

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO
DE MERCÚRIO E SELÊNIO UTILIZANDO TÉCNICAS DE GERAÇÃO DE VAPOR
ACOPLADAS À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO
DE GRAFITE**

MARIANA DA LUZ POTES

PORTO ALEGRE, JANEIRO DE 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIANA DA LUZ POTES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO
DE MERCÚRIO E SELÊNIO UTILIZANDO TÉCNICAS DE GERAÇÃO DE VAPOR
ACOPLADAS À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO
DE GRAFITE**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof.^a Dr.^a Márcia Messias da Silva
Orientadora

Porto Alegre, janeiro de 2018

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (08/2013) e (01/2018), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Orientador Márcia Messias da Silva . A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

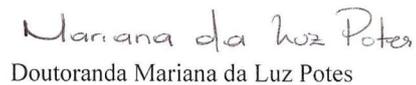

Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro


Prof. Dr. Morgana Bazzan Dessuy


Prof. Dr. Emilene Mendes Becker


Prof. Dr. Claudia Alcaraz Zini


Prof. Dr. Márcia Messias da Silva


Doutoranda Mariana da Luz Potes

*Dedico a minha vó Daura pelo seu olhar
generoso sobre a vida, que a todos contagia.*

AGRADECIMENTOS

À professora Márcia Messias da Silva pela orientação, apoio e amizade e por ter confiado a mim o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Maria Goreti Rodrigues Vale pelo apoio, incentivo e por ter propiciado todas as condições para o desenvolvimento do trabalho.

Aos integrantes da banca de exame de qualificação e da banca de defesa de tese por terem aceito ao convite e por suas contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Às professoras Morgana Dessuy e Emilene Becker pelo incentivo, amizade e pelo exemplo de dedicação.

Ao Dr. Jixin Liu, pela doação do reator fotoquímico.

Ao LANAGRO (Maria Aparecida) pela doação de amostras e soluções padrão.

Ao professor Alexandre Schneider pelo empréstimo do digestor UV.

Ao programa de pós-graduação em química da UFRGS, pela oportunidade. E aos professores e funcionários do IQ, em especial ao Sr. Édson Schwarz de Melo, Sr. José Iraci, Sra. Lurdes pela prestação exímia de seus serviços.

Agradeço aos amigos e colegas do GAT: Aline, Álvaro, Ândria, Antônio, Ariane, Carol, Charles, Débora, Deninha, Eliana, Gabi, Josi, Luíza, Marcelo, Marianna, Natália, Rafaela, Raimundo, Susane, Tati, Thaís, Wiliam pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Em especial, agradeço aos amigos Clarice, Alex, Jana, Leandro, Carla e Flávio "Xicó" pelos ensinamentos científicos, pela amizade e incentivo.

Agradeço enormemente pelo suporte e incentivo dos meus pais Osvaldo e Vera, do Guto, da Mara, meus irmãos Luiza e Renan e ao Johnny.

Agradeço pelo apoio financeiro à CAPES, Propeq e CNPq (Pesquisador Visitante Especial 2013 Processo 400575/2013-2).

PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADAPOR ESTE TRABALHO

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

1. Potes, M. L.; Nakadi, F.V.; Frois, C. F. G.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M. Investigation of spectral interferences in the determination of selenium in coconut water by atomic absorption spectrometry. In: **14th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2017, Vitória, Brasil.**
2. Potes, M. L.; Jesus, A.; Kolling, L.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B.; Silva, M. M. Determinação de mercúrio em peixe por geração fotoquímica de vapor acoplada a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **18^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis, Brasil**
3. Potes, M. L.; Frois, C. F. G.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M. Determinação de selênio por técnicas de geração de vapor acopladas a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **18^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis, Brasil**
4. Potes, M. L.; Jesus, A.; Kolling, L.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M. Evaluation of different chemical modifiers for determination of mercury by photochemical vapor generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. **13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2014, Mérida, México.**
5. Potes, M. L.; Borges, A. R.; Duarte, A. T.; François, L. L.; Vale, M. G. R.; Welz, B. Indirect determination of fluorine in eye shadow via CaF using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2014, Mérida, México.**

ARTIGOS COMPLETOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS

1. Potes, M. L.; Jesus, A.; Kolling, L.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B.; Silva, M. M. Determination of mercury in fish by photochemical vapor generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Methods*, 8, 8165-8172, **2016**
2. Potes, M. L.; Nakadi, F.V.; Frois, C. F. G.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M. Method development for selenium determination in coconut water by photochemical vapor generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. Em redação.

