato, separando Cr (VI) de Cr (III), espécie catiônica que não era retida (60).

Uma estratégia desenvolvida especialmente para a pré-concentração de Se em linha envolveu a co-precipitação com hidróxido de lantânio, dissolução com HCl e determinação por HG-AAS. O método foi aplicado a águas de poço e abastecimento, gerando um EF=24, para um consumo de amostra de 6,7 mL,

analisando 33 amostras por hora ($CE=13,2$) (63). Os autores não fizeram referência à possibilidade da adaptação do método a outras matrizes. O estudo de interferentes foi feito de forma global, de modo que não é possível saber se os concomitantes atuam na fase de co-precipitação/dissolução, ou se na etapa de geração do hidreto.

Na medida em que meios físicos adequados forem sendo descritos, a separação e pré-concentração de Se em linha poderá ser, por exemplo, executada através de uma das técnicas de pré-concentração em coluna, que tão bons resultados têm apresentado para metais.

Esse foi o objetivo de um sistema proposto em 1994 para análise de águas naturais, envolvendo a pré-concentração de Se (IV) e Se (VI) em uma microcoluna contendo 25 mg de alumina (64). Quando a alumina é ativada em condições ácidas (HNO_3 $0,01\text{ mol L}^{-1}$), torna-se positivamente carregada, sendo possível a retenção de oxoânions, entre eles selenito e selenato. Essas duas formas foram acumuladas e posteriormente eluídas com solução de amônia 2 mol L^{-1} , sendo que Se (VI) foi convertido a Se (IV) para a determinação por HG-AAS. Os autores relatam um $EF=50$, quando 25 mL de amostra é utilizada, atingindo limites de detecção e quantificação (IUPAC) de $0,006\text{ ng mL}^{-1}$ e $0,02\text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente. As interferências provêm de outros ânions presentes, que competem pelos sítios de adsorção na alumina. Ânions nitrato não interferem, porém fosfato, cloreto e sulfato podem significar sérios problemas, dependendo da concentração.

Utilizando alumina de forma semelhante, a eluição com solução de amônia em concentrações diferenciadas para Se (IV) e Se (VI) permitiu especiação de Se em águas naturais, com determinação por ET AAS (65). Nessa publicação mais recente (1998), os autores descartam interferências de concomitantes comuns em águas naturais, mas advertem que a aplicação do método a matrizes mais

complexas (como amostras geológicas ou biológicas) acarretará a diminuição gradual da eficiência da alumina.

Um outro trabalho contém um estudo comparativo entre resinas de troca iônica, objetivando a separação e pré-concentração de Se inorgânico (Se (IV) e (VI)) em amostras de água, com detecção por ET AAS (66). As resinas experimentadas foram: Cellex T, Cellex QAE, Amberlit IRA-400, Varion AT 660, Amberlyst A-21 e Amberlyst A-26. Os melhores resultados foram obtidos com a primeira, Cellex T, que é uma resina de celulose com grupos de amina quaternária. A amostra, com pH ajustado em 6 (com HNO_3 ou NaOH) foi bombeada através de uma coluna recheada com Cellex T na forma hidróxida, Se (IV) e (VI) foram acumulados e eluídos individualmente, com HNO_3 de concentração diferenciada. O procedimento envolveu quantidades hoje consideradas "macro" para esse tipo de trabalho: volume de amostra 100 mL, volume de eluente 10 mL, LD (3σ) na faixa de 2 ng mL^{-1} . Embora um estudo de interferentes não seja apresentado, o método foi aplicado com sucesso a um material certificado de folhas de fumo, com teor de Se igual a $0,153 \mu\text{g g}^{-1}$, depois de digestão com $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$.

Ainda referindo-se a matrizes de águas naturais analisadas por ET AAS, um sistema em batelada para pré-concentração de Se foi proposto em 1997, desta vez empregando uma resina de troca aniônica na forma molibdato, preparada a partir da resina Amberlite CG 400, tipo 2, Organo. (67). A resina foi diretamente introduzida no forno, como suspensão. O método foi aplicado à água de chuva e de poço, mas os interferentes impossibilitaram seu emprego para água de mar.

Outra proposta publicada em 1997 descreveu a utilização de DDTC retido sobre espuma de poliuretano para a pré-concentração de vários elementos a partir de águas naturais, com determinação feita por ICP OES simultânea e ET AAS (68). No que se refere a Se, apenas Se (IV) forma complexo estável com DDTC, fazendo-se necessário um passo de redução para a determinação de Se (VI).

Para um volume de amostra igual a 150 mL, um LD de $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$ (3σ) foi obtido por ET AAS. O estudo de interferentes restringiu-se à influência de NaCl: para a determinação de Se, até 3,5 % de NaCl foram tolerados.

A pré-concentração de Se (IV) foi realizada também através da retenção simultânea com tetraborato, sobre resina de troca aniônica, seguida de injeção de uma zona de HCl e subsequente detecção por HG-AAS, com geração do hidreto a partir da fase sólida (69). Foram usadas as resinas Amberlite IRA-410 (melhores resultados) e Amberlyst A26, que são resinas de troca aniônica fortemente básicas, com esqueleto de estireno-divinilbenzeno. O método foi aplicado apenas a matrizes pouco complexas, como água de rio, lago e de abastecimento, obtendo-se LD (3σ) igual a $0,12 \text{ ng mL}^{-1}$, com 3 min de pré-concentração (vazão de amostra igual a 3 mL min^{-1}). Curvas analíticas foram feitas com 0, 5, 10, 15, 20 e 25 ng mL^{-1} de Se. Esse trabalho teve desdobramentos, na medida em que os autores adotaram mais recentemente a detecção por ET AAS, com retenção do hidreto diretamente sobre o atomizador de grafite recoberto com Ir ("in situ trapping") (70).

Um sistema de pré-concentração em linha relatado como bastante livre de interferências é o que faz a separação e pré-concentração de Se (e outros analitos) por retenção do complexo formado com DDTP, sobre $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. O complexo é eluído com metanol e conduzido para detecção. A estratégia foi empregada para análise de diferentes matrizes por ICP-MS e ETV-ICP-MS. A característica talvez mais atraente dessa proposta é a de que a complexação se dá em meio de HNO_3 , não sendo necessários cuidados com ajuste de pH (71, 72).

2.2.4 – A determinação de selênio em alimentos por ET AAS

No início da década de 90, ainda se identificava a falta de métodos satisfatórios, sob diversos pontos de vista, para a determinação de Se em alimentos, mas previa-se que a situação não tardaria a mudar (7). Os métodos disponíveis eram por demais trabalhosos e demorados, ou exigiam instrumental fora do alcance da maioria dos laboratórios, como o necessário para NAA.

Realmente, houve e continua havendo considerável avanço em termos da apresentação de propostas as mais variadas para métodos ao mesmo tempo confiáveis e rápidos, com esse objetivo. Contudo, a determinação de Se em alimentos mostra muito menos trabalhos desenvolvidos do que, por exemplo, a determinação desse elemento em materiais ambientais e fluidos biológicos.

Apenas um número muito pequeno das citações tratadas em 2.2.1 está relacionado a matrizes alimentícias. Mais ainda, quando o foco recai sobre tais matrizes, normalmente são estudados alimentos líquidos ou solúveis em água. Alimentos sólidos quase não são enfocados e, quando são, normalmente amostras fortificadas ou materiais certificados de amostras naturalmente mais ricas em Se, como rins e fígado bovino, ou frutos do mar (organismos marinhos), são empregados no momento da validação.

A determinação de Se por ET AAS tem um passado de muitos alertas feitos no sentido da existência de interferentes, porém os casos mais graves teriam sido contornados pela adoção de corretores de fundo mais potentes, como o baseado no efeito Zeeman, em substituição à popular lâmpada de D₂. Sérias interferências espectrais ocorriam pela absorção da radiação contínua da lâmpada de D₂ por alguns concomitantes, como Fe e P, causando interferência negativa, e sinal negativo na ausência de Se (73). Com o advento da correção de fundo Zeeman, a determinação de Se estaria livre da interferência das seguintes espécies, até

concentração de 1 000 mg L⁻¹: K, Na, Ca, P, Mg, Ti. Poderiam ser ainda toleradas concentrações de até 100 mg L⁻¹ de Al e Fe (74).

Entretanto, problemas remanescentes foram detectados, mesmo com a correção de fundo Zeeman. Parte desses problemas estaria ligada à perda de Se antes da atomização, na presença de certos concomitantes, especialmente Na e SO₄²⁻ (juntos) (75).

Um estudo abordou o efeito de Na, Mg, Ca e Sr, nas formas nitrato, cloreto e sulfato, com e sem o uso de Pd como modificador químico, na determinação de Se por ET AAS, com correção de fundo Zeeman. Foi observado que a forma do sinal atômico, o valor da absorbância integrada de Se e a estabilização desse analito é altamente dependente da natureza e concentração de cada sal. Uma importante depressão da absorbância de Se foi verificada na presença de Na₂SO₄. Por outro lado, Sr foi indicado para emprego como modificador químico na determinação de Se em presença de SO₄²⁻, porque produz melhor estabilização do analito nesse meio, em comparação com Pd, e ainda uma grande redução do sinal de fundo (76).

Frente a todos esses resultados, é natural pressupor que a determinação de Se em alimentos por ET AAS seja bastante sujeita a efeito de matriz, encorajando ao desenvolvimento de métodos que envolvam separação do analito.

Outra das fontes de problemas na determinação de Se por ET AAS, mesmo quando instrumental e conceitos modernos são usados, reside no comportamento diferente das diversas formas de Se, presentes em amostras reais. Esse assunto tem sido motivo de estudo por mais de uma década, principalmente no que se refere à introdução no espectrômetro de matrizes de fluidos biológicos, levadas para análise sem prévia digestão.

Welz e colaboradores verificaram que os diversos estados de oxidação de Se não são igualmente estabilizados por alguns dos modificadores químicos mais comuns, como Ni ou Cu, e sugeriram o uso de $\text{Cu-Mg(NO}_3)_2$, aliado a um programa otimizado de temperatura e tempo para o forno de grafite. No entanto, visando à melhor exatidão e em caso de dúvida, aconselharam a digestão da amostra, para converter o elemento ao mesmo estado de oxidação presente nas soluções de referência, preferentemente a forma Se (IV) (77).

Posteriormente, a estabilidade térmica de selenito, selenato, selenometionina e trimetilselenônio (espécies de Se presentes em fluidos biológicos) foi estudada, experimentando diversos modificadores químicos: Ni, Cu, Pd (todos como nitrato), $\text{Mg(NO}_3)_2$ ou ainda $\text{Cu-Mg(NO}_3)_2$ e $\text{Pd-Mg(NO}_3)_2$. Nenhum desses modificadores conseguiu estabilizar as quatro espécies igualmente. Dentro dessa realidade, um modificador constituído por 7,5 μg de Pd + 5 μg de $\text{Mg(NO}_3)_2$ foi considerado como a melhor escolha entre os estudados, para a determinação de Se em soro sangüíneo e urina (78).

Mais recentemente, outros pesquisadores compararam as estabilidades térmicas das mesmas quatro espécies de Se, porém em solução aquosa e em plasma sangüíneo, utilizando modificadores químicos à base de Pd e $\text{Pd-Mg(NO}_3)_2$. No estudo em solução aquosa, observaram que a sensibilidade para selenato foi pior do que para selenito (mas não no plasma, o que poderia indicar que o selenato acaba reduzido a selenito), e que a presença de cloretos afetou diferentemente as diversas espécies. Verificaram que a sensibilidade obtida com selenometionina foi inferior à obtida com selenito, no plasma (porém, segundo os autores, isso não inviabilizaria o método, dentro da incerteza normalmente aceita para a determinação de traços em materiais biológicos). Também relataram que não houve sucesso na estabilização do trimetilselenônio, (de acordo com os autores, isso poderia ser negligenciado, porque esse metabólito raramente é encontrado em plasma). Salientaram que a adição de $\text{Mg(NO}_3)_2$ a Pd (20 μg) não

melhorou a determinação de Se, em termos de estabilização das suas diferentes formas, ou de acréscimo em sensibilidade (79).

Assim, pode-se concluir que, no caso da determinação de Se em alimentos, que são matrizes complexas, tanto pela presença de concomitantes, como pela alta incidência de Se (II), um passo de digestão completa da amostra, antes da introdução no espectrômetro, é substancialmente aconselhável, para maior exatidão.

Porém, é preciso ainda considerar o que diz a literatura, em termos de qual tipo de digestão seria suficiente.

Embora haja relatos de digestões incompletas de amostras biológicas quando apenas HNO_3 é utilizado (80), Kingston e colaboradores demonstraram que, em sistemas pressurizados de digestão por microondas, onde as amostras são rapidamente aquecidas a temperaturas superiores a $180\text{ }^\circ\text{C}$, esse reagente sozinho garante digeridos apropriados para análise por ET AAS, com total decomposição dos compostos orgânicos contendo Se (81).

Dessa forma, mas também pela rapidez e simplicidade, a digestão por microondas em sistema fechado é uma boa escolha para encaminhar a determinação de Se em alimentos por ET AAS, embora outras opções existam e possam ser usadas.

Embora todo o conhecimento prévio acerca das dificuldades inerentes, Hanna e colaboradores relataram que foi tentada a determinação direta de Se em suplementos nutricionais líquidos via ET AAS. As amostras foram injetadas diretamente no atomizador, ou digeridas a seco ou a úmido, antes da determinação. Em todos os casos, as melhores recuperações de Se adicionado só foram obtidas quando a amostra original foi muito diluída, chegando próximo ao LD, originando resultados imprecisos. Além disso, o uso de padrões aquosos

permitiu, na melhor das hipóteses, 70 % de recuperação. Assim, foi feita a opção por separar o analito da matriz, através de um método em linha, envolvendo a geração do hidreto e acumulação "in situ" no atomizador de grafite (pré-tratado com Ir), efetuando a determinação por ET AAS. Obtiveram recuperações satisfatórias, executando calibração diretamente com padrões aquosos. Entretanto, as amostras utilizadas eram bastante ricas em Se (82).

Ocasionalmente, a literatura apresenta resultados aparentemente contraditórios. Por exemplo, em uma comparação entre métodos de digestão (microondas em frascos fechados ou microondas focalizado) para grãos e seus produtos (trigo, milho e arroz), vários materiais certificados foram analisados por ET AAS, sem separação de matriz, sendo que poucos resultados de Se foram estatisticamente rejeitados. Como modificador químico, Pd+Mg(NO₃)₂ foi usado (83). Esses bons resultados para alimentos com baixos teores de Se talvez possam ser creditados à natureza química das matrizes (relativamente pobres em sais minerais) e ao emprego de tubos de grafite com extremidades semi-cerradas, que melhoraram o LD.

Outros pesquisadores, determinando Se em peixes por ET AAS e utilizando Pd como modificador químico (escolhido como melhor opção entre três possibilidades testadas: Pd, Mg(NO₃)₂ e Pd+Mg(NO₃)₂), encontraram variações de -45 a +37 % na absorbância do analito, no estudo de interferentes. Para aumentar a seletividade, adicionaram oxalato de amônio. A introdução da amostra no espectrômetro foi feita em suspensões estabilizadas ou após digestão em microondas, com resultados comparáveis (surpreendentemente, melhor precisão foi obtida na introdução de suspensões). Um material certificado (peixe) contendo 1,7 µg g⁻¹ de Se foi analisado pelo método, com resultados satisfatórios. Peixes foram analisados e indicados como boa fonte desse nutriente (84).

Ainda envolvendo matrizes ricas em Se, correspondentes a diversos frutos do mar (organismos marinhos), uma proposta para digestão por microondas em

frascos de pequeno volume (7mL) foi apresentada, com determinação por ET AAS. Os autores empregaram um modificador misto de Pd+Mg(NO₃)₂ e não há referência sobre outras providências para contornar interferentes provindos da matriz. Foram analisados materiais certificados contendo teores consideráveis de Se (até 7,3 µg g⁻¹) (85).

Outros autores indicaram o emprego de Rh, usado na forma (NH₄)₃RhCl₆+ácido cítrico, como providência suficiente para contornar interferências espectrais de P na determinação de Se por ET AAS, em matrizes como frutos do mar e fígado (33). A comparação com Pd apontou melhores resultados de estabilização obtidos com Rh.

Métodos para alimentos sólidos pobres em Se serão, provavelmente, mais elaborados do que os que se referem a alimentos líquidos ou ricos em Se. Contornar interferências, mantendo um bom LD, será um desafio maior.

No caso específico da determinação de Se em alimentos, o trabalho de eliminar interferentes deve considerar a grande diversidade na composição química de tais matrizes. Além disso, como foi visto em 2.1.3, o teor de Se em alimentos é muito variável. Assim, não há garantia de que um método descrito para um certo alimento seja aplicável a outro.

Esse motivo estimula a pesquisa de métodos que eliminem pelo menos parte dos interferentes em etapas anteriores à apresentação da amostra ao instrumental analítico. Pode-se formular a hipótese de que, quanto mais um pré-tratamento da amostra separar Se de seus concomitantes, maior será a possibilidade de que o método venha a ser utilizado para tipos diferentes de alimentos. Porém, no intuito de separar o analito de seus concomitantes, não é possível deixar que a concentração do elemento caia a níveis não-detectáveis. Ao contrário, ao separar Se, pode-se também tentar pré-concentrá-lo, melhorando o LD.

Um artigo publicado em 1991 (86) contém uma proposta de pré-concentração de Se com DDTC, a partir de rações, tecidos vegetais e tecidos animais. O procedimento sugerido prevê extração do complexo Se-DDTC em clorofórmio, com posterior determinação de Se por ET AAS. Um dos méritos dessa proposta é mostrar que é possível utilizar a formação do complexo Se-DDTC para quantificar Se em matrizes complexas. A partir daí, pode-se tentar desenvolver um procedimento que requeira menos manipulação, seja mais rápido e consuma menor quantidade de amostras e reagentes. O reagente DDTC tem sido eventualmente utilizado na pré-concentração de Se a partir de amostras de águas, quer utilizando extração líquido-líquido (87), quer empregando coprecipitação (88).

Um trabalho mais recente (89) sugere a pré-concentração de Se (e outros analitos) por coprecipitação com ditiofosfatos, a partir de amostras biológicas, mas a determinação foi efetuada por ICP OES. O procedimento provavelmente não deva ser completado em um dia de trabalho, porque é necessário aguardar 6 horas para que a precipitação ocorra. Além disso, consideráveis massas de amostra são consumidas (5 g por via), bem como de reagentes.

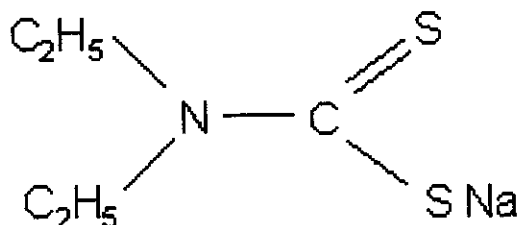
Por outro lado, como citado antes, o reagente DDTP levou a bons resultados na pré-concentração de Se, a partir de digeridos de diferentes tipos de matrizes (71, 72).

Portanto, ambos os reagentes, DDTC e DDTP, merecem ser focalizados.

2.2.4.1 – O reagente complexante DDTC

O DDTC é utilizado desde 1908 em Química Analítica. Tem sido usado como reagente espectrofotométrico ou precipitante, ou ainda em extrações. O sal

sódico, $(C_5H_{10}NS_2Na.3H_2O)$, forma bastante utilizada, é preparado pela reação da dietilamina com dissulfeto de carbono, em solução aquosa de NaOH e está comercialmente disponível. Tem a seguinte fórmula estrutural:



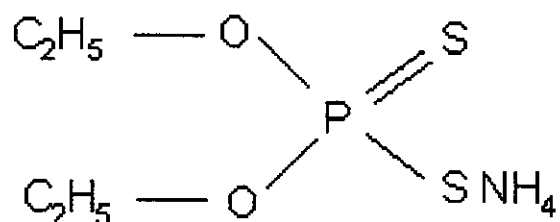
O reagente sólido é estável, porém em soluções ácidas se decompõe rapidamente. Uma solução aquosa a 1 % m/v pode ser guardada por algumas semanas, enquanto a solução a 0,1 % m/v se mantém por uma semana (frasco âmbar). É quase insolúvel em solventes não-polares, entretanto é solúvel em álcoois. O sal de amônio também é empregado, às vezes com vantagens.

O DDTC comporta-se como um ligante univalente bidentado, tendo dois átomos de enxofre doadores de elétrons. Reage com mais de 30 elementos em pH maior do que 4, mas as reações ficam mais seletivas em soluções mais ácidas, com preferência para cátions “moles”.

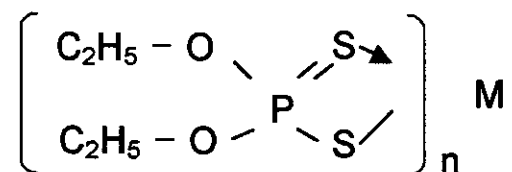
No caso da reação com Se, reage com a forma Se (IV), estabelecendo um quelato com a fórmula SeL_4 , onde L é o ligante (90, 91).

2.2.4.2 – O reagente complexante DDTP

Foi introduzido em 1949, sendo mais seletivo do que DDTC. A fórmula estrutural do sal de amônio $[(C_2H_5O)_2P(S)SNH_4]$, forma que tem sido mais empregada, é:



Em termos de Se, reage apenas com Se (IV). Pode reagir também com Ag, As, Au (III), Bi, Cd, Cu (II), Fe (III), Hg (II), In (III), Mo (VI), Ni (II), Pb, Pd (II), Sb (III), Sn (II) e Te (IV). Forma quelatos do tipo:



onde M é o elemento complexado (91).

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Instrumentação

O trabalho foi executado em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Zeeman 4100 ZL, marca Perkin Elmer, dotado de amostrador automático AS-70 e controlado por computador. As leituras foram feitas em absorbância integrada (modo área de pico) a 196,0 nm, com fenda de 2,0 nm, usando LCO de Se, marca Varian ou IST, em corrente de 12 mA. Como gás de purga e proteção, Ar de pureza 99,999% foi usado, fornecido pela Air Liquide.

Foram utilizados atomizadores de grafite do tipo THGA, com recobrimento de grafite pirolítico e plataforma de L'vov incorporada, fornecidos pelo mesmo fabricante do espectrômetro e condicionados segundo indicado pelo fornecedor.

Para o bombeamento de soluções através de colunas, foi empregada uma bomba peristáltica integrada ao gerador de vapor Varian VGA-77, com tubos de cabeça de bomba feitos de Tygon e conexões de tubos de PTFE com diâmetro interno de 0,8 mm.

Para as digestões de amostras, duas opções foram usadas: 1. um sistema fechado de preparação por microondas, modelo MDS-2000, da CEM Corporation; 2. uma bomba de oxigênio calorimétrica, fornecida pela Parr Instrument Company, utilizando oxigênio comercial sob pressão.

O preparo de soluções e medição do volume de eluentes foi feito com micropipetas Eppendorf e Transferpette, com pontas ejetáveis. Pesagens foram efetuadas em balança analítica eletrônica Sartorius BP 210 S.

3.2 – Reagentes e soluções

3.2.1 – Água

A água empregada foi purificada em sistema Milli-Q, da Millipore (resistividade $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

3.2.2 – Etanol

No trabalho envolvendo pré-concentração de Se com DDTC ou DDTP, foi usado álcool etílico p.a., 95%, reagente analítico grau ACS marca Reagen, para eluição do complexo DDTC-Se ou DDTP-Se.

3.2.3 – Soluções de HNO_3

Todas as soluções de HNO_3 necessárias ao trabalho foram preparadas por diluição do HNO_3 concentrado ($14,4 \text{ mol L}^{-1}$) da linha Suprapur Merck, exceto a solução de limpeza referida em 3.3, feita a partir de HNO_3 concentrado grau analítico, marca Merck ou Carlo Erba.

3.2.4 – Soluções de Se

A solução-estoque 1000 mg L^{-1} de Se foi preparada com 1,000 g de Se em pó marca Merck (99,5 % pureza mínima), dissolvido por aquecimento em 80 mL de HNO_3 $7,22 \text{ mol L}^{-1}$ e diluído a 1000 mL, em balão volumétrico. As soluções de Se empregadas ao longo do trabalho foram obtidas por diluição dessa solução-estoque.