3. Potes, M. L.; Nakadi, F.V.; Frois, C. F. G.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M. Investigation of spectral interferences in the determination of selenium in coconut water by atomic absorption spectrometry. Em redação.

DEMAIS TRABALHOS PUBLICADOS/APRESENTADOS DURANTE O DOUTORADO

1. Borges, A. R.; Duarte, A. T.; Potes, M. L.; Silva, M. M.; Vale, M. G. R.; Welz, B. Fluorine in eye shadow: Development of method using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry via calcium mono-fluoride with direct solid sample introduction. *Microchem. J.* 124, 410-415, **2016**.
2. Leite, C. C.; Jesus, A.; Potes, M. L.; Vieira, M. A.; Samios, D.; Silva, M. M. Direct determination of Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Na, Ni, Pb and Zn in ethanol fuel by high resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. *Energy Fuels.* 19,7358–7363,**2015**.
3. Leite, C. C.; Jesus, A.; Antunes, G. A.; Potes, M. L.; Brum, L. S.; Kolling, L.; Silva, M. M. Determinação de cobre, ferro e sódio em álcool etílico combustível por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com chama. **17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte, Brasil.**

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTAS DE ABREVIATURAS.....	XVIII
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 MERCÚRIO E SELÊNIO	3
2.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	5
2.2.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE	8
2.3 GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	10
2.3.1 GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE.....	14
2.4 GERAÇÃO FOTOQUÍMICA DE VAPOR.....	15
2.4.1 APLICAÇÕES ANALÍTICAS DA GERAÇÃO FOTOQUÍMICA DE VAPOR.....	18
2.5 PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE Hg E Se POR TÉCNICAS DE GERAÇÃO DE VAPOR.....	20
3. OBJETIVOS	25
3.1 GERAL.....	25
3.2 ESPECÍFICOS.....	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	26
4.2. LIMPEZA DO MATERIAL	29
4.3. REAGENTES E AMOSTRAS.....	29
4.3.1 Mercúrio	30

4.3.2 Selênio	30
4.4 PREPARO DE AMOSTRA	31
4.4.1 Determinação de mercúrio em peixe por PVG-GF AAS	31
4.4.2 Determinação de selênio em água de coco por HG-GF AAS	31
4.4.3 Determinação de Se em água de coco por PVG-GF AAS	32
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
4.5.1 Mercúrio	32
4.5.2 Selênio	34
4.6 PARÂMETROS DE MÉRITO.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 MERCÚRIO	39
5.1.1 Otimização das condições de geração fotoquímica de vapor	39
5.1.2 Programa de temperatura e modificador químico	42
5.1.3 Linearidade e pré-concentração	45
5.1.4 Preparo de amostra	46
5.1.5 Parâmetros de mérito	47
5.1.6 Eficiência da geração fotoquímica de vapor.....	49
5.1.7 Resultados analíticos	49
5.2 SELÊNIO.....	51
5.2.1 Otimização das condições de geração de hidreto de Se acoplada à GF AAS	51
5.2.1.1 Efeito da concentração de ácido e de reagente redutor	51
5.2.1.2 Efeito da vazão de argônio	53
5.2.1.3 Programa de temperatura.....	54
5.2.1.4 Preparo de amostra	57
5.2.1.5 Parâmetros de mérito	59
5.2.1.6 Resultados analíticos	60