3.2.5 – Solução de modificador químico 1 g L⁻¹ de Rh

A solução de modificador químico 1 g L⁻¹ de Rh foi preparada a partir de RhCl₃.3H₂O para síntese da Merck, dissolvido em água. Para uso opcional, outra solução 1 g L⁻¹ foi preparada como a anterior, porém teve o ânion Cl⁻ removido, através de sucessivas evaporações e redissoluções em HNO₃ (concentração final em HNO₃: 1 % v/v ou 0,14 mol L⁻¹).

3.2.6 – Solução de modificador químico 1 g L⁻¹ de Ni

Esta solução foi preparada em HNO₃ 1 % v/v (0,14 mol L⁻¹), a partir de ampola Titrisol Merck (Ni como NiCl₂), por diluição segundo instruções do fabricante.

3.2.7 – Solução de modificador químico 1 g L⁻¹ de Pd

Esta solução foi preparada por diluição de 10 vezes, em água, da solução de Pd 10 g L⁻¹, 15 % em HNO₃, fornecida pela Merck.

3.2.8 – Solução de modificador químico 1 g L⁻¹ de Ir

Esta solução foi preparada em HNO₃ 1,2 % v/v (0,17 mol L⁻¹), a partir de IrCl₃.1,5H₂O para síntese (62,2 % Ir), da Sigma.

3.2.9 – Soluções de DDTP

As soluções de DDTP foram preparadas a partir do sal de amônio do dietil ditiofosfato (C₂H₅O)₂P(S)SNH₄ 95 %, fornecido pela Aldrich, dissolvido em água, em diversas concentrações: 2 % m/v (2 g do sal a 100mL); 1 % m/v (1 g do sal a 100 mL); 0,5 % m/v (0,5 g do sal a 100 mL) e assim por diante. Cada nova

solução foi purificada através de passagem sobre minicoluna recheada com 30 mg de $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$.

3.2.10 – Soluções de DDTC

As soluções de DDTC foram preparadas a partir de dietilditiocarbamato de sódio (triidrato) $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NNaS}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, p.a., mínimo 99 % de pureza, marca Merck, dissolvido em água em diversas concentrações, por exemplo, 1 % m/v (1g do sal a 100 mL) e assim por diante. Cada nova solução foi purificada através de passagem sobre minicoluna recheada com 30 mg de $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, de forma idêntica ao descrito para as soluções de DDTP.

3.2.11 – Materiais certificados

Foram utilizados os seguintes materiais certificados de referência: Animal Blood A-13 e Fish Tissue Ma-B-3/TM, procedentes da International Atomic Energy Agency – IAEA; Bovine Liver BCR 185, Cod Muscle CRM 422, Mussel Tissue CRM 278, Pig Kidney CRM 186 e Wholemeal Flour BCR 189, fornecidos pelo Community Bureau of Reference – BCR.

3.2.12 – Outros reagentes

Para os experimentos relativos à pré-concentração de Se com reagentes imobilizados em CPG, foi utilizado o CPG marca Sigma, produto PG75-120, 80-120 mesh, diâmetro médio de poro igual a 75 Å, volume de poro $0,47 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e aminopropiltrietóxi-silano para síntese (mínimo 99 %) da Merck. Para a pré-concentração com DDTC e DDTP, foi empregada sílica gel 100 C_{18} – fase reversa, para uso em cromatografia de coluna ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$).

Os demais reagentes utilizados ao longo do trabalho foram p.a. Merck ou Carlo Erba.

3.3 – Procedimentos

3.3.1 – Limpeza de vidraria e outros materiais

Antes do uso, a vidraria e o material de polietileno, polipropileno e outros polímeros foram sempre deixados de molho por, no mínimo, 24 horas em solução de HNO_3 p.a. $0,28 \text{ mol L}^{-1}$. A solução nítrica foi depois descartada e o material foi enxaguado com água desionizada em abundância, por 5 vezes, mantendo-se o último enxágüe por 24 horas ou mais. Finalmente, o material foi posto a escorrer em secador plástico apropriado, até secar.

3.3.2 – Forno de grafite

O volume total injetado no atomizador THGA via amostrador automático, a cada ciclo, foi sempre igual a $20 \mu\text{L}$. O diluente empregado foi HNO_3 0,2 % v/v ($0,028 \text{ mol L}^{-1}$) e o modificador químico foi Rh ($5 \mu\text{g}$), salvo indicação diferente. O programa usual de forno, previamente otimizado, foi como indicado na Tabela 3.1. O programa que consta na Tabela 3.2 omite o passo de pirólise e foi usado opcionalmente no método de pré-concentração de Se com DDTP- $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$.

Tabela 3.1. Programa usual de temperatura e tempo do forno de grafite, para a determinação de Se.

Passo	Temperatura, °C	Rampa, s	Tempo na temperatura, s	Vazão de Ar mL min^{-1}
Secagem 1	110	1	30	250
Secagem 2	130	5	50	250
Pirólise	1300	10	20	250
Atomização	1900	0	5	0
Limpeza	2400	1	2	250

Tabela 3.2. Programa opcional (sem pirólise) de temperatura e tempo do forno de grafite, para a determinação de Se após pré-concentração com DDTP-SiO₂-C₁₈.

Passo	Temperatura, °C	Rampa, s	Tempo na temperatura, s	Vazão de Ar, mL min ⁻¹
Secagem 1	110	1	30	250
Secagem 2	200	5	50	250
Atomização	1900	0	5	0
Limpeza	2400	1	2	250

As condições de secagem foram otimizadas no início do trabalho, com o auxílio de um espelho do tipo odontológico, para observar a evolução de vapores. A temperatura de atomização também foi inicialmente otimizada e fixada para todo o trabalho. As demais condições foram determinadas no decorrer do projeto.

3.3.3 – Digestão de amostras

3.3.3.1 – Forno de microondas

Massas entre 0,2 e 0,3 g de amostra foram pesadas com exatidão e transferidas para os frascos de reação próprios, fornecidos pelo fabricante do forno de microondas. A cada frasco, foram adicionados 1 mL de água e 2 mL de HNO₃ concentrado. Os frascos foram fechados de acordo com o manual do equipamento e, em seguida, foram instalados no carrossel do forno de microondas e o programa indicado na Tabela 3.3 foi iniciado.

Opcionalmente, outro programa (Tabela 3.4), com mais oxidante, também foi experimentado, onde a cada frasco foram adicionados 5 mL de HNO₃ concentrado, em lugar de 1 mL de água e 2 mL de HNO₃ concentrado.

Tabela 3.3. Programa do forno de microondas (seis frascos) para a digestão de amostras de alimentos (0,2 a 0,3 g)

Estágio	1	2	3	4
Potência (W)	441	441	441	441
Pressão (MPa)	0,207	0,345	0,689	0,827
Tempo (min)	10	10	10	5
Tempo na pressão (min)	10	10	10	5
Exaustão (%)	100	100	100	100

Tabela 3.4. Programa opcional do forno de microondas (seis frascos) para a digestão de amostras de alimentos (0,2 a 0,3 g)

Estágio	1	2	3
Potência (W)	252	252	252
Pressão (MPa)	0,276	0,586	1,03
Tempo (min)	6	6	10
Tempo na pressão (min)	3	3	5
Exaustão (%)	100	100	100

Uma vez completado qualquer um dos dois programas, o carrossel foi deixado ainda girar por, no mínimo, mais 15 min, para arrefecimento. Em prosseguimento, os frascos resfriados foram abertos e os conteúdos transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 25 mL, avolumando-se com água.

3.3.3.2 – Bomba de oxigênio

No procedimento envolvendo a bomba de oxigênio, massas variáveis de amostra (até cerca de 1g) foram transferidas para cadinho próprio, que foi colocado em suporte especial. Um fio condutor foi passado pela amostra e 10 mL de HNO_3 10 % v/v ($1,4 \text{ mol L}^{-1}$) foram colocados no fundo da bomba. Em seguida, o cadinho e seu suporte foram colocados dentro da bomba, ficando suspensos sobre o líquido. A bomba foi fechada, introduzindo-se oxigênio até 2,53 MPa. Depois da pressurização, a bomba foi colocada em sua luva de refrigeração com água. Os contatos que ligam a bomba à unidade de ignição foram instalados e a ignição (que é instantânea) foi disparada. O agitador da água de refrigeração foi ligado e deixado funcionar por pelo menos 10 min. Depois do arrefecimento, o respiro da bomba foi afrouxado lentamente (tempo total 2 min), todo o conjunto foi aberto e os conteúdos foram quantitativamente transferidos para balão volumétrico de 25 ou 50 mL. Pequenos resíduos sólidos foram removidos por filtração.

3.3.4 – Procedimento para preparação do CPG silanizado

A preparação do CPG silanizado baseou-se no procedimento descrito na referência 60 e é sumarizada abaixo.

Primeiramente, o CPG foi ativado em ácido, através da ebulição de 1g do material em 10 mL de HNO_3 $0,72 \text{ mol L}^{-1}$, por 30 min.

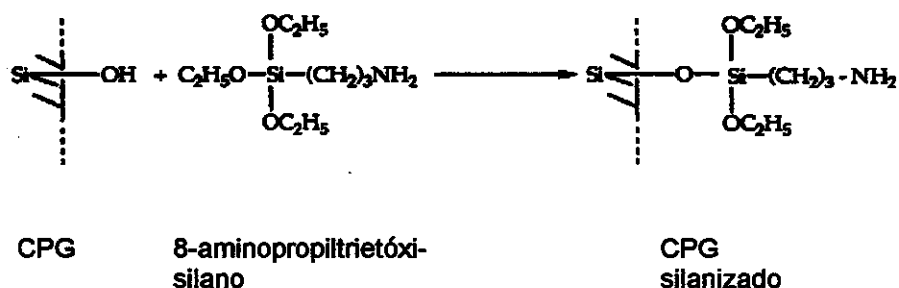
Em seguida, o CPG ativado foi filtrado através de filtro de vidro sinterizado sob vácuo, lavado com água e finalmente seco em estufa a 95°C , por 1 h.

O CPG foi então modificado com o reagente silanizante 8-aminopropiltriétoxi-silano. Uma solução foi preparada com 2,5 mL desse reagente em 25 mL de água, o pH sendo ajustado a 3,45 com HCl 6 mol L^{-1} . O CPG ativado

e seco foi adicionado a essa solução e a mistura foi aquecida em banho-maria a 75 °C por 150 min, com rotação do frasco a cada 15 min.

O CPG silanizado foi então filtrado através de filtro de vidro sinterizado, lavado e posto para secar como antes.

O processo de modificação foi executado duas vezes, para assegurar bom recobrimento do CPG, cuja reação pode ser representada como abaixo:



3.3.5 – Procedimento de pré-concentração com DDTC ou DDTP

Otimizou-se um procedimento manual, empregando bomba peristáltica com vazão de 5 mL min⁻¹ e uma minicoluna de 1,5 cm, recheada com 30 mg de SiO₂-C₁₈. Depois da digestão nítrica, uma alíquota (normalmente 0,5 a 2 mL) da solução da amostra foi diluída a 5 mL (alimentos com teor esperado de Se maior do que 1 mg kg⁻¹) ou 25 mL (alimentos com 0,05 a 1 mg kg⁻¹ de Se) com HNO₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L⁻¹), de forma a diluir a matriz, que pode afetar a análise. Então, 1 mL de solução de complexante (DDTC ou DDTP) foi adicionado, a mistura foi homogeneizada e o complexo formado foi adsorvido na minicoluna. O complexo foi depois eluído com 200 µL de etanol e o eluato foi coletado diretamente na cubeta do amostrador automático, para imediata determinação de Se por ET AAS. Entre dois ciclos, tubos e minicoluna foram lavados com HNO₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L⁻¹). As curvas analíticas seguiram o mesmo procedimento, sendo preparadas

com soluções de Se (IV), em HNO_3 0,2 % v/v ($0,028 \text{ mol L}^{-1}$), obtidas a partir de diluição da solução-estoque. Cada ciclo de pré-concentração, para o procedimento com 25 mL de digerido diluído, demorou cerca de 6 min.

A Figura 3.1 mostra um desenho esquemático, ilustrando tal procedimento.

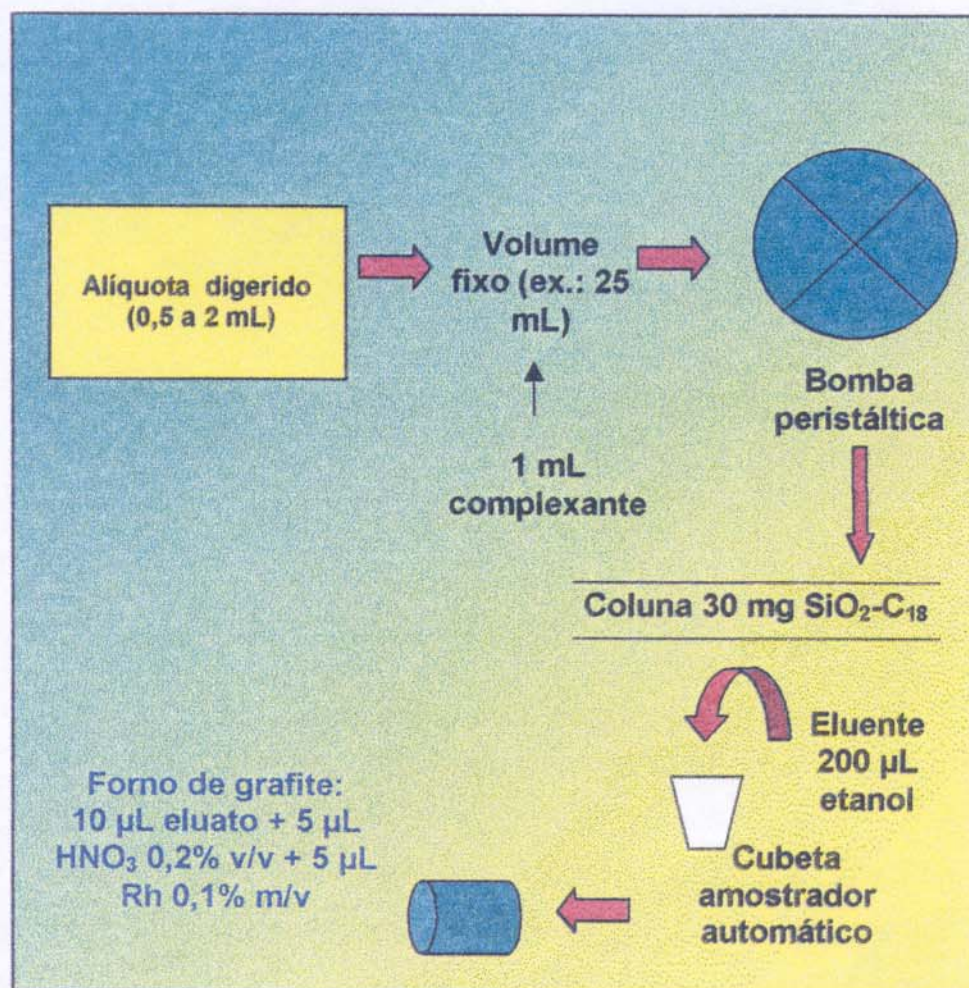


Figura 3.1 Desenho esquemático representando o procedimento de pré-concentração utilizado com DDTC- $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ ou DDTP- $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor organização dos conteúdos, este capítulo encontra-se dividido em três partes, que convergem para alcançar o objetivo do projeto (1.2). O trabalho culmina com a validação de um dos métodos propostos para a determinação de baixos teores de Se em alimentos, através de um exercício interlaboratorial nacional.

A primeira parte reúne resultados obtidos em estudos sobre o efeito da presença de concomitantes na absorbância de Se.

A segunda parte trata de experimentos realizados em torno do tema modificadores químicos para Se em ET AAS.

A terceira parte refere-se à proposição de métodos para pré-concentração de Se a partir de matrizes alimentícias, com determinação por ET AAS.

4.1 – Estudo sobre o efeito de concomitantes na absorbância de Se

Como visto na revisão bibliográfica, há motivos para preocupação com o efeito de matriz na determinação de Se por ET AAS, mesmo quando o corretor de fundo Zeeman e todo o conceito STPF são utilizados.

No presente trabalho, vários experimentos foram efetuados para averiguar o possível efeito de concomitantes típicos de matrizes alimentícias, sobre a absorbância de Se. Foram estudados minerais que normalmente existem em alimentos e, ao mesmo tempo, são potenciais interferentes, de acordo com a literatura disponível. Com base em supostos intervalos mais comuns de concentração dos minerais em alimentos (5, 8), decidiu-se a faixa de concentração

de cada espécie a ser estudada, pressupondo que a diluição de uma amostra sólida, ao ser digerida, varie de 50 a 100 vezes. A Tabela 4.1, resume esses intervalos .

Tabela 4.1 Intervalos supostos de concentração de minerais em alimentos, para fins de estudo de interferência sobre Se (5, 8).

Mineral	Concentração mínima, mg kg⁻¹	Concentração máxima, mg kg⁻¹
Ca	100 (frutas, carne, peixe)	8000 (queijos gordos)
P	1000 (frutas, cereais)	5000 (queijos)
Fe	3 (frutas, peixes brancos)	90 (fígado)
Cl	1000 (alimentos naturais)	25000 (alimentos salgados)
Al	0,1 (verduras, carnes)	100 (misturas pré-prontas)

Uma observação sobre o valor máximo indicado para Al na Tabela 4.1 é oportuna. Numerosos compostos de Al são usados como aditivos em alimentos, principalmente como acidulantes em fermentos, mas também como emulsificantes na produção de queijos, ligantes para produtos cárneos, etc. Farinhas e misturas pré-prontas para bolos e pães podem conter mais de 100 mg kg⁻¹ de Al (5).

Também foi avaliado o efeito de concomitantes que podem ser aportados por reagentes, por exemplo, HNO₃ e HCl.

Ao longo desta parte do trabalho, foi empregado o modificador químico Pd (5 µg), por ser um dos mais utilizados para a determinação de Se por ET AAS. Empregou-se o programa do forno de grafite indicado na Tabela 3.1, com pirólise a 1200 °C. Alguns experimentos foram repetidos utilizando outros modificadores químicos, para fins de comparação. Nesses casos, o programa do forno de grafite foi o mesmo usado com Pd, porém com temperatura de pirólise mais alta, conforme explicitado caso a caso.

Experimentos feitos com concentrações crescentes de HNO_3 ou HCl sobre massas constantes de Se mostraram que é possível trabalhar em meio de até 0,5 % v/v ($0,072 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,047 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente) de qualquer um dos ácidos, sem observar variação significativa (nível de significância de 99 %) na absorbância do analito, comparando com uma concentração ácida de cerca de 0,1 % v/v ($0,014 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,009 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente).

4.1.1 – Estudo da presença isolada de P, Ca e Al sobre a absorbância de Se

Testes envolvendo a adição isolada de massas crescentes de P como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sobre massas constantes de Se foram realizados e resultaram em que não há alteração significativa da absorbância do analito até, pelo menos, cerca de 1 μg de P adicionado sobre 0,4 ng de Se (teste t , nível de significância de 95 %). Observou-se que, embora a forma e a altura do pulso atômico de Se seja bastante alterada com a adição de P, a área do pulso permanece constante, mesmo em adições bastante altas desse potencial interferente. A Figura 4.1, referente ao experimento repetido com 0,8 ng de Se, mostra a variação da altura dos pulsos.

Outros testes semelhantes, porém com adições de Ca como CaCl_2 sobre Se, levaram a concluir que não há variação significativa da absorbância de Se até, pelo menos, 1 μg de Ca sobre 0,4 ng de Se (teste t , nível de significância de 95 %). Assim, considerados isoladamente e um de cada vez, os elementos P e Ca não representariam problemas na determinação de Se na maioria das matrizes alimentícias, à luz da Tabela 4.1.

Já quando adições de Al na forma de cloreto foram feitas sobre Se, surgiram indícios de interferência.

Quantidades crescentes de Al como nitrato e, posteriormente, como cloreto, foram adicionadas a Se. As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram os resultados, onde cada ponto representa a média de 5 replicatas.

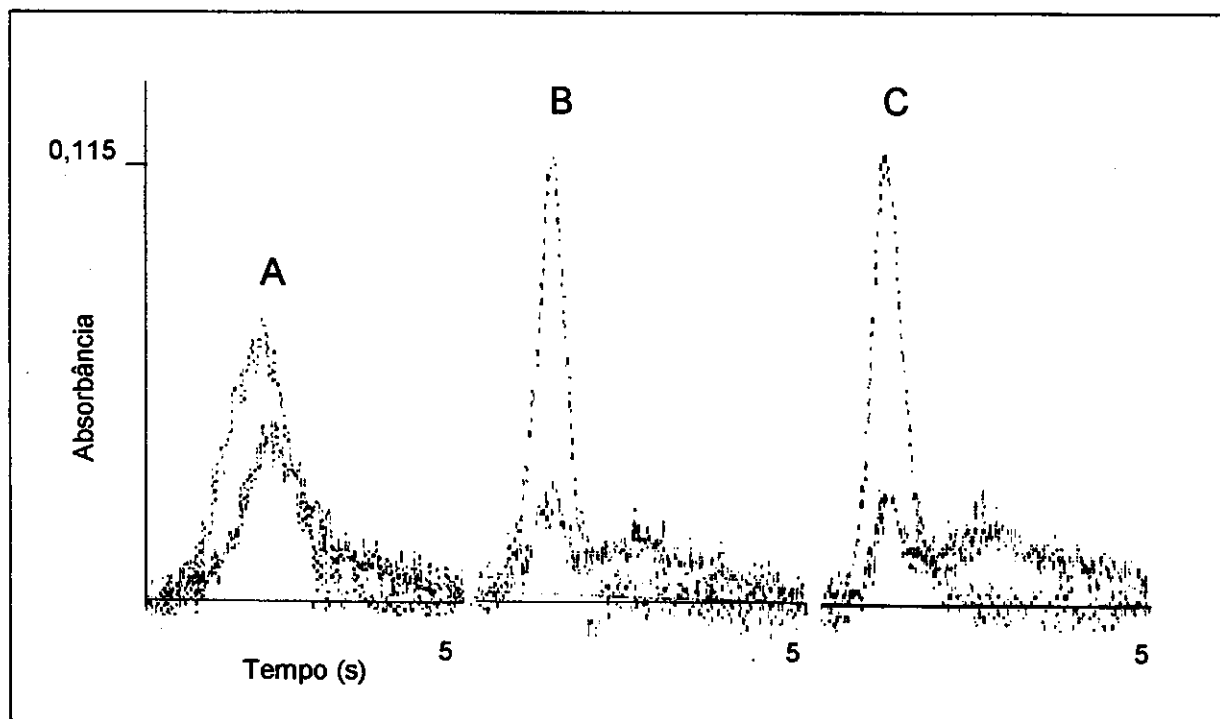


Figura 4.1 Pulsos atômicos (sempre os mais altos) e de fundo, obtidos para 0,8 ng de Se, nas seguintes situações: A – sem adição de P; B – com adição de 1,5 μg de P; C – com adição de 4,2 μg de P. Modificador químico Pd (5 μg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C. P adicionado como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Enquanto quantidades crescentes de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ produziram absorbância de 0,4 ng de Se sem variações significativas (Figura 4.2), o contrário aconteceu com AlCl_3 (Figura 4.3). A comparação entre as respostas obtidas com zero e com 2,4 ng de Al, adicionado como cloreto (correspondendo à concentração final de 0,12 mg L^{-1} de Al e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se, sendo o volume total de 20 μL dentro do atomizador de grafite) mostrou diferença significativa pelo teste *t* de comparação entre duas médias experimentais (nível de significância de 95 % e mesmo 99 %) (92).

Uma variação significativa, resultante da presença de relativamente pequena quantidade de Al, em termos da Tabela 4.1, pode significar erro na determinação de Se em certos alimentos. O teor médio de Al em alimentos foi avaliado como ficando ao redor de 10 mg kg^{-1} (7), o que representaria $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Al na solução para análise, se a amostra fosse diluída 100 vezes, a partir do sólido.

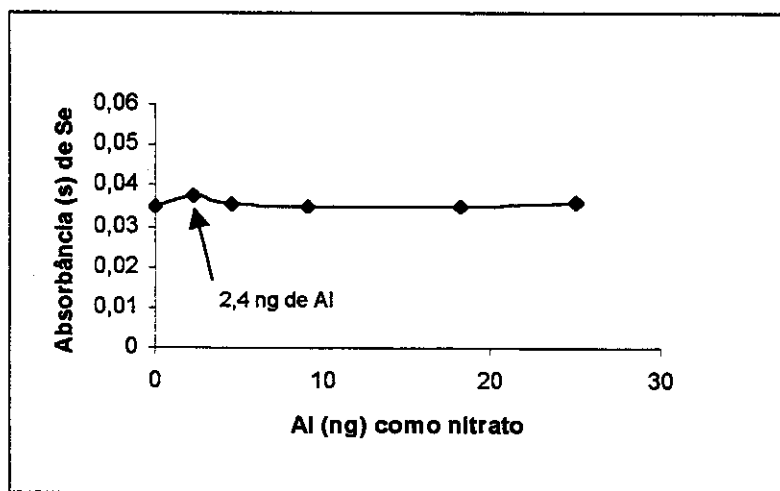


Figura 4.2 Efeito da presença de massas crescentes de Al como $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ sobre a absorbância integrada de 0,4 ng de Se. Modificador químico Pd (5 μg), temperatura de pirólise igual a 1200°C .

Foram utilizadas, propositadamente, baixas concentrações de Se nos experimentos cujos resultados são ilustrados pelas Figuras 4.2 a 4.5, buscando representar da melhor forma possível situações reais.

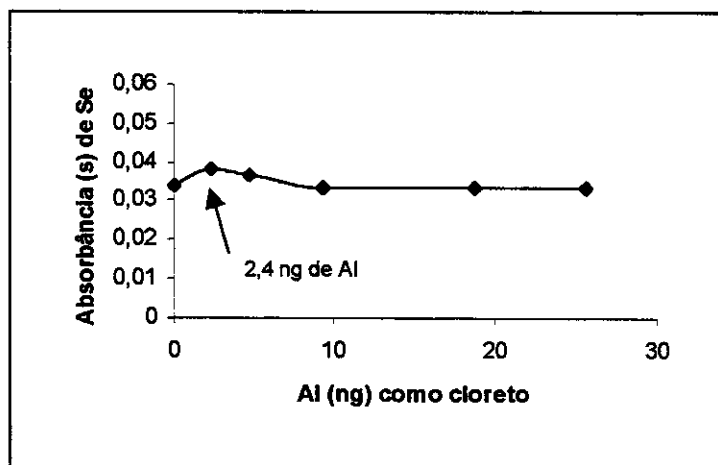


Figura 4.3 Efeito da presença de massas crescentes de Al como AlCl_3 sobre a absorbância integrada de 0,4 ng de Se. Modificador químico Pd (5 μg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C.

O experimento foi repetido, alterando a massa de Se para 0,8 ng e mantendo o mesmo intervalo de adições de Al, porém com mais pontos intermediários. Novamente, uma variação muito significativa (99 %) no sinal foi observada entre dois pontos consecutivos, no início da faixa de concentrações estudada (1,8 e 2,6 ng de Al), quando AlCl_3 foi utilizado (ver Figura 4.4).

Experimento semelhante foi realizado utilizando Rh como modificador químico (temperatura de pirólise igual a 1300 °C), explorando mais a região de menores massas de Al adicionadas. Mais uma vez, variações significativas (95 %) ocorreram na absorbância de Se, como é possível visualizar através da Figura 4.5.

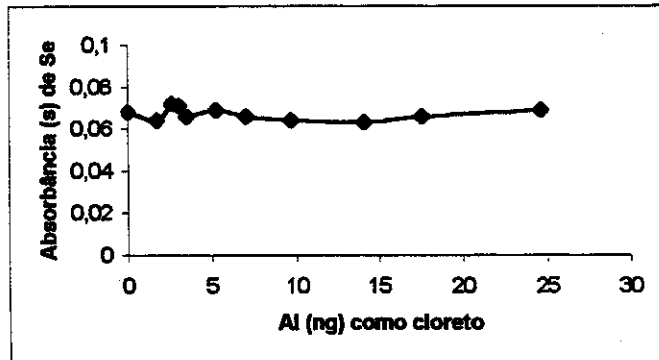


Figura 4.4 Efeito da presença de massas crescentes de Al como AlCl_3 sobre a absorbância integrada de 0,8 ng de Se. Modificador químico Pd (5 μg), temperatura de pirólise igual a 1200 $^{\circ}\text{C}$.

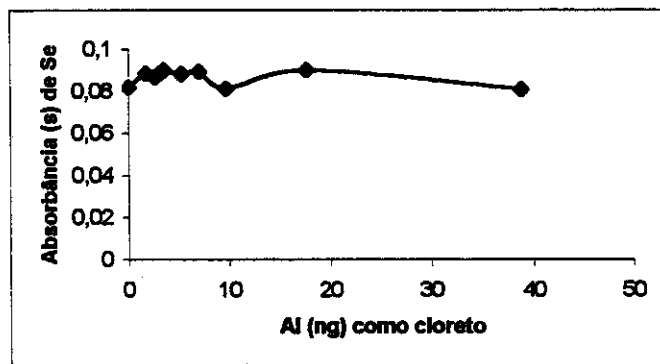


Figura 4.5 Efeito da presença de massas crescentes de Al como AlCl_3 sobre a absorbância integrada de 0,8 ng de Se. Modificador químico Rh (5 μg), temperatura de pirólise 1300 $^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 – Estudo da presença concomitante de P, Fe, Al e Cl

Uma consideração crítica que pode ser levantada com referência à maioria dos estudos de possíveis interferentes em uma certa determinação é a de que, normalmente, são abordados efeitos de espécies concomitantes, de forma isolada. Em outras palavras, a possível interação entre elas é negligenciada. Daí pode

provir um descompasso entre os resultados dos experimentos e as dificuldades encontradas com matrizes reais.

Assim, um experimento do tipo 2^4 fatorial (ANOVA com quatro variáveis independentes) foi realizado, envolvendo quatro dos principais interferentes citados em bibliografia, no que se refere à determinação de Se por ET AAS. Essas espécies, fosfato, ferro (III), alumínio e cloreto, estão presentes em digeridos de alimentos, originárias do P, Fe, Al e Cl das amostras sólidas, conforme a Tabela 4.1.

Um experimento de tal tipo é capaz de avaliar a influência isolada de cada variável independente, e de suas interações. Os experimentos do gênero 2^n fatorial, onde n é o número de variáveis, são particularmente adequados para estudos de varredura onde se deseja ver qual ou quais de um conjunto de variáveis exerce maior influência sobre a variável dependente. Para reduzir o número de experimentos necessários, investiga-se apenas dois níveis de cada variável. Com base teórica, supõe-se que as interações ternárias (três interferentes presentes no nível mais alto) e a quaternária (todos os interferentes presentes no nível mais alto) provavelmente não seriam significativas. A oscilação da resposta da variável dependente nesses casos então serve para avaliar o erro aleatório do experimento (93).

No presente trabalho, a variável dependente foi tomada como sendo a absorbância de 0,4 ng de Se (a solução-branco, sem Se, não apresentou absorbância). As variáveis independentes foram as quantidades dos quatro potenciais interferentes. Fosfato foi adicionado como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ferro como $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, alumínio como $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ e cloreto como CaCl_2 . O nível de concentração mais baixo escolhido foi zero, e o nível mais alto variou para cada espécie, de acordo com os teores encontrados em alimentos (Tabela 4.1). A Tabela 4.2 indica essas quantidades referentes ao nível mais alto dos possíveis interferentes. Os cálculos foram efetuados para um nível de significância de 99 %.

Convém lembrar que, nos primeiros resultados obtidos no presente trabalho, não foram encontradas evidências de que P (até 1 µg) e Ca (até 1 µg), isoladamente, interfiram na absorbância de 0,4 ng de Se. As espécies amônio e nitrato são amplamente utilizadas em ET AAS e, na falta de referências relatando problemas específicos em relação à determinação de Se, são consideradas como não-interferentes.

Tabela 4.2 Teores máximos finais das variáveis independentes (elementos químicos potencialmente interferentes) aplicados no experimento 2⁴ fatorial.

Elemento químico	Valor máximo, em mg L ⁻¹	Valor máximo, em µg
P	100	2
Fe	1,5	0,03
Al	0,4	0,008
Cl	500	10

Os resultados apontaram as influências de fosfato, ferro, alumínio e cloreto como não significativas, quando tomadas isoladamente. Entretanto, entre as interações binárias, surgiram como significativas as representadas por alumínio e cloreto, e fosfato e cloreto.

A interação Al-Cl, cujos indícios de efeito sobre a absorbância de Se já haviam sido apontados antes, poderia resultar na formação de um composto, quando certas estequiometrias ótimas são proporcionadas no atomizador de grafite, interferindo na determinação. Sobre a interação P-Cl não foi possível encontrar referências em trabalhos publicados. Porém, lembrando que a forma de cloreto empregada no teste foi CaCl₂, pode ter ocorrido a interação P-Ca, já que alguns fosfatos de cálcio têm caráter refratário e poderiam permanecer no atomizador depois da pirólise, influenciando na detecção de Se, no momento da

atomização. Em alimentos simultaneamente ricos em P e Ca, tal interferência seria mais importante. Alguns autores, por exemplo, encontraram especial dificuldade na determinação de Se em laticínios e cereais. Atribuíram o problema à interferência de P. No entanto, tais alimentos são, ao mesmo tempo, ricos em Ca e P. É provável que o efeito encontrado se deva à interação Ca-P (94).

Por outro lado, ainda insistindo no fato de que a forma de cloreto empregada no teste foi a de CaCl_2 , haveria uma suspeita a averiguar, de interação Al-Ca.

A Figura 4.6 mostra a resposta de uma solução $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se ($0,8 \text{ ng Se}$) quando quantidades diferentes de Ca (como CaCl_2) e Al (como AlCl_3) são adicionadas. Se o efeito de Al sobre a absorbância de Se fosse independente do efeito produzido por Ca, curvas aproximadamente paralelas poderiam ser esperadas (93). Observa-se na figura que isso está longe de ocorrer, confrontando o traçado da curva que representa a ausência de Al com as demais. Essa constatação pode ser tomada como indício da interação Ca-Al.

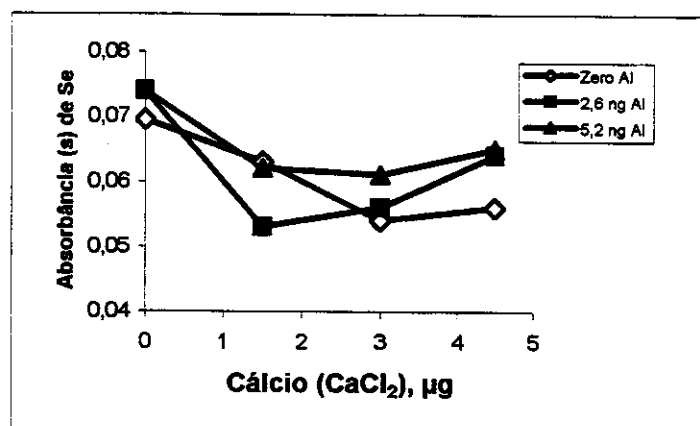


Figura 4.6 Efeito simultâneo de massas crescentes de Ca e Al sobre a absorbância integrada de $0,8 \text{ ng}$ de Se. Modificador químico Pd ($5 \mu\text{g}$), temperatura de pirólise igual a 1200°C .

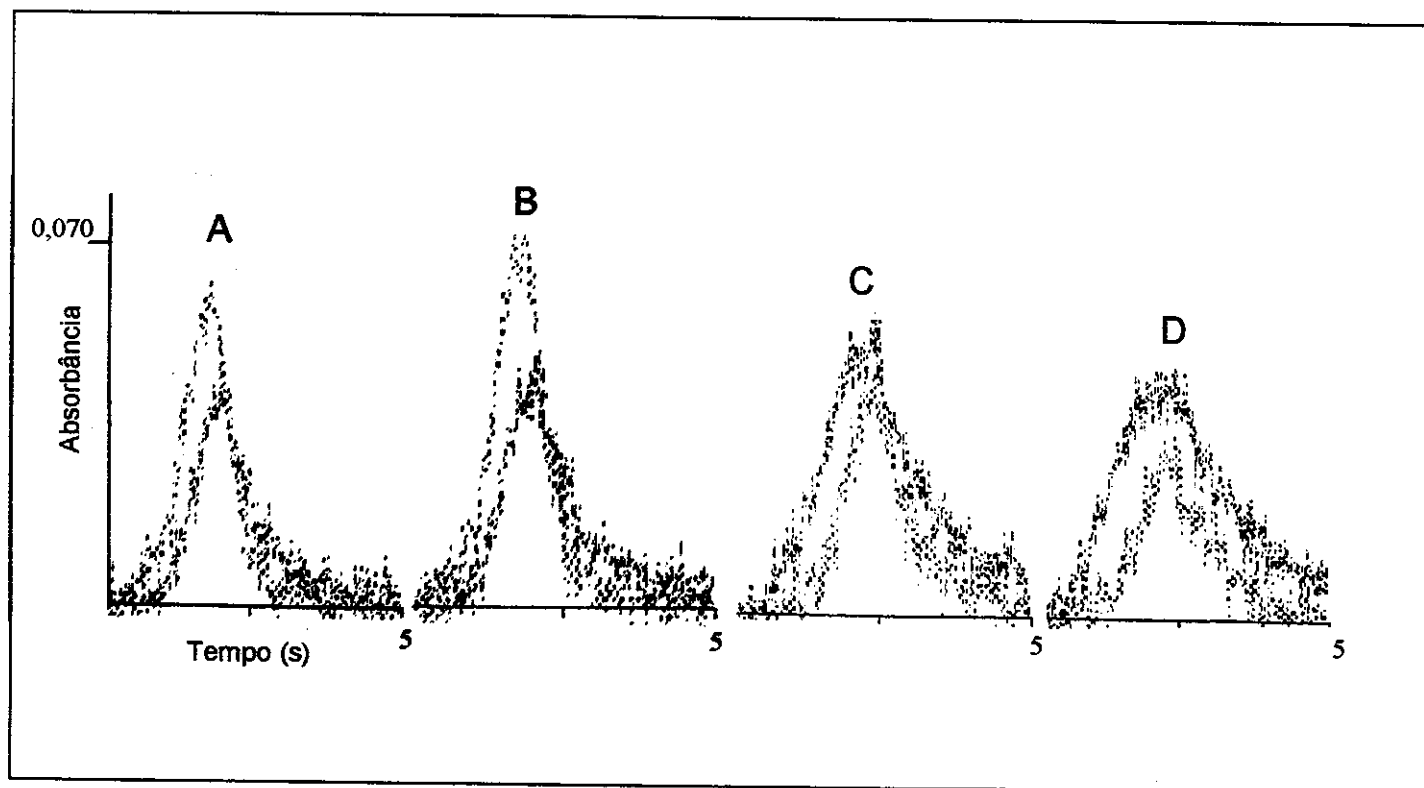


Figura 4.7 Pulsos atômicos (sempre os mais altos) e de fundo, obtidos com 0,8 ng de Se, nas seguintes situações: A – sem adição de Ca nem Al (área do pico atômico = 0,070 s); B – com adição de 2,6 ng de Al (área do pico atômico = 0,075 s); C – com adição de 1,5 μg de Ca (área do pico atômico = 0,064 s); D – com adição de 2,6 ng de Al e 1,5 μg de Ca (área do pico atômico = 0,054 s). Modificador químico Pd (5 μg), temperatura de pirólise igual a 1200 °C. Ca adicionado como CaCl_2 e Al como AlCl_3 .

A Figura 4.7 permite a investigação comparativa dos formatos e tamanhos dos picos atômico e de fundo obtidos em parte do experimento anterior. Os valores informados na legenda, referentes às áreas de picos atômicos, representam médias de 5 repetições. Observa-se que as adições modificam a forma e a área dos picos. De modo geral, a presença de Ca aumenta o sinal de fundo e deprime o do analito. Como foi visto antes, a adição de certas quantidades de Al (como cloreto) pode aumentar a absorbância de Se.

4.1.3 – Determinação de Se em amostras reais

Sem absolutamente pretender esgotar o assunto, até aqui já foram recolhidas diversas evidências de que a determinação de Se por ET AAS em alimentos pode, realmente, estar sujeita a efeito de matriz, mesmo com a utilização de conceitos e equipamentos contemporâneos. Entretanto, faltaria verificar como esse possível efeito de matriz se manifesta na prática, através da análise de amostras reais.

Assim, foi escolhido um material certificado rico em Se, cuja determinação por ET AAS, em princípio, deveria ser rápida e sem problemas: o BCR - CRM 186 Pig Kidney (teor de Se igual a $10,3 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$).

Esse material foi digerido por microondas, conforme o procedimento descrito em 3.3.3.1 e Tabela 3.3 (aproximadamente 0,25 g avolumados a 25 mL). As soluções resultantes foram analisadas por ET AAS, com o programa usual de temperatura e tempo, mostrado na Tabela 3.1 (temperatura de pirólise igual a 1300°C), na presença de $5 \mu\text{g}$ de Rh, como modificador químico.

Devido à relativamente alta concentração de Se nos digeridos de Pig Kidney, foi necessário diluir as soluções resultantes, de forma a interpolar a absorbância integrada na curva analítica, construída com os pontos 0, 5, 10, 15,

20, 30 e 40 ng mL⁻¹. A Figura 4.8 mostra a concentração aparente de Se em Pig Kidney, obtida em cada uma das diferentes diluições efetuadas, que estão referidas ao material sólido. Todas as respectivas absorbâncias obtidas estiveram compreendidas no intervalo da curva analítica. Claramente, as diluições mais altas se fizeram necessárias, para obter o teor esperado de Se. Isso ilustra o efeito da matriz, que levaria a erro negativo, caso as diluições mais altas não fossem possíveis, como em amostras com teor de Se inferior a 1 mg kg⁻¹.

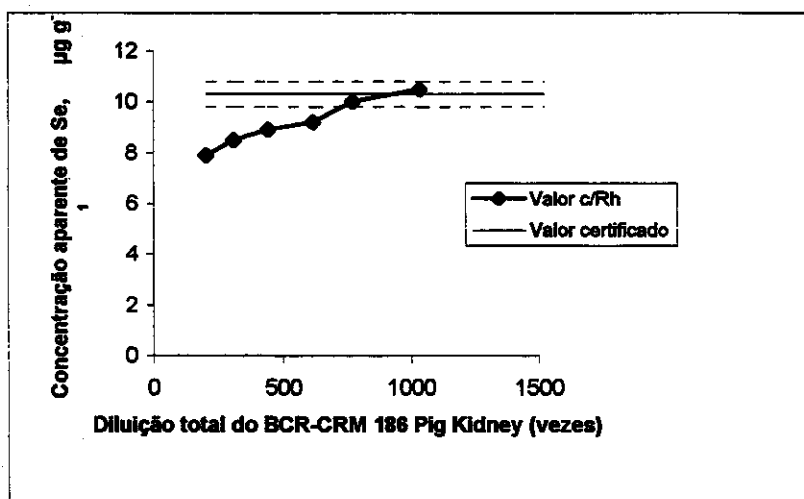


Figura 4.8 Concentração aparente de Se no material certificado BCR CRM 278 Pig Kidney (teor certificado de Se igual a $10,3 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$) após digestão, quando determinada por ET AAS, utilizando modificador químico Rh (5 μg).

Tais resultados não são surpreendentes, considerando o relato de Hanna et alii (82), que determinaram Se em suplementos nutricionais. Os autores reportaram tentativas de determinação direta de Se (sem separação da matriz) por ET AAS, envolvendo introdução de suspensão da amostra, bem como prévia digestão seca e úmida. Segundo os autores, todos esses experimentos ficaram prejudicados, já que boas recuperações de Se adicionado somente foram alcançadas quando as amostras sofreram grande diluição, o que levou a

concentração de Se para próximo do LD, diminuindo a confiabilidade dos resultados.

Já com a matriz estudada no presente trabalho, adições de Se (IV) a alíquotas do digerido levaram a recuperações muito próximas de 100 %, mesmo quando as adições foram feitas a diluições do digerido relativamente baixas, quando o valor certificado ainda estava longe de ser alcançado. Provas de recuperação, portanto, poderiam induzir à aceitação, como correta, de concentração inferior à real.

O experimento foi também aplicado aos materiais certificados BCR CRM 278 Mussel Tissue ($1,66 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se) e IAEA MA-B-3/TM Fish Tissue ($1,35 - 1,70 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se). Nesses casos, o relativamente baixo teor de Se foi um obstáculo a altas diluições, e os resultados finais não foram bons, provavelmente devido ao efeito de matriz. É possível que a utilização de algum recurso instrumental para melhorar o LD (por exemplo, emprego de EDL em lugar de LCO) já permitisse uma diluição maior da amostra, levando a melhores resultados.

Outra forma de tornar possível a quantificação mais exata é produzir digestões mais concentradas desses materiais certificados. Entretanto, o sistema fechado de microondas disponível não digere com segurança mais do que 0,3 g de matéria orgânica, segundo o manual do fabricante. Assim, um experimento semelhante ao anterior foi realizado, porém empregando uma bomba de O_2 para digestão da amostra. Esse sistema será avaliado com mais detalhe adiante. Por enquanto, cabe comentar que ele acomoda, mediante prensagem da amostra, até cerca de 1,5 g de material.

Assim, três repetições do material certificado IAEA MA-B-3/TM Fish Tissue ($1,46 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se, com intervalo de confiança $1,35 - 1,70 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se) foram digeridas na bomba, partindo de cerca de 1,2 g de material e avolumando a 25 mL. A partir daí, foram feitas diversas séries de diluições, através do amostrador

automático, para determinação de Se, sempre garantindo que a absorbância obtida estivesse dentro do intervalo de concentrações da curva analítica. Na primeira série de diluições, foi usado um FD igual a 2, obtendo-se como resultado final médio $1,04 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se, valor abaixo do certificado. Na segunda série de diluições, o FD empregado foi de 2,5, resultando em $1,31 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se, mais próximo do valor esperado. Diluições mais altas levaram a encontrar resultados correspondentes ao valor certificado, por exemplo, FD igual a 3,33 resultou em $1,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se.

Conclui-se que uma forma simples de verificar a exatidão de resultados da determinação de Se por ET AAS, em matrizes ricas como as alimentícias, é através da comparação de valores obtidos com diluições diferentes da amostra. Um certo FD mínimo, que pode ser determinado experimentalmente, será necessário para contornar o efeito de matriz.

Depreende-se também que será mais difícil comprovar a exatidão da determinação de Se por ET AAS em amostras de alimentos que tenham por natureza baixos teores desse elemento. Uma vez que a concentração de Se nos digeridos dessas amostras poderá ficar próxima ao LD ensejado pelo procedimento, diluições podem não ser factíveis.

4.2 – Estudo de modificadores químicos para a determinação de Se por ET AAS

À luz da revisão bibliográfica efetuada, esta parte do trabalho desenvolveu um estudo comparativo entre Pd, Rh e Ir quando aplicados como modificadores químicos na determinação de Se, na forma de Se (IV), por ET AAS. Essa comparação objetivou a escolha da melhor possibilidade de modificador, em termos de estabilização e menor massa característica atingida. Os modificadores químicos foram experimentados com e sem adição de ácido ascórbico ou nitrato de magnésio. Uma tentativa de produzir um modificador “permanente” de Rh foi realizada.

Todos os experimentos foram executados utilizando soluções aquosas de Se (IV) e na ausência de matrizes reais, porque elas provavelmente atuariam, cada uma, de forma particular sobre a estabilização do Se. Tal situação iria contra o interesse do projeto, que procura desenvolver métodos generalizáveis para quantificar baixos teores de Se em alimentos. Além disso, procedimentos de separação e pré-concentração, a serem discutidos adiante, retiram o analito de sua matriz original. Por outro lado, o assunto modificadores químicos não é encerrado aqui, sendo retomado na parte 4.3, para o caso particular da presença dos complexantes DDTC e DDTP.

4.2.1 – Otimização da massa de Pd, Rh e Ir

Injetando-se no THGA sempre massas iguais a 2 ng de Se, diferentes massas de modificadores foram experimentadas, conforme segue: 2, 4, 5, 8 e 10 μg Pd na forma $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 30 μg Rh na forma $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, isto é, Rh (III); 2, 4, 5 e 8 μg Rh na forma $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Rh}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou seja, Rh (II); e 1, 2, 4, e 8 μg Ir, como $\text{IrCl}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$. Curvas de temperatura de pirólise entre 800 e 1400 °C foram traçadas em cada caso.

Em se tratando de Pd, independentemente da massa utilizada, uma queda na absorbância aconteceu em 1300 °C, sendo aconselhável não ultrapassar 1250 °C. Em termos de massa característica de Se obtida, as menores massas de Pd empregadas (2 e 4 µg) dão resultados altos, de modo que a opção de 5 µg foi escolhida como a mais adequada.

No caso do Rh na forma $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, descartando as massas mais baixas (1 e 2 µg Rh) porque dão massa característica mais alta, todas as demais resultaram em igual massa característica para Se. Quanto ao poder de estabilização, todas as massas experimentadas garantiram temperatura de pirólise até 1300 °C inclusive. Para a continuação do trabalho, foi escolhida a massa de 5 µg de Rh.

Quando Rh é adicionado como $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Rh}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, também as menores massas devem ser preteridas, considerando-se satisfatório o uso de 5 µg de Rh. Com essa última forma, há tendência a um pequeno aumento na estabilização, que pode chegar a permitir temperatura de pirólise um pouco além de 1300 °C, porém com acelerada corrosão do tubo de grafite.

A Figura 4.9 mostra fotos obtidas em microscópio, de três plataformas de L'vov, originalmente partes incorporadas a THGAs, sendo uma delas sem uso, outra utilizada em 50 ciclos com solução de Rh (II) e a última usada em 50 ciclos com solução de Rh (III). Observa-se, na foto A, que traz as três unidades com o lado convexo exposto, uma mancha alongada (visível a olho nu), na plataforma onde Rh (II) foi empregado. Na mesma unidade, porém do lado côncavo (foto B), nota-se um ponto escuro, provavelmente resultado de corrosão, além das bordas bastante danificadas, em comparação com as outras duas plataformas.

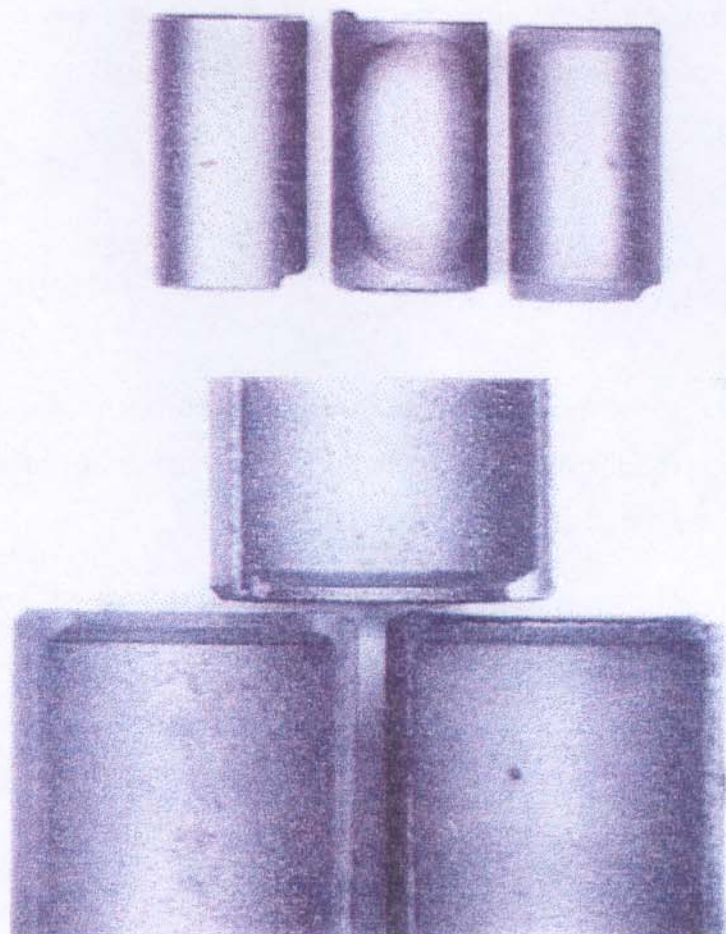


Figura 4.9. Fotos de três plataformas de L'vov, obtidas em microscópio estereoscópico Zeiss Stemi SV 11 Apo, acoplado a Color Video Printer, marca Sony. **Foto A** (acima). Lado convexo de três plataformas de L'vov, da esquerda para a direita: sem uso; utilizada com Rh (II); utilizada com Rh (III). Aumento aproximado: 6,6 vezes. **Foto B** (abaixo). Detalhe do lado côncavo das mesmas três plataformas. No alto, à esquerda, a unidade onde Rh (II) foi adicionado e, à direita, a que foi submetida à adição de Rh (III). Abaixo, a unidade sem uso. Aumento 12 vezes.

Quando Ir foi usado, o efeito obtido com 4 ou 8 μg do metal pareceu virtualmente o mesmo, sendo levemente melhor do que o resultante com 1 ou 2 μg , em termos de massa característica de Se e de estabilização. Temperatura de pirólise igual a 1300 $^{\circ}\text{C}$ é possível, com apenas 4 μg de Ir.

4.2.2 – Comparação entre Pd, Rh e Ir

A Figura 4.10 compara entre si quatro curvas de pirólise para Se, obtidas com os diferentes modificadores Pd, Rh (nas duas formas usadas) e Ir, com suas massas otimizadas, em tubos de grafite novos.

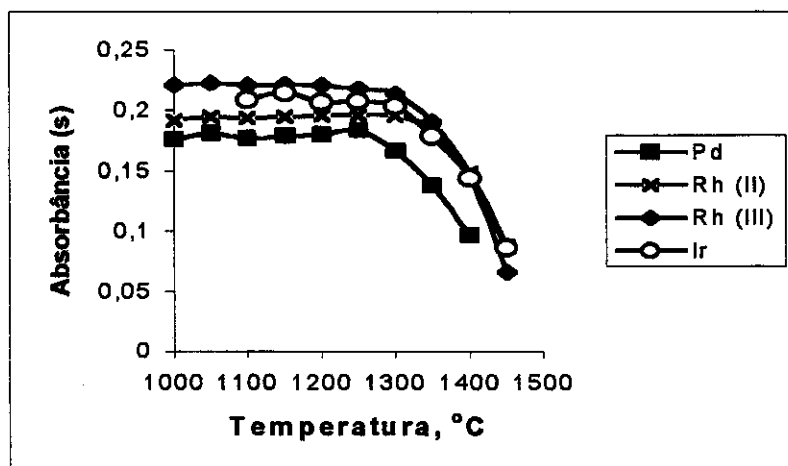


Figura 4.10 Curvas de temperatura de pirólise para Se (2 ng), com diferentes modificadores químicos: 5 μg Pd ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$), 5 μg Rh (III) ($\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 5 μg Rh (II) ($[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Rh}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 4 μg Ir ($\text{IrCl}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$).

Através da Figura 4.10, fica evidente que o emprego de Pd é menos vantajoso, já que todas as outras opções levaram à estabilidade mais prolongada frente à temperatura crescente, além de permitirem absorbância maior para 2 ng de Se, em todo o intervalo de temperaturas estudado. Neste primeiro experimento, os resultados obtidos com Rh (III) foram os melhores.

Um outro experimento efetuado, este usando um mesmo THGA já bastante intemperizado (cerca de 100 ciclos de uso), evidenciou a superioridade dos resultados obtidos com Rh (III), na estabilização de Se, em relação aos outros modificadores. A Figura 4.11 ilustra os resultados, sendo possível notar que o desempenho do Ir foi inferior.

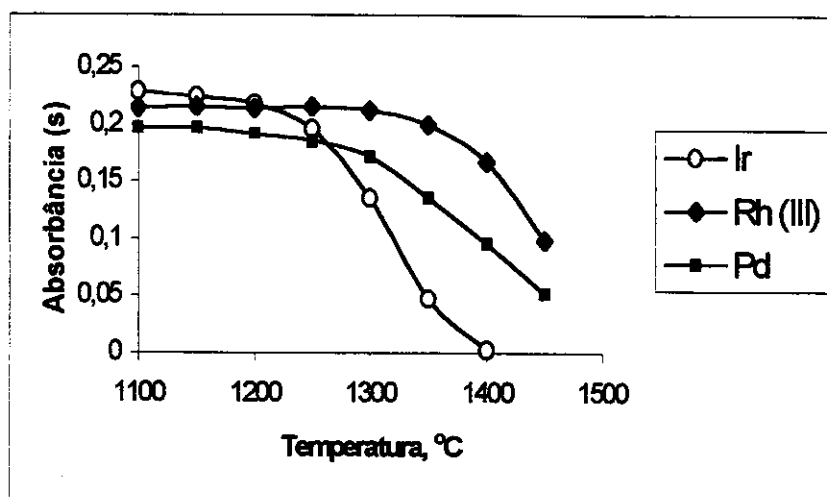


Figura 4.11 Curvas de temperatura de pirólise para Se (2 ng) com diferentes modificadores: 5 μg de Pd ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$), 5 μg de Rh (III) (RhCl_3), e 4 μg de Ir ($\text{IrCl}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$), com THGA erodido (100 ciclos de uso anterior).

4.2.3 – Adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

O efeito da adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a Pd foi estudado, uma vez que esse procedimento é recomendado, não só na literatura como também pelo próprio fabricante do espectrômetro.

Um teste foi planejado para comparar os efeitos respectivos da adição de 5 μg de Pd a 1 e 2 ng de Se, por um lado, e 5 μg de Pd + 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (recomendação do manual do espectrômetro) a 1 e 2 ng de Se, por outro lado. O teste foi realizado duas vezes: com tubos de grafite novos e com um mesmo THGA usado, mas ainda em bom estado. Em cada caso, 10 leituras foram feitas com pirólise a 1200 °C e igual número com pirólise a 1300 °C. O $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado via amostrador automático, assim como as demais soluções.

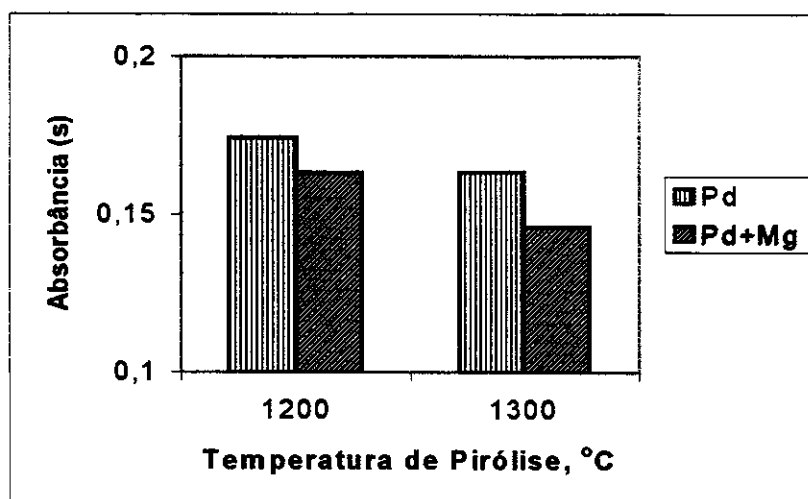


Figura 4.12 Comparação entre o efeito do modificador Pd (5 μg) e o do modificador misto Pd+Mg (5 μg de Pd + 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) na estabilização de 2 ng de Se, em tubos de grafite novos (médias de 10 repetições).

O resultado do teste mostrou que a adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ provocou uma diminuição na absorbância obtida. Essa diminuição é significativa, tanto a 1200 quanto a 1300 °C (teste t , $P = 0,05$), aparentemente tendendo a aumentar nessa última temperatura. Os resultados foram semelhantes para THGA novos e usado. A Figura 4.12 ilustra uma parte do teste, que foi feita com THGA novos e 2 ng de Se.

Em prosseguimento, curvas de pirólise para Se na presença de Pd e na presença de Pd- $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foram traçadas. Os resultados, ilustrados na Figura 4.13, sugerem que a adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ não trouxe benefícios à estabilização do Se.

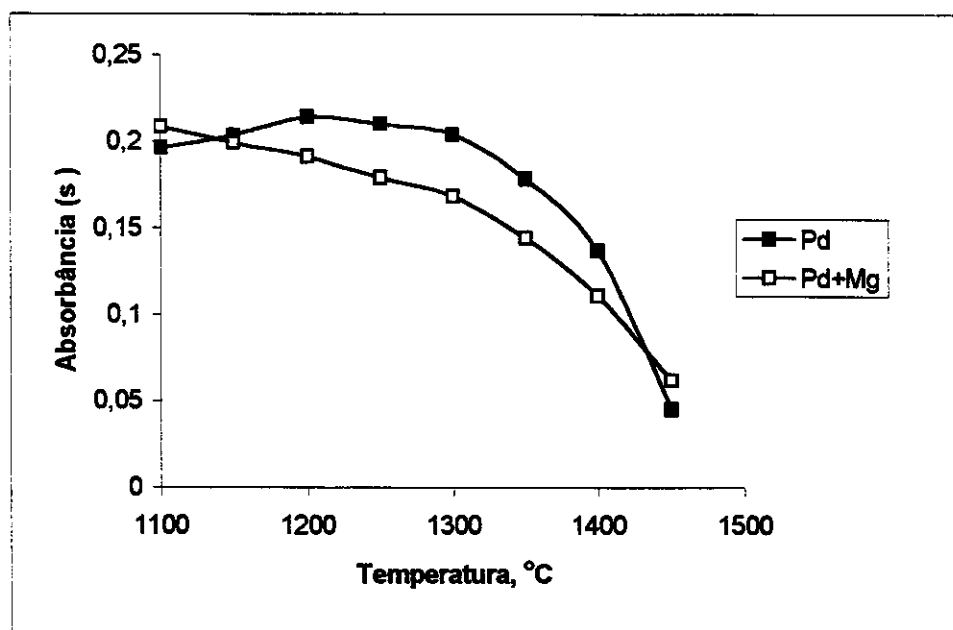


Figura 4.13 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com 5 μg de Pd, com e sem a adição de 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

A conveniência da adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (3 μg) a Rh (III) (5 μg) e Ir (4 μg) foi também investigada. As Figuras 4.14 e 4.15 mostram respectivamente os resultados. A presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ parece indiferente, não havendo evidência de alguma vantagem obtida com essa adição.

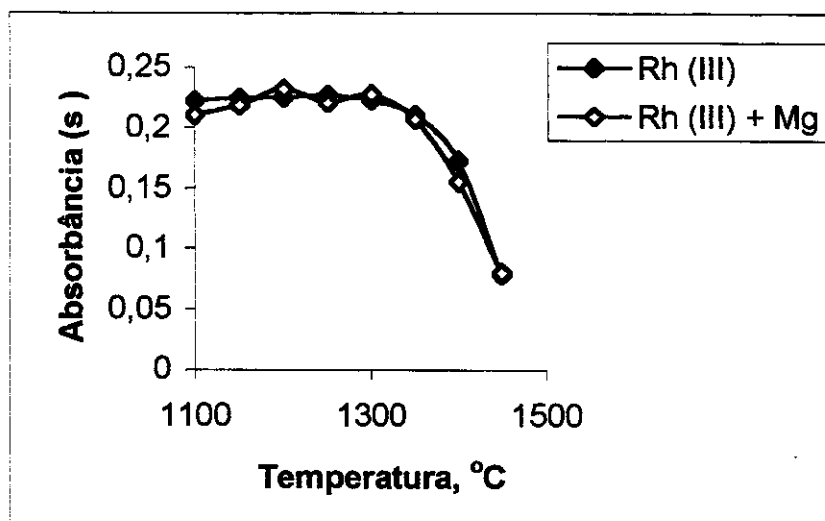


Figura 4.14 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com 5 µg de Rh (III), com e sem a adição de 3 µg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

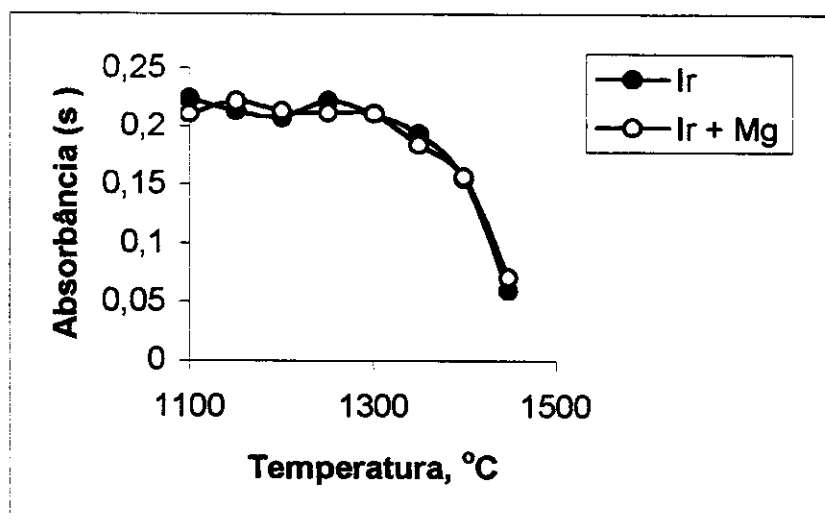


Figura 4.15 Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com 4 µg de Ir, com e sem a adição de 3 µg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

4.2.4 – Adição de ácido ascórbico a Rh e Ir

Alguns autores sugerem que o desempenho de modificadores químicos pode ser melhorado através da adição de redutores, como ácido ascórbico (4,7).

Diferentes massas de ácido ascórbico (0,1; 0,2 e 0,4 mg) foram adicionadas a 5 μg de Rh (III). A adição de 0,1 ou 0,2 mg não melhorou a estabilização de Se. Porém, com 0,4 mg, melhor efeito de retenção ocorreu, com manutenção da absorbância até 1400 $^{\circ}\text{C}$ inclusive. Entretanto, a absorbância caiu marcadamente, como pode ser visto na Figura 4.16. Assim, a adição de ácido ascórbico poderia ser cogitada apenas quando o melhor LD possível não estivesse sendo buscado. Este não é o caso do presente trabalho, que tem por objetivo a determinação de baixos teores de Se em alimentos.

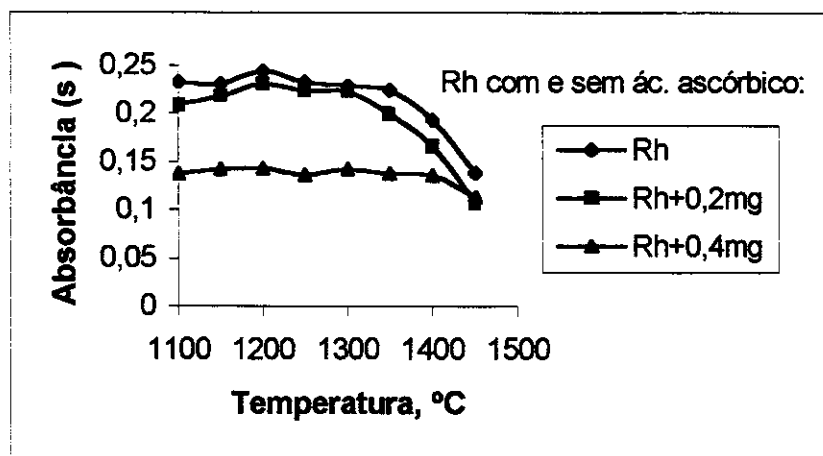


Figura 4.16. Curvas de temperatura de pirólise para 2 ng de Se, com 5 μg de Rh (III) e diferentes massas de ácido ascórbico.

As mesmas quantidades de ácido ascórbico foram adicionadas a 4 µg de Ir. Nenhuma vantagem foi encontrada, havendo mesmo uma tendência a deteriorar o desempenho do modificador Ir, com essa adição.

4.2.5 – Preparação de um modificador permanente de Rh

Considerando os bons resultados obtidos com Rh (III) no papel de modificador químico para Se, tentativas foram feitas para produzir um modificador permanente de Rh.

Foram experimentadas deposições de 100, 200 e 400 µg de Rh, feitas respectivamente através de 5, 10 e 20 ciclos do programa de temperatura e tempo mostrado na Tabela 3.1, alterando-se a temperatura de pirólise para 1000 °C e eliminando-se o passo de limpeza, sendo que, a cada ciclo, 20 µg de Rh foram depositados (20 µL de solução 0,1 % m/v de Rh como RhCl_3 , em HNO_3 1 % v/v ou $0,14 \text{ mol L}^{-1}$).

Em princípio, observou-se que o Rh aparentemente não aderiu bem a tubos de grafite novos. Tentativas feitas com tubos já usados foram melhor sucedidas, principalmente adições de 200 µg. Porém, a deposição de 400 µg de Rh fez deprimir a absorbância obtida para soluções de Se, mesmo na ausência de interferentes. Assim, o emprego de massas maiores do modificador ficou descartada.

Aliás, no que se refere à preparação de modificadores “permanentes” por deposição térmica no tubo de grafite, uma recomendação que surge na literatura (40) é a adição de massas limitadas do modificador (50 a 100 µg), normalmente não de uma só vez, mas em etapas. É possível que a massa ótima do modificador a ser empregada seja tal que produza o efeito desejado de modificação química duradoura, sem alterar significativamente propriedades físicas do atomizador de

grafite original, por exemplo, a condutividade ou resistência elétrica do material. A alteração dessas propriedades físicas poderia ser prejudicial, deprimindo a absorbância obtida. Essa hipótese poderia ser verificada através de pesquisa futura.

No presente trabalho, os resultados mostraram que nunca o desempenho do Rh previamente depositado alcançou o do Rh adicionado de forma concomitante à solução de Se, em termos de minimizar o efeito da presença do complexante DDTP, utilizado na parte do projeto de pesquisa, relativa à pré-concentração de Se.

Os testes efetuados demonstraram que, para a determinação de Se, é possível reaproveitar tubos de grafite já bastante erodidos, fazendo-se prévia deposição de 200 µg de Rh. No entanto, esse tratamento não pôde substituir a adição concomitante de Rh nas determinações de Se em presença de DDTP.

A duração desses tubos de grafite “recuperados” é bastante variável: depende do estado do tubo usado, antes da deposição dos 200 µg de Rh e também da composição das soluções analisadas, em termos de acidez e concomitantes presentes.

Para trabalho de rotina, os tubos “recuperados” poderiam ser empregados desde que soluções de referência fossem periodicamente verificadas. Com solução de Se em HNO₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L⁻¹), sem outros concomitantes, o modificador produzido com 200 µg de Rh previamente adicionado sobre tubos de grafite usados teve uma duração de cerca de 100 ciclos, considerando o programa de tempo e temperatura mostrado na Tabela 3.1.

Antes de executar nova deposição de Rh, é necessário remover os resíduos da deposição anterior, uma vez que um excesso de Rh sobre o tubo pode deprimir e mesmo eliminar completamente a absorbância de Se. Para

remover os resíduos de Rh, pode-se executar passos de limpeza do tubo de grafite a 2400 °C (rampa 1s, tempo 5s), intercalados por passos a 20 °C (rampa 1s, tempo 20s).

Considerando todos os experimentos realizados no estudo sobre modificadores químicos, apresentado em 4.2, conclui-se que a adição de Rh (III), concomitantemente à solução do analito, foi a possibilidade experimentada que melhor resultados trouxe, levando em conta os aspectos seguintes:

- estabilização até 1300 °C, mesmo em tubos de grafite bastante erodidos;
- pulsos atômicos bem formados e baixo sinal de fundo (ver Figura 4.17, adiante);
- melhor massa característica de Se obtida (O valor indicado pela Perkin Elmer no manual do espectrômetro é de $45,0 \pm 20 \text{ \% pg/0,0044 s}$, com EDL, utilizando modificador $\text{Pd-Mg(NO}_3)_2$. Com o modificador Rh descrito, é possível obter-se o mesmo valor, empregando uma LCO);
- simplicidade no procedimento de adição do modificador;
- RhCl_3 é muito solúvel em água, facilitando o preparo de soluções, e não causa corrosão acelerada do tubo de grafite;
- $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ para síntese tem pureza adequada para a finalidade pretendida e custo comparativamente menor, se considerados sais p.a. de metais nobres. Além disso, pode ser facilmente convertido ao nitrato, se desejado.

Não foram encontradas evidências de que a adição de $\text{Mg(NO}_3)_2$ a Pd, Rh ou Ir seja vantajosa. O mesmo pode ser dito em relação à adição de ácido ascórbico a Rh ou Ir.

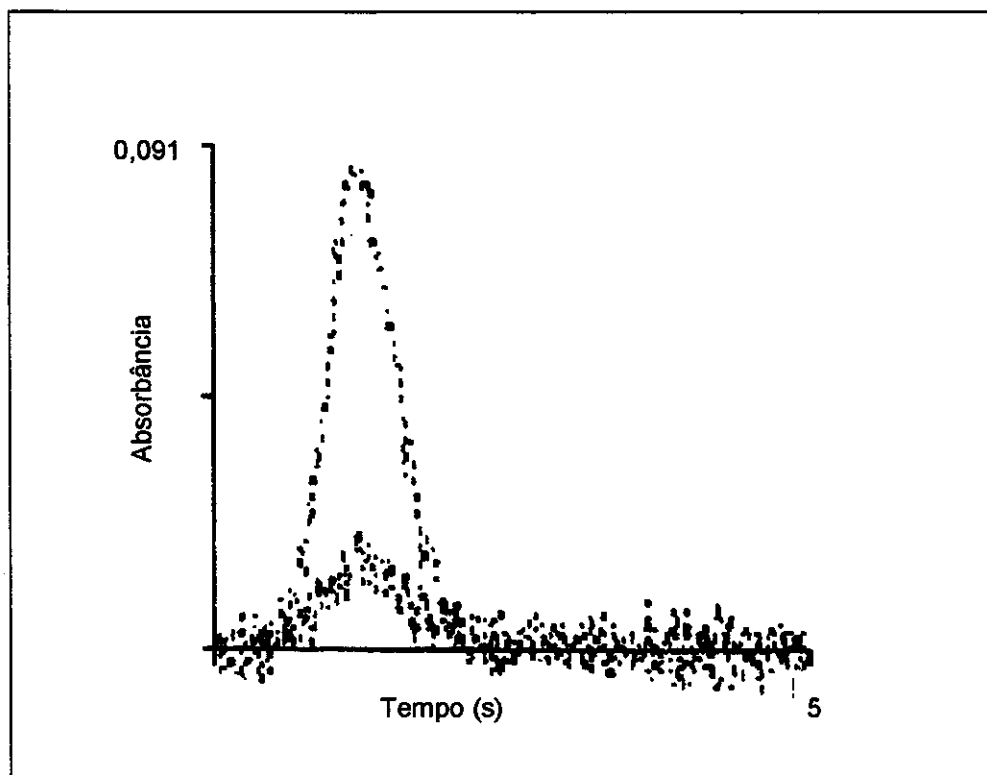


Figura 4.17 Pulso atômico (o mais alto) e de fundo, obtidos com 0,8 ng de Se. Modificador químico Rh (5 μ g), temperatura de pirólise igual a 1300 °C.

Portanto, Rh (5 μ g) foi o modificador químico adotado como referência, na seqüência do projeto de pesquisa.

4.3 – Estudo da separação e pré-concentração de Se, visando à determinação em alimentos

Conforme demonstrado em 4.1, a determinação de Se por ET AAS, em amostras reais do tipo de alimentos, pode estar sujeita a efeito de matriz. Esse efeito pode ser contornado por simples diluição da amostra, desde que o teor de Se não seja baixo, a ponto de ficar fora de um intervalo de concentrações conveniente para a quantificação, sob pena de que a exatidão do procedimento fique prejudicada.

Quando teores de Se inferiores a tal concentração, provavelmente em torno de 0,2 a 0,3 mg kg⁻¹, precisam ser determinados, separação e pré-concentração do analito podem ser empregadas. Normalmente, será necessária providência anterior, no sentido da digestão total da amostra, sem perdas de Se.

4.3.1 – Digestão de amostras de alimentos, para determinação de Se

Conforme visto na revisão bibliográfica, a digestão da amostra de alimento deverá ser enérgica o suficiente para garantir total recuperação do Se, que aí ocorre principalmente como Se (II), em aminoácidos. Adicionalmente, a digestão deverá ser conduzida de forma a impossibilitar perdas por volatilização do elemento, além, é claro, de afastar contaminações.

Uma das formas atualmente mais difundidas de atender a tais requisitos consiste no emprego de digestores à base de microondas, operando com frascos fechados, à pressão controlada. Bons resultados foram encontrados em digestões de cereais em forno de microondas com frascos fechados, empregando apenas HNO₃, através do uso de condições de temperatura e pressão mínimas para digestão (83).

Um dos problemas freqüentes em digestões por microondas em frascos fechados, dotados de membrana de ruptura para segurança, é justamente o rompimento dessa membrana. Evidentemente, quando isso acontece, o material é descartado. Porém, outros frascos submetidos ao mesmo programa de aquecimento, cujas membranas não foram rompidas, são aproveitados. Pode-se formular a hipótese de que, nesses frascos com membranas intactas, algum material tenha sido pressionado sobre as membranas, que se deformaram sem romper. A recuperação desse material poderia ficar comprometida.

Essa talvez seja uma das causas da baixa repetitividade registrada, às vezes, em análises baseadas nesse tipo de digestão, ou seja, pequenas quantidades do analito seriam eventualmente perdidas, ao serem adsorvidas pela membrana de ruptura.

Considerando essa hipótese, um programa foi desenvolvido para o forno de microondas com frascos fechados, buscando as condições mais suaves possíveis, capazes de gerar digeridos límpidos, sem romper qualquer membrana nos frascos sendo processados e utilizando pequena quantidade de HNO_3 . O programa, sumarizado na Tabela 3.3, foi originalmente otimizado para músculo bovino e depois experimentado com sucesso para vários outros tipos de alimentos.

Entretanto, talvez devido a uma deficiência de homogeneização das microondas na cavidade do forno, ou porque as condições adotadas foram realmente bastante suaves, eventualmente um ou dois frascos da corrida ainda mantinham material em suspensão, ao fim do programa. Para contornar esse problema, como opção desenvolveu-se um outro programa com maior quantidade de HNO_3 , porém ficando garantidas condições de pressão que evitem o rompimento de membranas (Tabela 3.4).

Talvez a maior limitação encontrada no digestor à base de microondas disponível no laboratório tenha sido a quantidade máxima de matéria orgânica cuja digestão é considerada segura pelo fabricante, tão-somente cerca de 0,3 g.

Para obter digeridos a partir de massas maiores de amostra, optou-se por utilizar o recurso da combustão em bomba de oxigênio (conforme 3.3.3.2). Tal como na situação anterior, a digestão ocorre em recipiente fechado e pressurizado, impedindo perdas do analito por volatilização e dificultando contaminações. Porém, os dois processos apresentam diferenças a serem comentadas.

O procedimento com bomba de oxigênio é vantajoso do ponto de vista da simplicidade: virtualmente todas as amostras orgânicas podem ser processadas da mesma forma, não havendo necessidade de otimização. A oxidação da amostra é instantânea e todo o processo pode ficar pronto em cerca de 20 minutos, aí incluída a introdução da amostra na bomba e seu fechamento, a queima da amostra, o resfriamento do sistema, a abertura da bomba e a transferência quantitativa da solução resultante para um balão volumétrico. Entretanto, só é possível digerir uma amostra por vez.

Os sistemas fechados de microondas geralmente têm capacidade para digerir, ao mesmo tempo, até 12 amostras. Os programas normalmente usados consomem 20 a 30 minutos, mas o resfriamento do sistema é mais lento do que o da bomba. Considerando o procedimento inteiro para a digestão de uma única amostra por microondas em sistema fechado, desde a introdução da amostra até a obtenção da solução final, o tempo total consumido fica próximo de 1 h.

Assim, para poucas amostras pode ser mais conveniente utilizar a bomba de oxigênio. Quando se trata de um trabalho eventual, onde amostras não-rotineiras serão processadas, novamente pode ser mais interessante optar pela bomba.

No entanto, considerando o presente trabalho, a maior vantagem do procedimento da bomba de oxigênio foi a de acomodar maior massa de amostra. Mediante prensagem, até cerca de 1,5 g de material pode ser queimado.

4.3.2 – Pré-concentração de Se com reagentes imobilizados em CPG

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se o modificador Rh (5 µg) na forma de nitrato e o programa do forno de grafite indicado na Tabela 3.1, com pirólise a 1300 °C. Para as determinações, foram adicionados através do amostrador automático 5 µL do diluente HNO₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L⁻¹) + 5 µL da solução de Rh 1 g L⁻¹ + 10 µL do eluato, obtido nos procedimentos experimentados (ou, quando indicado, menor volume de eluato, completando-se 10 µL com o diluente).

Primeiramente, foram realizados testes no sentido de investigar a possibilidade da retenção do Se sobre CPG. Não foram encontradas evidências de que isso ocorra, tendo sido utilizadas soluções de Se (IV).

Na busca por meios físicos capazes de reter Se com seletividade suficiente para separá-lo da matriz e conseguir pré-concentração, foi estudada uma resina produzida no laboratório, previamente descrita e utilizada para pré-concentrar metais e ânions cromato (60), consistindo de cisteína imobilizada em CPG. Nessa tentativa, não foi obtida pré-concentração de Se, a partir de soluções de Se(IV).

No entanto, o trabalho com CPG modificado com o agente silanizante 8-aminopropiltriétoxi-silano teve alguns resultados positivos, que provavelmente são devidos à presença do grupo -NH₂, na estrutura resultante (ver 3.3.4). Foi possível pré-concentrar Se (IV) na coluna recheada com esse material, fazendo-se a eluição com NaOH. Outros eluentes foram experimentados, mas ficaram aquém, nos resultados obtidos: L-cisteína 50 g L⁻¹; tiouréia 10 g L⁻¹; metanol; etanol; DDTP 10 g L⁻¹; DDTP 5 g L⁻¹ em NaOH 0,05 mol L⁻¹; HNO₃ 0,025 e 0,1 mol L⁻¹.

4.3.2.1 – Otimização da concentração do eluente NaOH

A concentração do eluente NaOH foi otimizada, estudando-se o intervalo de concentrações entre 0,01 e 0,1 mol L⁻¹. Nessa otimização, foram bombeados volumes de 25 mL de solução 10 ng mL⁻¹ de Se em HNO₃ 7.10⁻⁵ mol L⁻¹, através de uma coluna de vidro, recheada com 60 mg de CPG silanizado, tendo tampões de lã de vidro nas extremidades. A coluna, cujas dimensões eram 5 cm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro interno, foi conectada com tubos de PTFE ao tubo da cabeça da bomba peristáltica (vazão 1,5 mL min⁻¹). Seguiu-se a cada etapa de pré-concentração uma etapa de lavagem com 5 mL de água e depois a eluição, com 1 mL de NaOH (medido com micropipeta), determinando-se Se no eluato e encerrando-se o ciclo com outra etapa de lavagem. Os melhores resultados foram alcançados com NaOH 0,05 mol L⁻¹.

A Figura 4.18 ilustra o efeito da concentração do NaOH na eluição do Se retido na coluna de CPG silanizado, sendo que cada ponto representa a média de quatro ensaios completos (duas leituras em cada um dos quatro eluatos).

Possível influência da variação da concentração de NaOH sobre a absorbância de Se foi pesquisada. Não foi observada alteração, dentro do intervalo 0,1 a 0,01 mol L⁻¹ de NaOH.

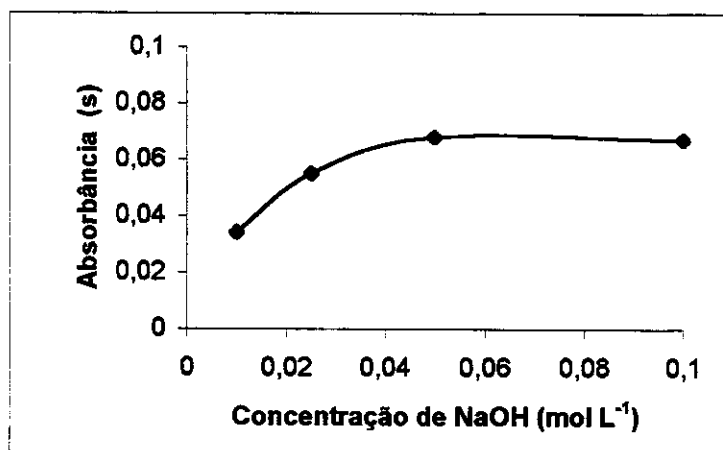


Figura 4.18 Efeito da concentração do eluente NaOH, empregado para eluir o Se retido em CPG silanizado, a partir de solução 10 ng mL⁻¹ de Se.

Em seguida a esse primeiro resultado favorável na pré-concentração de Se, a coluna foi redimensionada, considerando que dimensões de aproximadamente 100 µL de volume e razão comprimento/diâmetro variando entre 10 e 15 foram propostas para alcançar bom desempenho, tanto em sensibilidade, como em recuperação (47).

Uma nova coluna foi produzida diretamente dentro do tubo da cabeça da bomba peristáltica (próximo a uma das extremidades), com as seguintes características: 25 mm de comprimento, 2,2 mm de diâmetro e 60 mg do CPG silanizado. Foram usados pequenos tampões de espuma de poliuretano nas extremidades da minicoluna, para manter a resina no lugar. A vazão passou a 2 mL min⁻¹.

A minicoluna repetiu aproximadamente o comportamento do sistema anterior, quando foi bombeada uma solução 10 ng mL⁻¹ de Se. Porém, considerando suas dimensões menores, foi realizado um teste utilizando apenas 250 µL do eluente NaOH previamente escolhido (em lugar de 1 mL, anteriormente

usado). Esse volume de 250 μL de eluente foi experimentado para eluir Se retido a partir de 10 mL de solução contendo 10 ng mL^{-1} de Se e a partir de 10 mL de solução a 2 ng mL^{-1} de Se, com resultados repetitivos e proporcionais. Em relação ao volume de eluente anteriormente usado, o novo volume de 250 μL resultou em maior absorbância de Se. Volumes menores não foram adotados por causa da dificuldade da operação manual, com medidas volumétricas feitas em micropipetas.

Depois de vários testes, foi fixada a sequência: bombeamento da solução de Se - eluição com NaOH 0,05 mol L^{-1} (250 μL) - lavagem com água (5 mL) para a continuação do trabalho.

4.3.2.2 – Influência do pH na retenção de Se pela coluna

Diversas soluções de Se (IV) de mesma concentração (2 ng mL^{-1}) foram preparadas em HNO_3 de diferentes concentrações, de modo a obter uma gama de valores de pH, determinados em medidor de pH. Em seguida, alíquotas de 10 mL de cada solução de Se em HNO_3 foram bombeadas através da minicoluna, de acordo com a sequência previamente escolhida. Os eluatos foram levados ao espectrômetro, para determinação de Se. O efeito do pH na retenção de Se pela coluna é apresentado na Figura 4.19.

Observa-se que a retenção de Se pela coluna ocorre preferencialmente entre pH 3,5 e 4,3. Em meio mais ácido (pH 2 ou menor) não há pré-concentração. Uma vez que digestões de alimentos e matrizes semelhantes são normalmente conduzidas em condições bastante ácidas, seria necessário ajustar o pH, para tirar proveito do CPG silanizado, visando a pré-concentrar Se. Entretanto, ajustes de pH são, em geral, operações trabalhosas e demoradas, podendo mesmo inviabilizar aplicações do procedimento. Portanto, trata-se de característica indesejável do método em estudo.

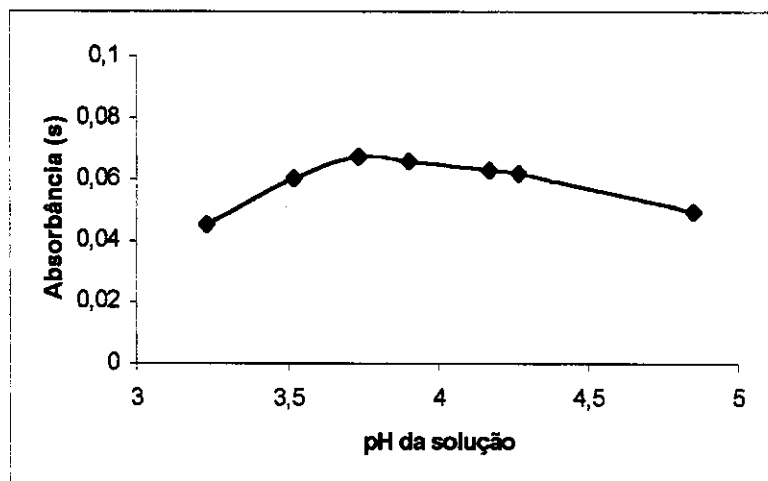


Figura 4.19 Efeito do pH na retenção de Se. Experimento feito bombeando alíquotas de 10 mL de soluções 2 ng mL^{-1} de Se (IV), por minicoluna recheada com 60 mg de CPG silanizado.

4.3.2.3 – Curvas analíticas com pré-concentração de Se em CPG silanizado e cálculo do EF

Primeiramente, um teste de linearidade foi realizado, preparando-se no laboratório soluções com zero, 1, 2, 4, 6 e 8 ng mL^{-1} de Se, adicionando HNO_3 de forma a obter pH entre 4,1 e 4,2.

Alíquotas de 25 mL de cada solução foram bombeadas através da coluna, com as etapas de lavagem e eluição enumeradas em 4.3.2.1. O trabalho foi realizado em duplicata, sendo que os doze eluatos resultantes foram levados ao espectrômetro, para determinação de Se, sendo feitas leituras pelo menos em duplicata. Com a média de todos os resultados, uma curva analítica foi obtida,

através de regressão linear, e o coeficiente de correlação (r) foi também calculado (92).

Para facilitar a adição do modificador químico e como a absorbância ficou muito aumentada devido à pré-concentração, houve necessidade de diluir os eluatos via amostrador automático, de forma diferenciada entre si. A Figura 4.20 apresenta a curva obtida, observando-se resposta linear no intervalo de concentrações estudado.

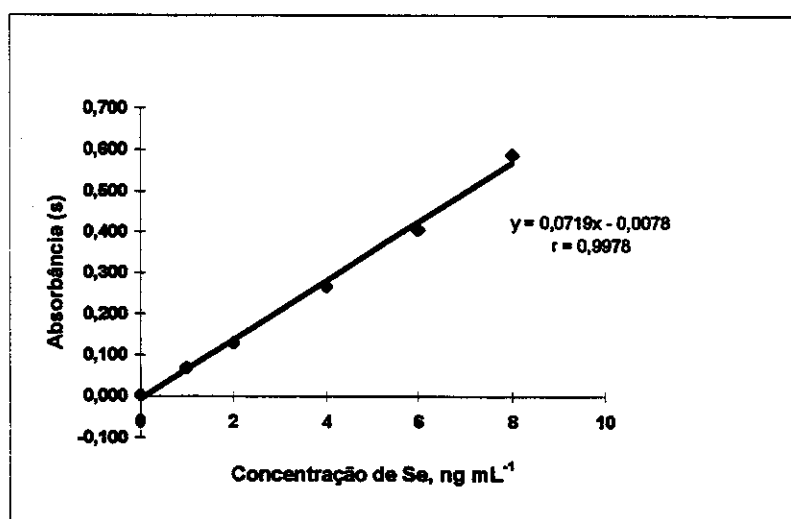


Figura 4.20 Curva analítica com pré-concentração de Se em CPG silanizado. Experimento feito bombeando alíquotas de 25 mL de soluções de Se (IV), por minicoluna recheada com 60 mg de CPG silanizado.

De forma semelhante, outra curva analítica foi feita, desta vez com concentrações menores de Se. No laboratório, foram preparadas soluções com zero, 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 e 2,0 ng mL⁻¹ de Se (IV), adicionando HNO₃ de forma a obter pH entre 4,1 e 4,2. Alíquotas de 25 mL foram bombeadas através da coluna, e o procedimento seguiu como no experimento anterior, à exceção de que, desta vez, todos os eluatos puderam ser diluídos da mesma forma, via amostrador automático, para a determinação no espectrômetro (10 µL do eluato + 5 µL do

modificador químico Rh + 5 μL do diluente HNO_3 0,028 mol L^{-1}). A curva analítica assim obtida pode ser representada pela equação $y = 0,0299x + 0,0041$ ($r = 0,9947$).

Uma curva analítica para determinação direta de Se (sem pré-concentração) foi efetuada em seguida, utilizando as mesmas condições de programa de forno e modificador químico. A partir da solução-estoque de Se a 1000 ng mL^{-1} , foram preparadas no laboratório soluções 50 e 100 ng mL^{-1} . Pelo amostrador automático, seis pontos foram produzidos, por diluição dessas duas soluções com HNO_3 0,028 mol L^{-1} : 5, 10, 15, 20, 30 e 40 ng mL^{-1} de Se. A curva obtida está apresentada na Figura 4.21.

De posse da última curva, foi possível calcular EF, como sendo a razão entre a inclinação da reta $y = 0,0299x + 0,0041$ e a inclinação da reta representada na Figura 4.21 (47), encontrando-se o valor de 17.

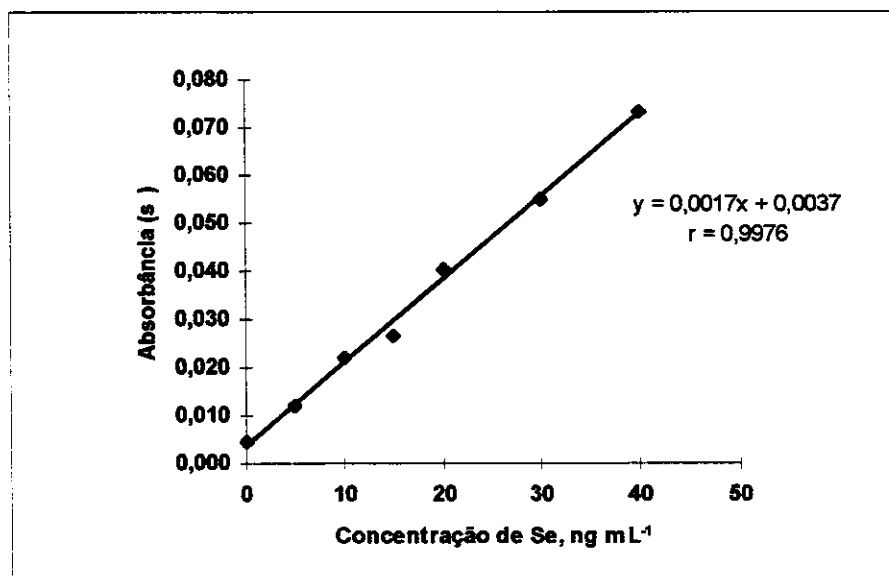


Figura 4.21 Curva analítica sem pré-concentração de Se.

4.3.2.4 – Verificação do desempenho do CPG silanizado na pré-concentração de Se a partir de matrizes reais

Foram efetuados diversos experimentos buscando pré-concentrar Se a partir de água potável e de digeridos de músculo bovino, ajustando o pH do meio e seguindo o mesmo procedimento adotado para a produção das curvas analíticas com pré-concentração, descritas em 4.3.2.3. Os resultados foram desfavoráveis, não tendo sido possível evidenciar a pré-concentração de Se.

Assim, concluiu-se que o CPG silanizado não tem suficiente seletividade para Se, que permita sua utilização direta em amostras reais. De resto, como visto na revisão bibliográfica, a maior parte das resinas utilizadas em pré-concentração tem sua utilidade demonstrada apenas em meios simples.

4.3.3 – Pré-concentração de Se com DDTC-SiO₂-C₁₈

Como visto na revisão bibliográfica, o DDTC reage com Se (IV) (90, 91) e um trabalho publicado mostrou que é possível utilizar a formação do complexo Se-DDTC para pré-concentrar e quantificar Se em matrizes complexas, por exemplo, rações, tecidos vegetais e tecidos animais (86). Nesse trabalho, os autores demonstraram também que a forma de Se resultante depois da digestão da amostra deve ser Se (IV), não sendo necessária alguma providência de redução, antes da complexação com DDTC (ou seja, se algum Se (VI) é formado, essa parcela é negligenciável, já que não foi possível evidenciar sua presença). No entanto, o procedimento sugerido, que envolveu extração líquido-líquido, parece bastante trabalhoso e demorado.

Entretanto, a extração em fase sólida, em princípio, poderia substituir com vantagens a extração líquido-líquido. Entre essas vantagens, estão a economia de tempo e reagentes (61). Decidiu-se desenvolver um método que contemplasse tal

substituição. Como sorvente, utilizou-se $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, que vem sendo empregado com sucesso em várias determinações (61, 62). Para evitar a toxicidade do metanol, usado como eluente nessas referências, optou-se, com sucesso, por etanol. Os resultados são comentados a seguir.

4.3.3.1 – Avaliação do efeito da presença do DDTC sobre a absorbância de Se

Antes de tentar efetuar a pré-concentração de Se com DDTC, foi necessário avaliar o efeito que a própria presença do complexante acarretaria na absorbância de Se, na determinação por ET AAS. Os resultados mostraram que a presença do DDTC pode deprimir a absorbância do analito, provavelmente devido à formação de uma espécie volátil com Se. Torna-se conveniente, portanto, empregar baixas concentrações desse complexante.

Como os resultados anteriores mostraram que o modificador Rh é muito eficiente em determinações de Se por ET AAS, optou-se pela sua adição, empregando-se massa previamente otimizada, igual a 5 μg . A Figura 4.22 ilustra as curvas de temperatura de pirólise obtidas para Se com e sem DDTC e também para Se-DDTC, com e sem Rh. A temperatura de pirólise foi fixada em 1300 °C. A temperatura de atomização foi mantida em 1900 °C.

Observa-se que, realmente, a adição do modificador químico Rh ameniza o efeito depressor que a presença do DDTC causa sobre a absorbância de Se.

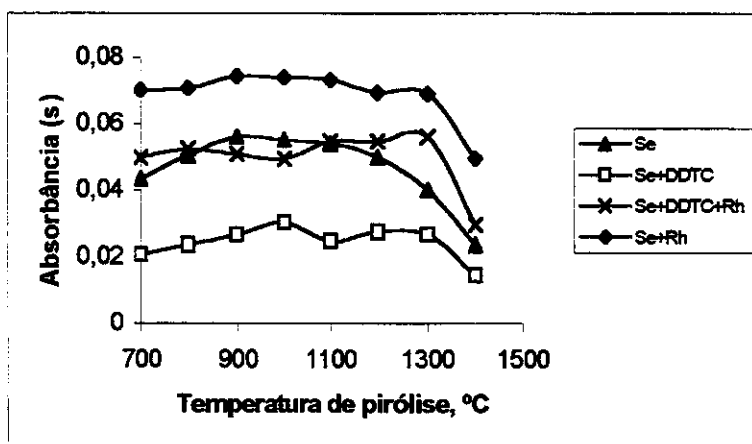


Figura 4.22 Efeito da temperatura de pirólise sobre a absorbância de 0,8 ng de Se, com e sem 40 µg de DDTC e 5 µg de Rh.

4.3.3.2 – Influência do pH na formação do complexo Se-DDTC

Testes com soluções de Se (IV) em HNO_3 de concentração variável levaram a concluir que a formação do complexo Se-DDTC mantém considerável independência do pH do meio, o que é extremamente desejável no desenvolvimento do novo método analítico. Porém, julgou-se adequado não ultrapassar a concentração de 0,5 % v/v ($0,7 \text{ mol L}^{-1}$) de HNO_3 , para preservar o material sorvente.

4.3.3.3 – Otimização da concentração do DDTC

Soluções de DDTC de concentrações diferentes, a saber, 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 % m/v, foram experimentadas com soluções de Se de 2, 4 e 8 ng mL^{-1} , utilizando ambas as possibilidades de injeção de volumes (5 e 25 mL) contempladas pelo procedimento de pré-concentração, descrito em 3.3.5.

Como já foi comentado, as concentrações mais altas de DDTC não são as mais indicadas, embora a pré-concentração ocorra. Surgem problemas como interferência na determinação de Se por ET AAS e ainda bloqueio da minicoluna. Além disso, sendo factível, é sempre preferível optar por soluções mais diluídas, de qualquer reagente, para diminuir custos e rejeitos.

As figuras 4.23 a 4.25 ilustram a otimização. Ao final do experimento, optou-se por assumir a concentração de DDTC igual a 0,002 % m/v para o procedimento de pré-concentração com injeção de 5 mL de amostra e 0,005 % m/v, quando se trata do procedimento com 25 mL.

A pré-concentração com DDTC pode ser realizada, portanto, com concentrações bastante baixas de complexante.

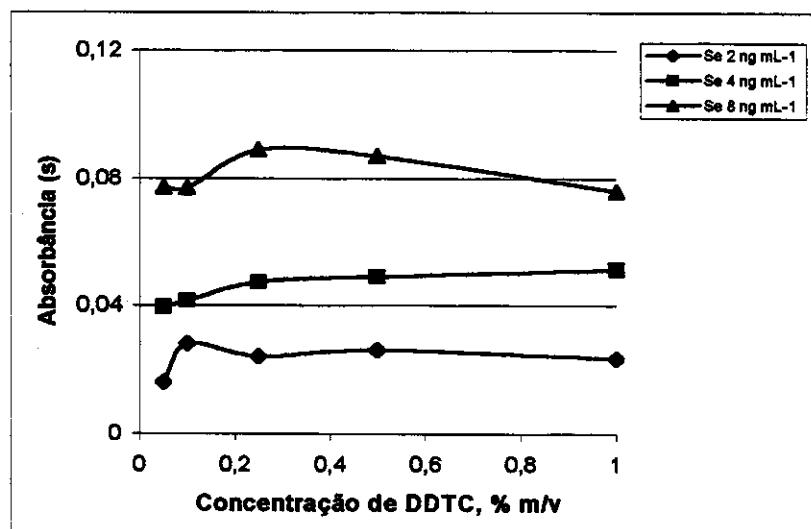


Figura 4.23 Otimização da concentração de DDTC para a pré-concentração de Se (a partir de soluções 2, 4 e 8 ng mL⁻¹ de Se). Procedimento com injeção de 5 mL de solução.

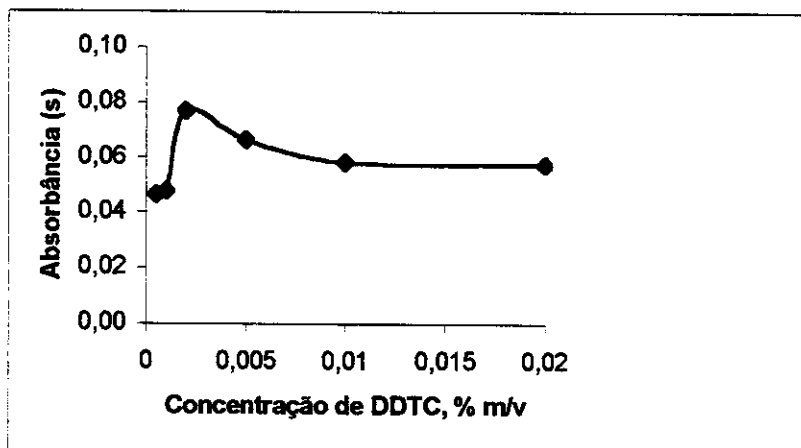


Figura 4.24 Otimização da concentração de DDTC para a pré-concentração de Se, a partir de solução 4 ng mL^{-1} do elemento. Procedimento com injeção de 5 mL de solução.

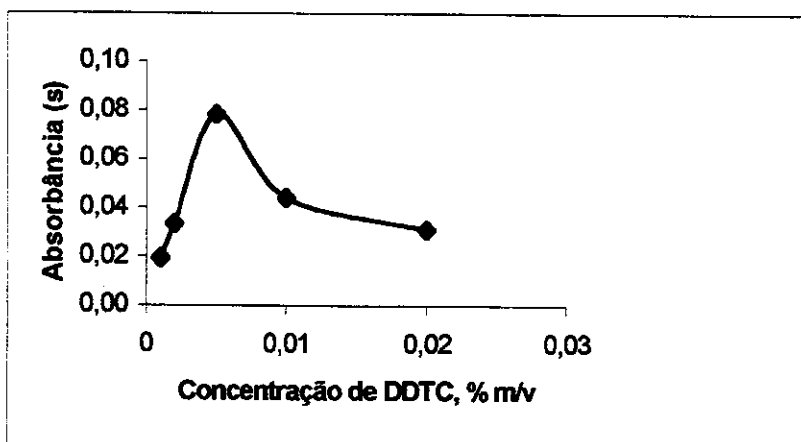


Figura 4.25 Otimização da concentração de DDTC para a pré-concentração de Se, a partir de solução 2 ng mL^{-1} do elemento. Procedimento com injeção de 25 mL de solução.

4.3.3.4 – Curva analítica com pré-concentração de Se em DDTC-SiO₂-C₁₈ e cálculo do EF

Feita a otimização da concentração de DDTC, foi efetuada a determinação do EF, através da razão entre o coeficiente angular da curva analítica com pré-concentração (procedimento com 25 mL de solução) e o coeficiente angular da curva analítica sem pré-concentração (47). Ambas as curvas analíticas foram obtidas no mesmo dia de trabalho, com o programa de temperatura e tempo usual para o forno de grafite e na presença de 5 µg de Rh. A concentração de DDTC empregada foi igual a 0,005 % m/v, otimizada para o procedimento de 25 mL. O valor encontrado para EF foi de 35. A curva analítica com pré-concentração é mostrada na Figura 4.26. Nessas condições, foi calculado o LD em solução (95), encontrando-se 0,3 ng mL⁻¹ de Se.

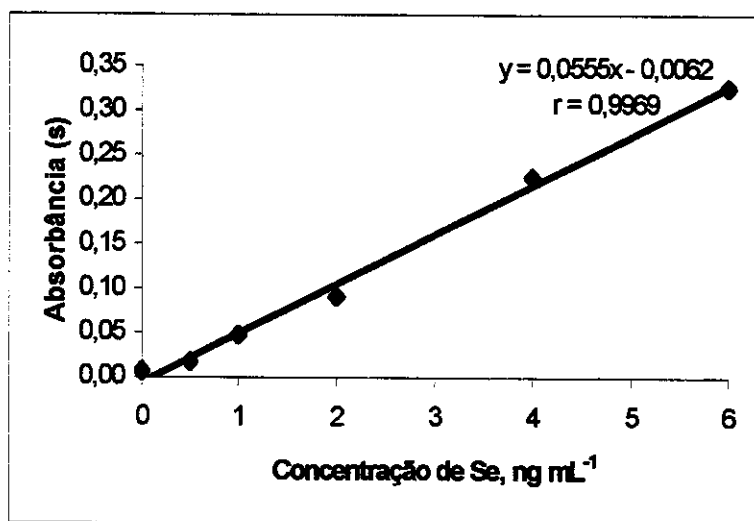


Figura 4.26 Curva analítica com pré-concentração de Se, obtida pelo procedimento do DDTC-SiO₂-C₁₈, com injeção de alíquotas de 25 mL de soluções de Se.

4.3.3.5 – Aplicação do procedimento com DDTC-SiO₂-C₁₈ a materiais certificados

Diferentemente do que ocorreu com a pré-concentração de Se em CPG silanizado, a aplicação do procedimento com DDTC-SiO₂-C₁₈ a amostras reais demonstrou que, neste caso, trata-se de um método bastante seletivo, já que a presença de concomitantes não é fator impeditivo à complexação do Se com DDTC, ou à retenção do complexo pelo sorvente. No entanto, alguma diluição do digerido da amostra sempre se faz necessária, porque ocorre efeito de matriz. A melhor forma de otimizar o FD é através de tentativas, executando a determinação de Se a partir de alíquotas diferentes do digerido, até que diluições sucessivas levem a um mesmo resultado.

O método foi aplicado, com sucesso, aos seguintes materiais certificados: Fish Tissue IAEA MA-B-3/TM; Cod Muscle CRM 422; Mussel Tissue CRM 278; Bovine Liver BCR 185 e Animal Blood IAEA A-13. Na falta de materiais com baixos teores de Se certificados, foi necessário utilizar os constantes nesta relação. A rigor, apenas o último listado poderia ser aceito como de baixo teor, como definido antes (Se inferior a 0,2-0,3 mg kg⁻¹). Os resultados estão apresentados em prosseguimento.

Tabela 4.3 Resultados da aplicação do procedimento com DDTC-SiO₂-C₁₈ a materiais certificados. Os valores se referem à média de, no mínimo, três replicatas independentes, por material.

Material de referência	Valor certificado	Valor encontrado
Fish Tissue IAEA MA-B-3/TM	1,46 (1,35-1,70) µg g ⁻¹	1,59 ± 0,09 µg g ⁻¹
Cod Muscle CRM 422	1,63 ± 0,07 µg g ⁻¹	1,65 ± 0,02 µg g ⁻¹
Mussel Tissue CRM 278	1,66 ± 0,04 µg g ⁻¹	1,66 ± 0,05 µg g ⁻¹
Bovine Liver BCR 185	446 ± 13 ng g ⁻¹	435 ± 12 ng g ⁻¹
Animal Blood IAEA A-13	0,24(0,15-0,31)µg g ⁻¹	0,25 ± 0,06 µg g ⁻¹

4.3.4 – Pré-concentração de Se com DDTP-SiO₂-C₁₈

Segundo a literatura, o DDTP pode complexar Se (IV) (91). Sendo essa a forma de Se que resulta depois de digestão nítrica de tecidos animais e vegetais (86), a complexação ficaria facilitada. Além disso, a pré-concentração de Se através da formação do complexo DDTP-Se, retenção do complexo sobre coluna de SiO₂-C₁₈ e posterior eluição com metanol para a detecção, foi empregada com sucesso na análise de diferentes matrizes por ICP-MS e ETV-ICP-MS (71, 72).

Entretanto, é necessário considerar o efeito que a própria presença de um reagente fosforado como o DDTP teria sobre a absorbância de Se, na determinação por ETAAS.

4.3.4.1 – Avaliação do efeito da presença do DDTP sobre a absorbância de Se

Compostos fosforados são eventualmente empregados como modificadores químicos, desde longa data (18). Assim, um experimento foi realizado com o objetivo de verificar se a presença do DDTP no momento da determinação de Se por ET AAS poderia produzir um efeito de modificação química, em comparação com outras situações.

Os primeiros resultados revelaram que a presença do DDTP não contribui para a estabilização de Se, muito ao contrário, significa uma fonte de interferência que deve ser contornada. Em consequência, tentativas foram efetuadas buscando eliminar esse efeito, através da adição de modificadores químicos.

Embora já houvesse sido previamente escolhido um modificador químico para a execução do presente projeto, conforme apresentado em 4.2, decidiu-se mais uma vez submeter à prova a escolha anterior, comparando resultados obtidos com Rh (III) e resultados obtidos empregando outros possíveis

modificadores. Foram construídas curvas variando a temperatura de pirólise entre 300 e 1400 °C (conforme programa indicado na Tabela 3.1) a intervalos de 100 °C, com no mínimo 3 repetições de cada ponto, para diversas soluções contendo Se, DDTP e possíveis modificadores químicos: Rh, Ni, Ir e Pd (sempre 5 µg de um deles e 0,8 ng de Se). A cada ciclo, 20 µL de solução foram dispensados no forno, conforme composição apresentada na tabela seguinte:

Tabela 4.4 Volumes (µL) das soluções de partida, para constituição de cada solução estudada no forno de grafite, objetivando a escolha de um modificador químico para ser usado na determinação de Se em presença de DDTP.

Soluções de partida / Soluções estudadas	Se	Se+DDTP	Se+DDTP+Rh	Se+DDTP+Ni	Se+DDTP+Ir	Se+DDTP+Pd
Se 200 ng mL ⁻¹ em HNO ₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L ⁻¹)	4	4	4	4	4	4
DDTP 2 % m/v em água	-	2	2	2	2	2
Rh 0,1 % (RhCl ₃) m/v em HNO ₃ 1 % v/v (0,14 mol L ⁻¹)	-	-	5	-	-	-
Ni 0,1 % (NiCl ₂) m/v em HNO ₃ 1 % v/v (0,14 mol L ⁻¹)	-	-	-	5	-	-
Ir 0,1 % (IrCl ₃) m/v em HNO ₃ 1 % v/v (0,14 mol L ⁻¹)	-	-	-	-	5	-
Pd 0,1 % (Pd(NO ₃) ₃) em HNO ₃ 1 % v/v (0,14 mol L ⁻¹)	-	-	-	-	-	5
Diluyente: HNO ₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L ⁻¹)	16	14	9	9	9	9

Os resultados estão mostrados na Figura 4.27. É possível verificar que a presença de DDTP deprime consideravelmente a absorbância obtida para Se e o efeito se faz sentir mais a medida em que a temperatura aumenta.

A adição de Rh minimizou a depressão da absorbância causada pela presença de DDTP. O pior resultado ocorreu com a adição de Pd. Dessa maneira, ficou reforçada a opção pelo modificador químico de Rh, para a continuação do trabalho. Entretanto, constatou-se que a estabilização de Se com Rh, na presença de DDTP, só ficou mantida até cerca de 1000 °C.

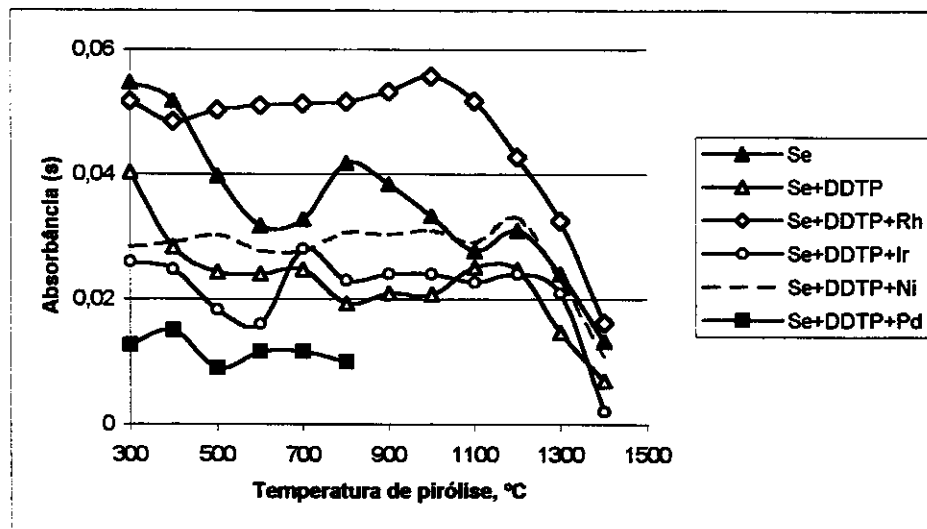


Figura 4.27 Efeito da temperatura de pirólise sobre a absorbância de 0,8 ng de Se, com e sem 40 µg de DDTP e modificadores químicos (ver Tabela 4.4).

4.3.4.2 – Influência do pH na formação do complexo Se-DDTP

Testes com soluções de Se (IV) em HNO₃ de concentração variável mostraram que a formação do complexo Se-DDTP é bastante independente do pH do meio. Aumentando-se a concentração de HNO₃, não foi observado

comprometimento da formação do complexo Se-DDTP até, pelo menos, 4 % v/v ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$) do ácido. Já em meio de HNO_3 8 % v/v ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$), um decréscimo de 15 a 20 % na absorbância de Se foi verificado. Como no trabalho com DDTC, julgou-se adequado não ultrapassar a concentração de 0,5 % v/v ($0,7 \text{ mol L}^{-1}$) de HNO_3 , para preservar o material sorvente.

4.3.4.3 – Otimização da concentração do DDTP

Soluções de DDTP de concentrações diferentes foram experimentadas com soluções de Se a 2, 4 e 8 ng mL^{-1} , utilizando ambas as possibilidades de injeção de volumes (5 e 25 mL) conforme o procedimento de pré-concentração, descrito em 3.3.5. Uma parte do experimento é ilustrada pela Figura 4.28.

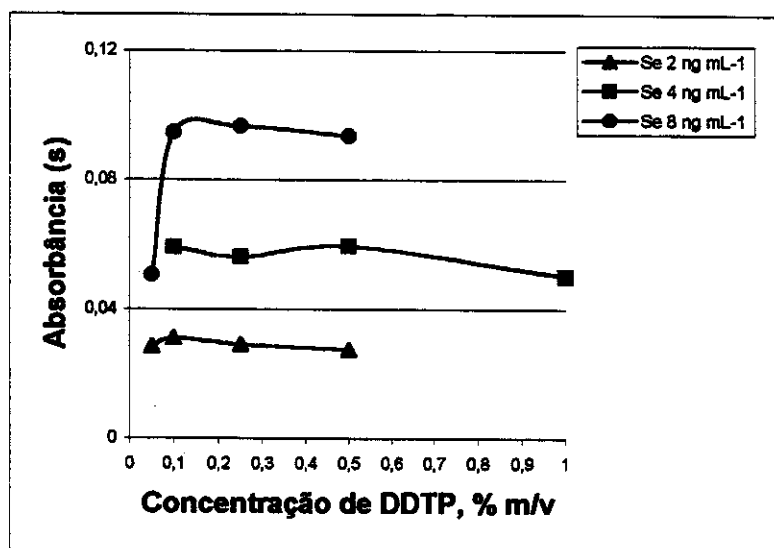


Figura 4.28 Otimização da concentração de DDTP para a pré-concentração de Se (a partir de soluções 2, 4 e 8 ng mL^{-1} de Se). Procedimento com injeção de 5 mL de solução.

Concluiu-se que a concentração de DDTP deve ser igual a, pelo menos, 0,1 % m/v, para garantir a presença de um excesso do reagente, no procedimento

com injeção de 5 mL de solução de Se. A concentração ótima de DDTP foi estabelecida entre 0,5 e 1 % m/v, para o procedimento com injeção de 25 mL de solução.

4.3.4.4 – Otimização do programa do forno de grafite para o trabalho com DDTP

Considerando-se que a estabilização do Se com Rh, na presença de DDTP, só ficou mantida até cerca de 1000 °C (conforme visto em 4.3.4.1), vários experimentos foram conduzidos, visando ao estabelecimento de um programa de forno de grafite que evitasse altas temperaturas de pirólise. Concluiu-se pela limitação dessa temperatura em 1000 °C (programa usual, mostrado na Tabela 3.1, porém com temperatura de pirólise alterada para 1000 °C) ou, simplesmente, pela adoção de um programa sem o passo de pirólise (Tabela 3.2).

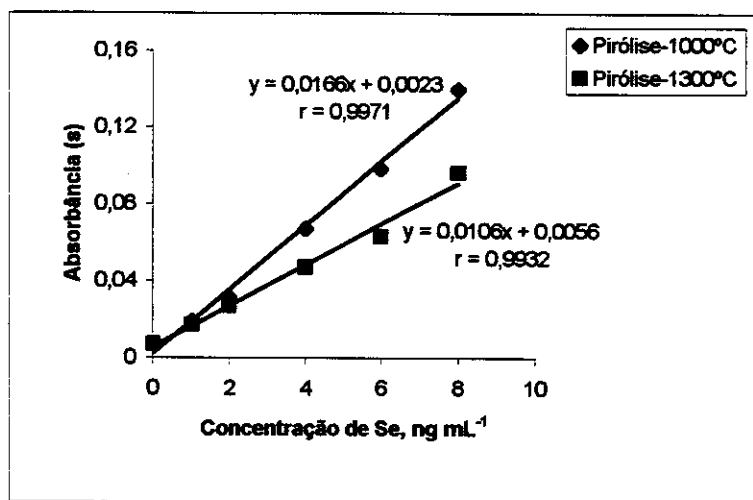


Figura 4.29 Curvas analíticas com pré-concentração de Se usando DDTP, a diferentes temperaturas de pirólise. Procedimento com injeção de 5 mL de soluções de Se.

A Figura 4.29 mostra a perda em sensibilidade que pode ocorrer, caso seja utilizada temperatura de pirólise igual a 1300 °C, em lugar de 1000 °C.

4.3.4.5 – Curva analítica com pré-concentração de Se em DDTP-SiO₂-C₁₈ e cálculo do EF

A Figura 4.31 mostra uma curva analítica obtida com a injeção de alíquotas de 25 mL de soluções de Se e DDTP 1 % m/v, empregando o programa alternativo (sem pirólise) para o forno de grafite.

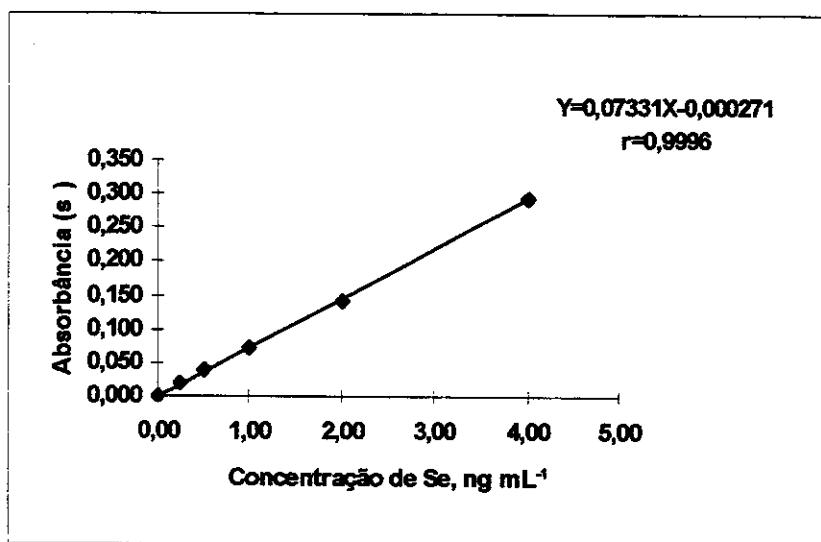


Figura 4.30 Curva analítica obtida com alíquotas de 25 mL de soluções de Se e DDTP 1 % m/v, e programa alternativo para o forno de grafite (Tabela 3.2).

Nessas condições, foi calculado o LD em solução (95), encontrando-se 0,1 ng mL⁻¹ de Se.

De posse de uma curva analítica de Se sem pré-concentração (do tipo apresentado na Figura 4.21), obtida no mesmo dia de trabalho e construída com

os pontos 0; 5; 10; 15; 20; 30 e 40 ng mL⁻¹ de Se em HNO₃ 0,2 % v/v (0,028 mol L⁻¹), obedecendo ao programa de forno usual (Tabela 3.1), na presença de 5 µg de Rh, foi calculado o EF (47), encontrando-se o valor de 65.

A Figura 4.31 mostra os pulsos atômico e de fundo, correspondentes ao ponto 2 ng mL⁻¹ de Se, integrante da curva analítica representada na Figura 4.30. Para melhor visualização, o perfil de fundo obtido na ausência de Se é também apresentado, em separado (ponto zero da mesma curva).

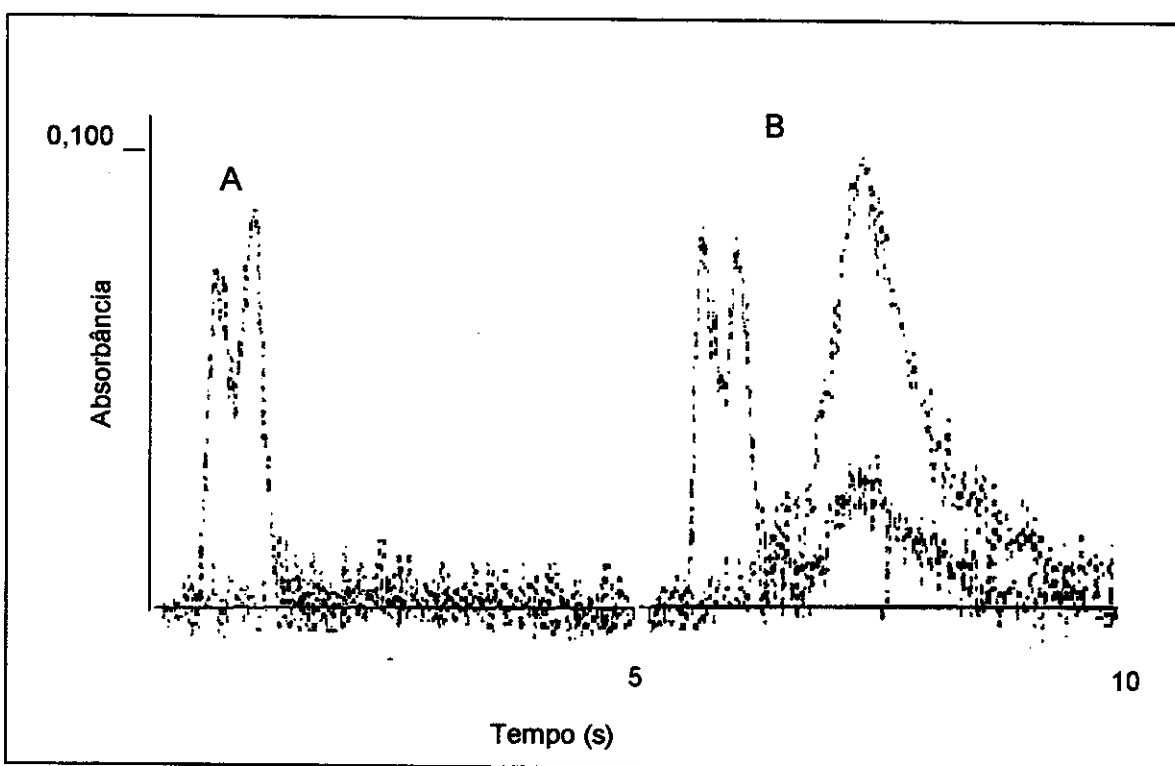


Figura 4.31 Pulsos atômico e de fundo registrados nas seguintes situações: A – ponto zero ng mL⁻¹ de Se, da curva analítica mostrada na Figura 4.30 (equivale apenas ao sinal de fundo); B – ponto 2 ng mL⁻¹ de Se, da mesma curva (o pulso mais alto é o atômico).

4.3.4.6 – Aplicação do procedimento com DDTP-SiO₂-C₁₈ a materiais certificados

Verificou-se que este procedimento é suficientemente seletivo, permitindo determinar Se na presença de matrizes reais, tal como aconteceu com o método anterior, usando DDTC-SiO₂-C₁₈. Entretanto, a diluição do digerido da amostra não pode ser dispensada, provavelmente porque ocorre efeito de matriz, novamente como descrito no método anterior.

O método foi aplicado com sucesso a vários materiais certificados: Fish Tissue IAEA MA-B-3-TM, Mussel Tissue CRM 278, Animal Blood IAEA A-13, Wholemeal Flour BCR 189 e Bovine Liver BCR 185, conforme apresentado na Tabela 4.5. Dentre esses, podem ser considerados como tendo baixo teor de Se os materiais Animal Blood IAEA A-13 e Wholemeal Flour BCR 189.

Tabela 4.5 Resultados da aplicação do procedimento com DDTP-SiO₂-C₁₈ a materiais certificados. Os valores se referem à média de, no mínimo, três replicatas independentes, por material.

Material de referência	Valor certificado	Valor encontrado
Fish Tissue IAEA MA-B-3/TM	1,46 (1,35-1,70) µg g ⁻¹	1,54 ± 0,21 µg g ⁻¹
Wholemeal Flour BCR 189	132 (122-142) ng g ⁻¹	135 ± 15 ng g ⁻¹
Mussel Tissue CRM 278	1,66 ± 0,04 µg g ⁻¹	1,63 ± 0,20 µg g ⁻¹
Bovine Liver BCR 185	446 ± 13 ng g ⁻¹	436 ± 68 ng g ⁻¹
Animal Blood IAEA A-13	0,24 (0,15-0,31) µg g ⁻¹	0,24 ± 0,03 µg g ⁻¹

4.3.4.7 – Aplicação do procedimento com DDTP-SiO₂-C₁₈ a amostra “cega”

O procedimento com DDTP-SiO₂-C₁₈ foi aplicado em dezembro de 2000, por ocasião do II EIC (Exercício Interlaboratorial Cooperativo) do Projeto TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), do Ministério da Saúde/NEPA-UNICAMP, no qual 16 laboratórios nacionais participaram, analisando amostras de alimentos visando à determinação de vários componentes.

No caso da determinação de Se, a coordenação do II EIC enviou uma amostra “cega” de alimento, isto é, não foram fornecidas informações a respeito da sua natureza, nem sobre a faixa de concentração esperada para o analito. As instruções exigiam que a análise fosse feita com quatro repetições, e tão-somente quatro, eliminando a possibilidade de executar-se mais replicatas. Além disso, o trabalho deveria ser conduzido sem delongas ou interrupções desnecessárias, evitando mudanças ambientais, de analista, ou outras.

Assim, quatro alíquotas da amostra (cerca de 0,25 g) foram submetidas à digestão em forno de microondas (Tabela 3.3), avolumando-se a 25 mL. Sobre cada um dos quatro digeridos obtidos, foi aplicado uma vez o método do DDTP-SiO₂-C₁₈ (3.3.5), fazendo-se três leituras de Se. Os resultados obtidos para as quatro replicatas foram: 0,099; 0,115; 0,076 e 0,077 µg g⁻¹ de Se, cuja média foi igual a 0,09 µg g⁻¹.

Passados alguns meses da entrega dos resultados, a coordenação do II EIC deu a conhecer a amostra “cega”: Tratava-se do formulado infantil NIST SRM 1846, cujo valor informado para Se é igual a 0,08 µg g⁻¹, que não difere significativamente (teste *t*, 95 %) do resultado encontrado.

Os demais laboratórios participantes do II EIC não realizaram a determinação de Se, de modo que não foi possível o estudo estatístico dos resultados, dentro do grupo.

4.3.5 – Comparação entre DDTC e DDTP na pré-concentração de Se

Com a finalidade de comparar sob diversos aspectos os dois métodos desenvolvidos que levaram a bons resultados quando aplicados a matrizes reais (4.3.3 e 4.3.4), alguns experimentos foram conduzidos, como segue.

4.3.5.1 – Comparação entre DDTC e DDTP quanto ao efeito da acidez do meio

Verificou-se que a pré-concentração de Se guarda independência considerável da acidez do meio, quer se use DDTP, quer se empregue DDTC. A Figura 4.33 demonstra isso. Deste ponto de vista, portanto, os dois complexantes são equivalentes na prática.

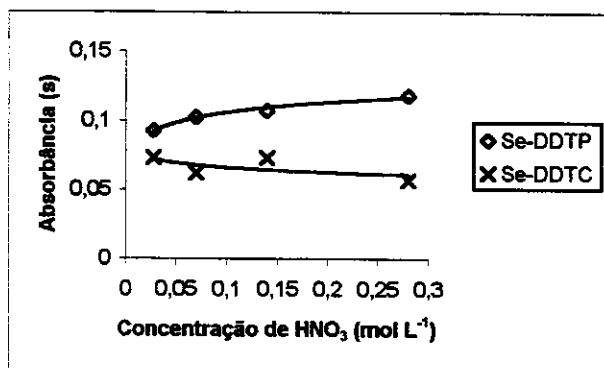


Figura 4.32 Efeito da acidez em HNO₃ sobre a pré-concentração de Se com DDTP ou DDTC. Concentrações utilizadas: Se 6 ng mL⁻¹, DDTP 0,1 % m/v e DDTC 1,5 % m/v. Modificador químico Rh (5 µg).

4.3.5.2 – Efeito da presença de DDTC e DDTP na absorbância de Se

Conforme comentado antes, ambos os complexantes tendem a deprimir a absorbância de Se, porém o efeito é menos severo na presença de um modificador químico comprovadamente eficiente, como Rh.

A Figura 4.33 mostra o que ocorre quando massas crescentes de DDTP ou DDTC são adicionadas sobre uma determinada massa fixa de Se, via amostrador automático, diretamente no forno de grafite, com o programa usual de tempo e temperatura (Tabela 3.1).

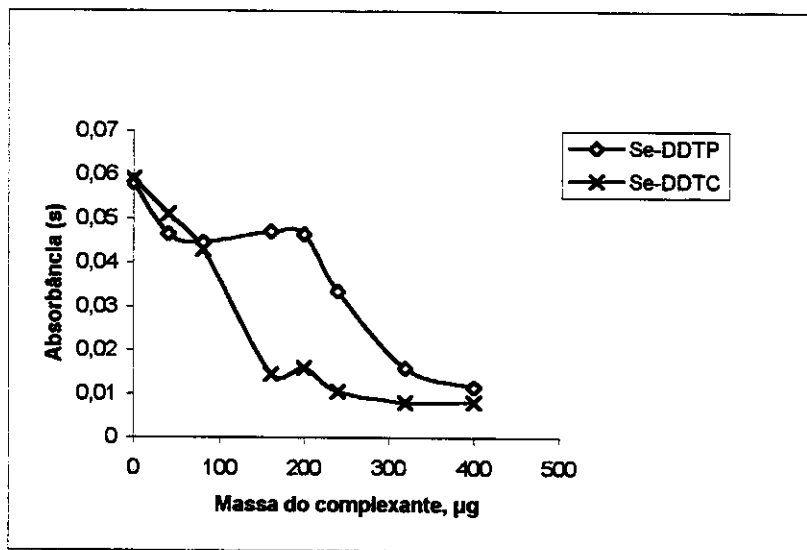


Figura 4.33 Efeito de massas crescentes de DDTP ou DDTC sobre a absorbância de 1 ng de Se, com o programa usual de temperatura e tempo do forno de grafite (Tabela 3.1), na presença de 5 µg de Rh.

O efeito ilustrado na Figura 4.33 leva à consideração de que um procedimento analítico desenvolvido para determinação de Se por ET AAS, utilizando qualquer um dos complexantes, deve evitar excesso desnecessário desse reagente.

Fixando-se a massa do complexante e variando-se a temperatura de pirólise, tem-se uma outra perspectiva sobre a influência da presença do complexante na absorbância de Se. Os resultados encontram-se na Figura 4.34. Foi utilizado o programa usual de temperatura e tempo do forno de grafite (Tabela 3.1), fazendo-se variar apenas a temperatura de pirólise.

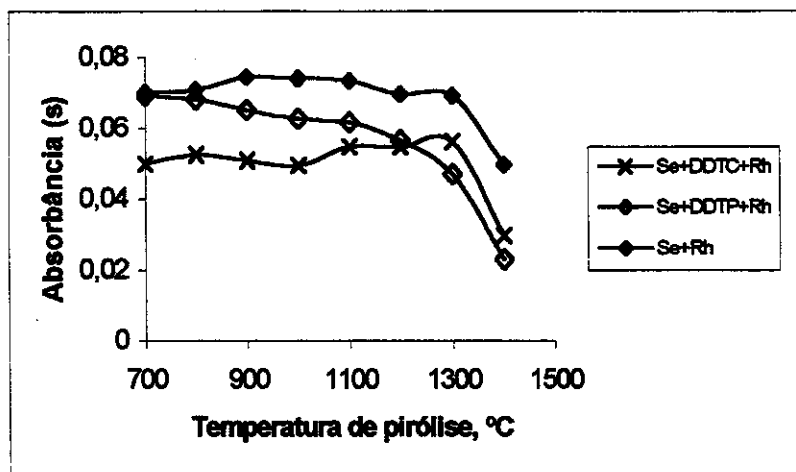


Figura 4.34 Efeito da temperatura de pirólise sobre a absorbância de 0,8 ng de Se, com e sem 40 µg de DDTC ou DDTP, na presença de 5 µg de Rh.

Desta feita, é possível observar que a depressão causada sobre a absorbância de Se é maior quando o complexante adicionado é o DDTC. Por outro lado, a curva de pirólise com DDTC sugere que só há perda de Se a partir de 1300 °C. Enquanto isso, a curva de pirólise feita com DDTP indica sinais de perda de Se antes disso. Assim, fica reforçado o posicionamento anterior, de limitar a 1000 °C a temperatura de pirólise, no caso do uso do DDTP, ou utilizar o programa alternativo para o forno de grafite, omitindo o passo de pirólise.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi demonstrada a ocorrência de efeito de matriz na determinação de Se em amostras do tipo de alimentos, em que pese a utilização de aparelhagem e conceitos modernos, na técnica da ET AAS.

O efeito de matriz deve ser causado pela interação entre concomitantes e não apenas pela presença deles. Assim, por exemplo, uma relativamente pequena concentração de Al pode acarretar variação significativa na absorbância de Se, em presença de cloreto. O estudo isolado de um possível interferente pode levar a concluir que não há influência da espécie sobre a absorbância obtida para o analito. Dessa forma, não foram encontradas evidências de que Ca e P, considerados cada um isoladamente, possam interferir na determinação de Se em alimentos por ET AAS. Entretanto, quando são considerados em conjunto, foi possível demonstrar que acarretam interferência, concordando com observações encontradas na bibliografia. Foram ainda levantadas evidências de que a interação Ca-Al também possa contribuir para o efeito de matriz.

O efeito de matriz pode ser facilmente contornado, quando a amostra contém um teor de Se tal que comporte diluições altas do material a ser analisado, sem com isso perder-se precisão e exatidão, nem descer a concentrações do analito inferiores ao LD. Entretanto, a determinação de baixos teores de Se (0,2-0,3 mg kg⁻¹, ou menos) em alimentos fica praticamente impossibilitada por ET AAS, a não ser que recursos complementares sejam usados, como separação e pré-concentração.

A determinação de Se por ET AAS necessita da presença de um modificador químico, quer devido a tratar-se de um analito volátil, quer porque há efeito de matriz. O presente projeto de pesquisa incluiu um estudo comparativo

entre Pd, Rh e Ir, no papel de modificador químico para a determinação de Se. Foram experimentadas adições de ácido ascórbico ou nitrato de magnésio a esses metais. O assunto foi retomado para o caso especial da presença do complexante DDTC ou DDTP, quando Ni foi também experimentado.

Os melhores resultados foram registrados com o uso de Rh como modificador químico: em solução diluída de HNO_3 , houve estabilização de Se até $1300\text{ }^\circ\text{C}$, mesmo em tubos de grafite bastante erodidos. Com Pd e Ir, isso não foi possível. Além disso, com Rh sempre se atingiu a melhor massa característica (no procedimento sem pré-concentração, em torno de $45\text{ pg}/0,0044\text{ s}$ com LCO, contra o mesmo valor constante no manual da Perkin Elmer, porém obtido com EDL e modificador de $\text{Pd-Mg}(\text{NO}_3)_2$), com pulsos atômicos bem formados, em todas as comparações feitas, incluindo os experimentos com DDTC ou DDTP. O sal utilizado como partida para o preparo do modificador, $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ para síntese, é muito solúvel em água, tem pureza satisfatória e custo comparativamente menor. Não foi possível evidenciar vantagens na adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a Pd, Rh ou Ir, ou na adição de ácido ascórbico a Rh ou Ir. Por outro lado, uma tentativa de produzir um modificador “permanente” unicamente à base de Rh teve resultados inferiores aos descritos em literatura para outros modificadores “permanentes”, como Ir (40) ou Rh-W (41), por exemplo.

A literatura é abundante em métodos de pré-concentração para metais, principalmente a partir de soluções aquosas simples, águas potáveis e outras matrizes não complexas. Entretanto, há escassez de propostas para a pré-concentração de ametais. Mais raros ainda são os métodos para pré-concentrar ametais a partir de matrizes complexas.

No presente trabalho, uma tentativa de pré-concentrar Se em fase sólida, utilizando uma resina preparada em laboratório, consistindo em cisteína imobilizada sobre CPG, não teve sucesso. Alguns resultados positivos foram obtidos com CPG silanizado, porém não foi possível demonstrar que o método

seja suficientemente seletivo para ser aplicado a matrizes reais. Além disso, funciona apenas em uma estreita faixa de pH.

Utilizando-se DDTC como complexante e $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ como sorvente do complexo Se-DDTC, um método de separação e pré-concentração de Se foi desenvolvido, demonstrando-se a sua aplicabilidade a matrizes reais, através da análise de materiais certificados. O método é bastante independente do pH do meio e, embora manual, permite realizar todo o procedimento no mesmo dia de trabalho, a partir da digestão da amostra, já que não há passos demorados a serem vencidos. O EF (47) foi determinado como sendo 35, enquanto o LD em solução (95) ficou em $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ de Se.

Outro método semelhante, porém empregando o complexante DDTP, foi desenvolvido com sucesso e melhores resultados, em relação ao anterior. O método foi validado através da análise de materiais certificados e mediante a análise de uma amostra "cega", fornecida por um programa interlaboratorial de âmbito nacional. Também este procedimento é suficientemente independente do pH do meio e livre de etapas demoradas, mas trata-se de método mais sensível, em comparação com o descrito utilizando DDTC. O EF determinado foi de 65, sendo o LD em solução igual a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de Se, contra 2 ng mL^{-1} da determinação de Se sem pré-concentração. O coeficiente de variação encontrado, em seqüências de cinco repetições, é de 10 %.

Recomenda-se o emprego do último método para a determinação de Se em alimentos por ET AAS, até concentração em torno de $0,05 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Para teores mais baixos de Se, seria necessário otimizar um procedimento mecanizado, tomando por base o método manual desenvolvido e aqui recomendado.

No caso de evidências de ocorrência de efeito de matriz quando o teor de Se é mais alto, por exemplo, em torno de $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, o mesmo método pode ser útil

apenas como procedimento para *clean-up* de digeridos de amostras, deixando-se a possibilidade de pré-concentração em segundo plano.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LIDE, D. R., Ed. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 75 ed. Boca Raton, CRC, 1994. Section 4-26.
2. BAGNALL, K. W. Selenium, Tellurium and Polonium. In: Comprehensive Inorganic Chemistry. Oxford, Pergamon, 1973.v.2, cap.24, p.935.
3. VAN LOON, J. C.e BAREFOOT, R. R. Trends and Developments. In: URE, A. M. e DAVIDSON, C. M. Ed.Chemical Speciation in the Environment Glasgow, Blackie 1995.cap.12, p.374.
4. NEAL, R. H. Selenium. In: ALLOWAY, B. J., Ed. Heavy Metals in Soils. 2 ed London, Blackie,1995. cap.12, p. 260-283.
5. REILLY, C. Metal Contamination of Food. 2 ed. Cambridge, Elsevier, 1991, p.163-171, 179-183.
6. LEVANDER, O. A. Selenium. In: MERTZ, W.Ed. Trace Elements in Human and Animal Nutrition.5 ed. Orlando, Academic Press, 1986. v. 2, cap. 3, p. 209-279.
7. MAGEE, R. J.& JAMES, B. D. Selenium. In: SEILER, H. G.; SIGEL, A.; SIGEL, H. Ed. Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry. New York, Marcel Dekker, 1994. cap. 46, p. 551-562.
8. COULTATE, T. P. Food; The Chemistry of Its Components. 2 ed. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1992. p. 219, 288.
9. O'NEILL, P. Environmental Chemistry. 2 ed. London, Chapman & Hall, 1993, p. 200.
10. PATCHING, S. G.; GARDINER, P. H. E. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review. **J. Trace Elem. Medic. Biol.**, **13**, 193-214, 1999.
11. BRASIL. Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n.º 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n.º 681, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, 29 de maio de 1965. Seção 1, pt. 1.
12. WALSH, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. **Spectrochim. Acta**, **7**, 108-117, 1955.

13. MASSMAN, H. Vergleich von atomabsorption und atomfluoreszenz in der graphitküvette. **Spectrochim. Acta**, **23B**, 215-226, 1968.
14. FERNANDEZ, F. J.; BOHLER, W.; BEATY, M. M.; BARNETT, W. B. Correction for high background levels using the Zeeman effect. **At. Spectrosc.**, **2**, 73-80, 1981.
15. SLAVIN, W.; MANNING, D. C.; CARNRICK, G. R. The stabilized temperature platform furnace. **At. Spectrosc.**, **2**, 137-145, 1981.
16. SLAVIN, W.; CARNRICK, G. R.; MANNING, D. C.; PRUSZKWSKA, E. Recent experiences with the stabilized temperature platform furnace and Zeeman background correction. **At. Spectrosc.**, **4**, 69-86, 1983.
17. SLAVIN, W.; CARNRICK, G. R. A survey of applications of the stabilized temperature platform furnace and Zeeman correction. **At. Spectrosc.**, **6**, 157-160, 1985.
18. TSALEV, L.; SLAVEYKOVA, V. I.; MANDJUKOV, P. B. Chemical modification in graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta Rev.**, **13**, 225-274, 1990.
19. KATSKOV, D. A.; MARAIS, P. J. J. G.; NGOBENI, P. Transverse heated filter atomizer for electrothermal atomic-absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **53B**, 671-682, 1998.
20. KATSKOV, D. A.; MARAIS, P. J. J. G.; KATKOVINIC, V. J.; TITTARELLI, P. Adaption of the filter furnace atomizer for atomic absorption determination of less volatile metals. **Spectrochim. Acta**, **52B**, 1377-1394, 1997.
21. DOCEKAL, B. A new design of the two-component atomizer for the direct determination of medium and volatile elements in high-purity solid refractory metals by electrothermal atomic-absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **53B**, 427-435, 1998.
22. KRUG, F. J. Emprego de filamentos de tungstênio como atomizadores e vaporizadores eletrotérmicos em espectrometria atômica: passado, presente e futuro. Conferência apresentada no 10º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, Santa Maria, 1999.
23. BRUHN, C. G.; NEIRA, J. Y.; VALENZUELA, G. D.; NOBREGA, J. A. Chemical modifiers in a tungsten coil electrothermal atomizer. Part 1. Determination of lead in hair and blood. **J. Anal. At. Spectrom.**, **13**, 29-35, 1998.
24. HILL, S. J.; DAWSON, J. B.; PRICE, W. J.; SHUTTLE, I. L. SMITH, C. M. M.; TYSON, J. F. Advances in atomic absorption and fluorescence spectrometry and related techniques. **J. Anal. At. Spectrom.**, **14**, 1245-1285, 1999.

25. BURGUERA, J. L. ; BURGUERA, M. Flow injection electrothermal atomic absorption spectrometry configurations; recent developments and trends. **Spectrochim. Acta**, **56B**, 1801-1829, 2001.
26. WELZ, B. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry – what can we expect? In: 11° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, Campinas, 2001. Livro de Resumos. Campinas: UNICAMP, 2001. p.xix-xx.
27. EDIGER, R. D. Atomic absorption analysis with graphite furnace using matrix modification. **At. Absorpt. Newslett.**, **14**, 127-130, 1975.
28. SCHLEMMER, G.; WELZ, B. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **41B**, 1157-1165, 1986.
29. HOENIG, M. Détermination du sélénium dans le sang par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique avec effet Zeeman: discussion des paramètres critiques. **Analisis**, **19**, 41-46, 1991.
30. VOLYNSKY, A. B.; KRIVAN, V. Behaviour of selenium (IV) in a transversely heated graphite atomizer for electrothermal atomic absorption spectrometry in the presence of platinum metals as chemical modifiers. **J. Anal. At. Spectrom.**, **12**, 333-340, 1997.
31. TERUI, Y.; YASUDA, K.; HIROKAWA, K. Metallographical consideration on the mechanism of matrix modifier in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal. Sci.**, **7**, 397-402, 1991.
32. TSALEV, D. L.; SLAVEYKOVA, V. I. Comparative study of ruthenium, rhodium and palladium as chemical modifiers in graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrosc. Lett.**, **25**, 221-238, 1992.
33. LI, M.; NI, Z.-M.; RAO, Z. Determination of selenium in biological tissue samples rich in phosphorus using electrothermal atomization with Zeeman-effect background correction and $(\text{NH}_4)_3\text{RhCl}_6$ + citric acid as a mixed chemical modifier. **Spectrochim. Acta**, **53B**, 1381-1389, 1998.
34. PEREZ-CORONA, M. T.; DE LA CALLE-GUNTINAS, M. B.; MADRID, Y.; CÁMARA, C. Glucose as a chemical modifier for the determination of antimony and selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **10**, 321-323, 1995.
35. LIANG, Y. Z.; LI, M.; RAO, Z. Nickel and strontium nitrates as modifier for the determination of selenium in urine by Zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Anal. Sci.**, **12**, 629-633, 1996.

36. SHUTTLE, I. L.; FEUERSTEIN, M.; SCHLEMMER, G. Long-term stability of a mixed palladium-iridium trapping reagent for in situ hydride trapping within a graphite electrothermal atomizer. **J. Anal. At. Spectrom.**, **7**, 1299-1301, 1992.
37. BULSKA, E.; JEDRAL, W. Application of palladium and rhodium plating of the graphite furnace in electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **10**, 49-53, 1995.
38. RADEMEYER, C. J.; RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; SKAUGSET, N. P.; SKGSTAD, A.; THOMASSEN, Y. Permanent iridium modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **10**, 739-745, 1995.
39. BULSKA, E.; PYRZYNSKA, K. Comparison of chemical modifiers for the determination of selenium by electrothermal atomic-absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **52B**, 1283-1291, 1997.
40. LIAO, Y. P.; HAUG, H. O. Investigation of stable coatings for in situ trapping of Se and Te in flow-injection hydride generation and graphite furnace atomic absorption spectrometry for automated determination, **Microchem. J.**, **56**, 247-258, 1997.
41. LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; JACKSON, K. W. Evaluation of tungsten-rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **53B**, 1791-1804, 1998.
42. MURPHY, J.; SCHLEMMER, G.; SHUTTLE, I. L.; JONES, P.; HILL, S. J. Simultaneous multi-element determination of hydride-forming elements by "in-atomiser trapping" electrothermal atomic absorption spectrometry on an iridium-coated graphite tube. **J. Anal. At. Spectrom.**, **14**, 1593-1600, 1999.
43. BULSKA, E.; PIASCIK, M.; PYRZYNSKA, K. Iridium modifier for determination of selenium by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal. Lett.**, **33**, 1399-1408, 2000.
44. LABORDA, F.; MEDRANO, J. CORTÉS, J. I.; MIR, J. M.; CASTILLO, J. R. Comparison of palladium and zirconium treated graphite tubes for in-atomizer trapping of hydrogen selenide in hydride generation electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **54B**, 343-353, 1999.
45. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis. New York, John Wiley and Sons, 1981.
46. FANG, Z. L. Non-equilibrated sample manipulation – the essence of flow-injection analysis. **Microchem. J.**, **45**, 137-142, 1992.

47. FANG, Z. Flow Injection Separation and Preconcentration. Weinheim, VHC, 1993.
48. FANG, Z.; RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Efficient flow-injection system with on-line ion-exchange pre-concentration for the determination of trace amounts of heavy metals by atomic-absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, **164**, 23-39, 1984.
49. FANG, Z.; DONG, L.; XU, S. Critical evaluation of the efficiency and synergistic effects of flow-injection techniques for sensitivity enhancement in flame atomic-absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **7**, 293-300, 1992.
50. FANG, Z. Flow-injection on-line column pre-concentration in atomic spectrometry. **Spectrochim. Acta Rev.**, **14**, 235-259, 1991.
51. OLSEN, S.; PESSEDA, L. C. R.; RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Combination of flow injection analysis with flame atomic spectrophotometry: determination of trace amounts of heavy metals in polluted seawater. **Analyst**, **108**, 905-917, 1983.
52. CALMON, C.; KRESSMAN, T. R. E. Ion Exchangers in Organic and Biochemistry. New York, Interscience, 1957, p. 3-33.
53. OSBORNE, G. H. Synthetic Ion-Exchangers. London, Chapman & Hall, 1961, p. 1-13.
54. DORFNER, K. Ion Exchangers. Berlin, de Gruyter, 1991, p. 7-170.
55. MARSHALL, M. A.; MOTTOLA, H. A. Performance studies under flow conditions of silica-immobilized 8-quinolinol and its application as a preconcentration tool in flow injection atomic absorption determinations. **Anal. Chem.**, **57**, 729-733, 1985.
56. HOWARD, M.; JUNBERGS, H. A.; HOLCOMBE, J. A. Comparison of silica-immobilized poly(L-cysteine) and 8-hydroxyquinoline for trace metal extraction and recovery. **J. Anal. At. Spectrom.**, **14**, 1209-1214, 1999.
57. ROCHOW, E. G. Silicon and Silicones. Berlin, Springer-Verlag, 1987, p.11-14.
58. AKMAN, S.; INCE, H.; KOKLU, U. Determination of some trace elements in sea-water by atomic absorption spectrometry after concentration with modified silicas. **J. Anal. At. Spectrom.**, **7**, 187-190, 1992.
59. ELMAHADI, H. A. M.; GREENWAY, G. M. Immobilized alga as a reagent for pre-concentration in trace element atomic-absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **6**, 643-646, 1991.

60. DIAS, V. M. C. Immobilized metallothionein for metal preconcentration and speciation in flow injection flame atomic absorption spectrometry. Dissertação de Mestrado, The University of Hull, 1993.
61. RUZICKA, J.; ARNDAL, A. Sorbent extraction in flow-injection analysis and its application to enhancement of atomic spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, **216**, 243-255, 1989.
62. MA, R.; VAN-MOL, W.; ADAMS, F. Determination of cadmium, copper and lead in environmental samples. An evaluation of flow injection online sorbent extraction for flame atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, **285**, 33-43, 1994.
63. TAO, G.; HANSEN, E. H. Determination of ultra-trace amounts of selenium (IV) by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line preconcentration by coprecipitation with lanthanum hydroxide. **Analyst**, **119**, 333-337, 1994.
64. LARRAYA, A.; COBO-FERNÁNDEZ, M. G.; PALACIOS, M. A.; CÁMARA, C. Preconcentration of inorganic selenium species (Se IV) and Se (VI)) in an alumina filled microcolumn and on-line determination by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Fresenius'J. Anal. Chem.**, **350**, 667-670, 1994.
65. PYRZYNSKA, K.; DRZWICZ, P.; TROJANOWICZ, M. Preconcentration and separation of inorganic selenium species on activated alumina. **Anal. Chim. Acta**, **363**, 141-146, 1998.
66. PYRZYNSKA, K. Separation of inorganic selenium species on anion-exchange resins. **Analyst**, **120**, 1933-1936, 1995.
67. KUBOTA, T.; OKUTANI, T. Determination of selenium content in natural water by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with molybdate-form anion exchange resin. **Anal. Chim. Acta**, **351**, 319-324, 1997.
68. ARPADJAN, S.; VUCHKOVA, L.; KOSTADINOVA, E. Sorption of arsenic, bismuth, mercury, antimony, selenium and tin on dithiocarbamate loaded polyurethane foam as a preconcentration method for their determination in water samples by simultaneous inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, **122**, 243-246, 1997.
69. CARRERO, P. E.; TYSON, J. F. Determination of selenium by atomic absorption spectrometry with simultaneous retention of selenium (IV) and tetrahydroborate (III) on an anion-exchange resin followed by flow injection hydride generation from the solid phase. **Analyst**, **122**, 915-919, 1997.

70. CARRERO, P. E.; TYSON, J. F. Flow injection determination of selenium by successive retention of Se (IV) and tetrahydroborate (III) on an anion-exchange resin and hydride generation electrothermal atomization atomic absorption spectrometry with in-atomizer trapping. Part 1. Method development and investigation of interferences. **Spectrochim. Acta**, **53B**, 1931-1943, 1998.
71. DRESSLER, V. L.; POZEBON, D.; CURTIUS, A. J. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation and preconcentration. **Spectrochim. Acta**, **53B**, 1527-1539, 1998.
72. POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Determination of copper, cadmium, lead, bismuth and selenium (IV) in sea-water by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation. **J. Anal. At. Spectrom.**, **13**, 363-369, 1998.
73. SLAVIN, W.; CARNRICK, G. R.; MANNING, D. C.; PRUSZKOWSKA, E. Recent experiences with the stabilized temperature platform furnace and Zeeman background correction. **At. Spectrosc.**, **4**, 69-86, 1983.
74. LETOURNEAU, V. A.; JOSHI, B. M. Comparison between Zeeman and continuum background correction for graphite furnace AAS on environmental samples. **At. Spectrosc.**, **8**, 145-149, 1987.
75. CARNRICK, G. R.; MANNING, D. C.; SLAVIN, W. Determination of selenium in biological materials with platform furnace atomic-absorption spectroscopy and Zeeman background correction. **Analyst**, **108**, 1297-1312, 1983.
76. CABON, J. Y.; BIHAN, A. L. Interference of various salts on the determination of selenium by graphite furnace atomic absorption spectrometry: effect of sea water. **Anal. Chim. Acta**, **402**, 327-338, 1999.
77. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; VOELLKOPF, U. Influence of the valency state on the determination of selenium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, **39B**, 501-510, 1984.
78. JOHANNESSEN, J. K.; GAMMELGAARD, B.; JONS, O.; HANSEN, S. H. Comparison of chemical modifiers for simultaneous determination of different selenium compounds in serum and urine by Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **8**, 999-10043, 1993.
79. GAMMELGAARD, B.; JONS, O. Comparison of palladium chemical modifiers for the determination of selenium in plasma by Zeeman-effect background correct electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **12**, 465-470, 1997.

80. WELZ, B.; MELCHER, M.; NÈVE, J. Determination of selenium in human body fluids by hydride-generation atomic absorption spectrometry-Optimization of sample decomposition. **Anal. Chim. Acta**, **165**, 131-140, 1984.
81. PATTERSON, K. Y.; VEILLON, C.; KINGSTON, H. M. Microwave digestion of biological samples: selenium analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. In: KINGSTON, H. M. & JASSIE, L. B. Ed. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice. Washington, DC, American Chemistry Society, 1988. Chap. 7, p. 154-166.
82. HANNA, C. P.; CARNRICK, G. R.; MCINTOSH, S. A.; GUYETTE, L. C.; BERGMANN, D. E. The determination of selenium in nutritional supplement formulas by flow injection-hydride generation coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry. **At. Spectrosc.**, **16**, 82-85, 1995.
83. GAWALKO, E. J.; NOWICKI, T. W.; BABB, J.; TKACHUK, R. Comparison of closed-vessel and focused open-vessel microwave dissolution for determination of cadmium, copper, lead and selenium in wheat, wheat products, corn bran, and rice flour by transverse-heated graphite furnace atomic absorption spectrometry. **J. AOAC Intern.**, **80**, 379-387, 1997.
84. JANUZZI, G. S. B.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z. Application of the slurry technique to the determination of selenium in fish samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, **12**, 375-378, 1997.
85. DEAKER, M.; MAHER, W. Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. **Anal. Chim. Acta**, **350**, 287-294, 1997.
86. HOCQUELLET, P.; CANDILLIER, M-P. Evaluation of microwave digestion and solvent extraction for the determination of trace amounts of selenium in feeds and plant and animal tissues by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, **116**, 505-509, 1991
87. MENG, L. X.; NANTO, V.; LI, S. P.; WALLS, M.; MAKELA, A.L.; WANG, W.; LAIHONEN, P.; KETOLA, M. Determination of selenium in natural water by AAS after solvent extraction. **Microchem. J.**, **52**, 223-230, 1995.
88. ATANASSOVA, D.; STEFANOVA, V.; RUSSEVA, E. Co-precipitative pre-concentration with sodium diethyldithiocarbamate and ICP AES determination of selenium, copper, lead, zinc, iron, cobalt, nickel, manganese, chromium and cadmium in water. **Talanta**, **47**, 1237-1243, 1998.
89. ATANASSOVA, D.; STEFANOVA, V.; RUSSEVA, E. ICP AES determination of arsenic, selenium, copper and lead in biological samples after coprecipitative preconcentration with dithiophosphates. **Anal. Lab.**, **7**, 213-217, 1998.

90. CHENG, K. L.; UENO, K.; IMAMURA, T., Ed. CRC Handbook of Organic Analytical Reagents. Boca Raton, CRC, 1982. p. 389-395.
91. DE, A. K.; KHOPAR, S. M.; CHALMERS, R. A. , Ed. Solvent extraction of metals. London, Van Nostrand, 1970, cap. 8-9.
92. MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Statistics for Analytical Chemistry. 2 ed. Chichester, Ellis Horwood, 1992. 227p.
93. ANDERSON, R. L. Practical Statistics for Analytical Chemists, New York, Van Nostrand Reinhold, 1987, 316p.
94. CIAPELLANO, S.; BRIGUENTI, F.; PORRINI, M.; TESTOLIN, G. Selenium determination in foodstuffs using Zeeman GFAAS. In: MINOIA, C. & CAROLI, S. Ed. Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology .Oxford, Pergamon Press, 1992. p. 279-304.
95. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY.
Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-III. **Spectrochim. Acta**, **33B**, 247-269, 1978.

ANEXO

Procedimento proposto para a determinação de baixos teores de selênio em alimentos

Determinação de baixos teores de selênio em alimentos

1 Objetivo e campo de aplicação

Este método tem por objetivo a determinação de Se por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS), em alimentos sólidos contendo entre 0,05 e 1 mg kg⁻¹ do elemento (1). Trata-se de método manual, portanto aplica-se a número limitado de amostras por dia de trabalho.

2 Princípio

Consiste em digerir a amostra e, a partir do digerido, separar e pré-concentrar o elemento Se, seguindo os passos: a) adição do agente complexante dietilditiofosfato (DDTP); b) retenção do complexo formado entre o DDTP e o Se, utilizando minicoluna recheada com SiO₂-C₁₈; c) eluição com etanol, para imediata determinação do Se no eluato, por ET AAS.

3 Execução

3.1 Aparelhagem

- Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite, dotado de corretor de fundo baseado no efeito Zeeman, amostrador automático e lâmpada de Se
- Atomizadores de grafite com recobrimento de grafite pirolítico e plataforma de L'vov
- Bomba peristáltica, tubos (diâmetro interno 0,8 mm), conexões plásticas, lã de vidro silanizada
- Digestor à base de microondas, sistema fechado, com controle de pressão
- Balança analítica (precisão 0,0001g)
- Micropipetas com pontas ejetáveis
- Papel de filtro sem cinzas, média porosidade e vidraria convencional

3.2 Reagentes e soluções

- Água desionizada, para a limpeza de material
- Solução de ácido nítrico grau analítico 0,28 mol L⁻¹ (uso apenas para preparar solução de limpeza de material, como vidraria, utensílios de polietileno, polipropileno e outros polímeros): diluir 20 mL de ácido nítrico concentrado (14 mol L⁻¹) de grau analítico a 1 L, com água desionizada.
- Água de baixa condutividade, obtida em sistema purificador tipo Milli-Q, ou equivalente (uso em todos os passos do preparo de reagentes e análise)
- Ácido nítrico concentrado (14 mol L⁻¹) de alta pureza (tipo Suprapur) e diluições em água
- Etanol 95% ,de grau analítico
- Sílica gel 100 C₁₈ – fase reversa, para uso em cromatografia de coluna (SiO₂-C₁₈)
- Solução-estoque 1000 mg L⁻¹ de Se: dissolver 1,000 g de Se em pó (99,5 % pureza mínima), por

Determinação de baixos teores de selênio em alimentos

aquecimento em 80 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} e diluir a 1000 mL, em balão volumétrico. Demais soluções de Se: obter por diluição dessa solução-estoque. Executar as diluições em HNO_3 0,028 mol L^{-1} , sempre partindo do ácido nítrico concentrado de alta pureza.

- Solução de modificador químico 1 g L^{-1} de Rh: dissolver 0,25 g de $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (38% Rh) para síntese em aproximadamente 15 mL de água, em copo de politetrafluoroetileno, adicionar 1 mL de HNO_3 concentrado de alta pureza, levar quase à secura, em chapa aquecedora, repetir a adição do ácido e a evaporação mais 3 vezes, para substituir os ânions Cl^- por NO_3^- . Finalmente, adicionar 1 mL de água, levar quase à secura e transferir com HNO_3 0,14 mol L^{-1} para balão volumétrico de 100 mL, avolumando com o mesmo ácido.
- Solução de 0,5 % m/v de DDTP: dissolver 0,5 g de $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{NH}_4$ 95 % em água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e avolumar. Purificar por passagem através de minicolumna recheada com 30 mg de $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. A solução tem estabilidade limitada. Mantida em frasco de polietileno, à temperatura ambiente, pode ser usada no máximo por 2 a 3 dias.

3.3 Procedimento

3.3.1 Limpeza de vidraria e outros materiais

Antes do uso, deixar de molho a vidraria e o material de polietileno, polipropileno e outros polímeros por, no mínimo, 24 horas em solução de HNO_3 grau analítico 0,28 mol L^{-1} . Descartar a solução nítrica e enxaguar o material com água desionizada em abundância, por 5 vezes, mantendo o último enxágue por 24 horas ou mais. Finalmente, o material deve ser posto a escorrer em secador plástico, até secar.

3.3.2 Digestão da amostra

- a) Pesar com exatidão cerca de 0,3 g de amostra previamente preparada, em frascos próprios do digestor por microondas, adicionar 5 mL de ácido nítrico concentrado (14 mol L^{-1}) de alta pureza, instalar os frascos no carrossel do digestor e executar o programa apresentado na Tabela 3.1.

NOTA: Para a preparação da amostra, sugere-se tomar como referência os métodos da AOAC International (2)

- b) Uma vez completado o programa, deixar o carrossel do digestor ainda girar por, no mínimo, mais 15 min, para arrefecimento.
- c) Abrir os frascos resfriados e transferir os conteúdos quantitativamente para balões volumétricos de 25 mL, filtrando em papel de porosidade média e avolumando com água.

Tabela 3.1 Programa do forno de microondas (seis frascos) para a digestão de amostras de alimentos (exaustão 100%).

Estágio	1	2	3
Potência (W)	252	252	252
Pressão (MPa)	0,276	0,586	1,03
Tempo (min)	6	6	10
Tempo na pressão (min)	3	3	5

Determinação de baixos teores de selênio em alimentos

3.3.3 Pré-concentração

- Preparar uma minicoluna recheada com 30 mg de $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, feita com um segmento (aproximadamente 1,5 cm) do mesmo tipo de tubo da cabeça de bomba peristáltica em uso, tampando as extremidades com lã de vidro silanizado. Utilizando conexões plásticas, ligá-la à extremidade final do tubo de cabeça de bomba. Adaptar, na extremidade inicial do tubo de cabeça da bomba e na extremidade final, depois da minicoluna, segmentos de tubo mais fino (0,8 mm de diâmetro). Com o auxílio da bomba, introduzir água no conjunto e deixar assim de um dia para outro. A minicoluna pode durar por semanas, desde que seja guardada sempre cheia com água. No momento do uso, condicioná-la com HNO_3 0,028 mol L^{-1} .
- Preparar no laboratório, em balões volumétricos de 25 mL, soluções de Se em HNO_3 0,028 mol L^{-1} , com concentrações de 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 4,00 ng mL^{-1} , para a curva analítica, no dia da análise.
- Ao ponto zero da curva, adicionar 1 mL da solução de DDTP, homogeneizar e imediatamente fazer passar todo o volume (26 mL) pela minicoluna, utilizando uma vazão de 5 mL min^{-1} na bomba peristáltica.
- Eluir com 200 μL de etanol, coletar o eluato diretamente em uma cubeta do amostrador automático do espectrômetro, instalar a cubeta no amostrador e efetuar imediatamente a determinação de Se, conforme 3.3.4.
- Lavar o conjunto da minicoluna com 5 mL de HNO_3 0,028 mol L^{-1} , antes de outro ciclo de pré-concentração. Repetir todo o processo para os outros pontos da curva.
- Diluir uma alíquota de 500 a 2 000 μL do digerido da amostra a 25 mL em balão volumétrico, com HNO_3 0,028 mol L^{-1} . Adicionar 1 mL da solução de DDTP, homogeneizar e imediatamente fazer passar todo o volume (26 mL) pela minicoluna, utilizando uma vazão de 5 mL min^{-1} na bomba peristáltica.

NOTA: A alíquota mais adequada deve ser determinada por tentativa. Alíquotas diferentes, dentro do intervalo analítico, devem produzir resultados finais consistentes.

- Eluir com 200 μL de etanol, coletar o eluato diretamente em uma cubeta do amostrador automático do espectrômetro, instalar a cubeta no amostrador e efetuar imediatamente a determinação de Se, conforme 3.3.4.
- Lavar o conjunto da minicoluna com 5 mL de HNO_3 0,028 mol L^{-1} , antes de outro ciclo de pré-concentração. Proceder da mesma forma com todas as amostras. Repetir a curva analítica no final do trabalho ou a intervalos, dependendo do número de amostras.

3.3.4 Determinação de Se

Determinar Se por ET AAS, seguindo as instruções do manual do espectrômetro e registrando a absorbância integrada obtida com o programa de temperatura e tempo do forno de grafite, mostrado na Tabela 3.2. Programar o amostrador automático para pipetar, antes de cada ciclo: 10 μL do eluato + 5 μL de HNO_3 0,028 mol L^{-1} + 5 μL da solução de Rh (total 20 μL).

Determinação de baixos teores de selênio em alimentos

Tabela 3.2. Programa de temperatura e tempo do forno de grafite, para a determinação de Se.

Passo	Temperatura, °C	Rampa, s	Tempo na temperatura, s	Vazão de Ar, mL min ⁻¹
Secagem 1	110	1	30	250
Secagem 2	200	5	50	250
Atomização	1900	0	5	0
Limpeza	2400	1	2	250

4 Cálculo do Resultado

Pelo “método dos mínimos quadrados” (3), calcular a equação da reta correspondente à curva analítica e interpolar os resultados de absorbância encontrados para as amostras, obtendo os respectivos valores de concentração. Expressar o resultado final sobre a amostra sólida, levando em conta a massa original da amostra, o volume inicial (25 mL) e o fator de diluição efetuado em 3.3.3 alínea f) (por exemplo, se a alíquota for 800 µL, o fator de diluição será 25 mL/0,8 mL = 31,25).

NOTA: Sugere-se que as amostras sejam analisadas no mínimo em triplicata, conjuntamente com três repetições de soluções-branco da análise e materiais certificados de referência. Também podem ser realizados testes de recuperação.

5 Referências Bibliográficas

1. DIAS, V. M. C. Quantificação de Baixos Teores de Selênio em Alimentos por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
2. AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17.ed. Gaithersburg, 2000. CD-ROM.
3. MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Statistics for Analytical Chemistry. 2. ed. Chichester, Ellis Horwood, 1992. 227p.