5.2.2	Análise direta de Se em água de coco por GF AAS.....	62
5.2.3	Otimização da geração fotoquímica de vapor de Se.....	69
5.2.3.1	Efeito da concentração de ácido fórmico	69
5.2.3.2	Programa de temperatura.....	71
5.2.3.3	Efeito da concentração de HNO ₃ e H ₂ O ₂	72
5.2.3.4	Efeito da vazão do gás carreador.....	76
5.2.3.5	Efeito da vazão da solução	78
5.2.3.6	Parâmetros de mérito	79
5.2.3.7	Eficiência da geração fotoquímica de vapor.....	80
5.2.3.8	Balanço de massa.....	80
5.2.3.9	Pré-redução do Se (VI).....	84
5.2.3.10	Efeito do HCl.....	86
5.2.3.11	Preparo de amostra	86
5.2.3.12	Resultados analíticos	91
6.	CONCLUSÕES	92
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação do sistema para geração fotoquímica de vapor com UV. Adaptado de Viera *et al.* 16
- Figura 2.** Reator fotoquímico (a) e esquema do reator (b) utilizados na PVG do Hg; lâmpada de UV (c), espiral de quartzo (d) e esquema do reator (e) empregados na PVG do Se. 28
- Figura 3.** Esquema do sistema de geração fotoquímica de vapor. 1) percurso analítico de tubo de quartzo sintético fino (800 μL volume interno); 2) lâmpada de mercúrio de baixa pressão (Figura 2a); 3) fonte de energia; 4) eletrodo de tungstênio. Adaptado de Jesus *et al.* 33
- Figura 4.** Esquema do sistema de HG utilizado para determinação de Se por GF AAS. Adaptado de Matoušek *et al.* 35
- Figura 5.** Esquema do sistema de PVG utilizado na determinação de Se por GF AAS. Modificado de Matoušek *et al.*⁷⁷ 36
- Figura 6.** Efeito da vazão da solução na absorvância integrada de Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em 10% (v/v) de: ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 700 \text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente $250 \mu\text{g Au}$ 40
- Figura 7.** Efeito da concentração de ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲) na absorvância integrada de Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução $2,7\text{-}3,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 700 \text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente $250 \mu\text{g Au}$ 41
- Figura 8.** Efeito da vazão do gás carreador na absorvância integrada de Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em 10% (v/v) de: ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução de $2,7\text{-}3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $T_{\text{col}} 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 700 \text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente $250 \mu\text{g Au}$ 41
- Figura 9.** Curvas de temperatura de coleta de Hg a partir de uma solução analítica de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg com 10% (v/v) de: ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲) com (a) $250 \mu\text{g}$ e (b) $500 \mu\text{g}$ de Au como modificador permanente. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução $2,7\text{-}3,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{at}} 700 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 42

- Figura 10.** Curvas de temperatura de atomização de Hg, a partir de uma solução analítica de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg em 10% (v/v) de ácido acético (■); ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲) com (a) 250 μg e (b) 500 μg de Au como modificador permanente. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução 2,7-3,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{col} 100 °C..... 43
- Figura 11.** Perfis de absorvância de Hg a partir de uma solução contendo 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg com temperatura de atomização (a) 500 °C e (b) 600 °C em 10% (v/v) ácido acético; (c) 500 °C e (d) 600 °C em 10% (v/v) ácido fórmico; (e) 500 °C e (f) 600 °C em 10% *n*-propanol. Sinal analítico (–) e sinal de fundo (···). Condições experimentais: 250 μg Au como modificador permanente; vazão da solução 2,7-3,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{col} 100 °C..... 45
- Figura 12.** Efeito do volume de solução na absorvância integrada de Hg (8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10% (v/v) *n*-propanol). Condições experimentais: vazão da solução 3,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{col} 100°C; T_{at} 600 °C; modificador permanente 250 μg Au..... 46
- Figura 13.** Efeito da concentração de HCl na absorvância integrada de uma solução padrão de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV) (■) e Se (VI) (□). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 2,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 110 mL min^{-1} ; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 μg Ir. 52
- Figura 14.** Efeito da concentração de agente redutor (NaBH_4) na absorvância integrada de Se (IV) (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de NaBH_4 2,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 110 mL min^{-1} ; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 μg Ir. 53
- Figura 15.** Efeito da vazão de argônio na absorvância integrada de Se (IV) (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) NaBH_4 2,0 mL min^{-1} ; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 μg Ir. 54
- Figura 16.** Curva de temperatura de coleta de SeH_2 a partir de uma solução analítica de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 2,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 125 mL min^{-1} ; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 μg Ir..... 55

- Figura 17.** Curva de temperatura de atomização de SeH_2 a partir de uma solução analítica de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 56
- Figura 18.** Perfil de absorvância de Se obtido a partir de uma solução analítica de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV). Sinal analítico (–) e sinal de fundo (⋯). Condições experimentais: $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g}$ de Ir; vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} 56
- Figura 19.** Efeito da concentração de HCl na absorvância integrada de uma amostra de água de coco fortificada com Se (VI) (concentração final $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$), após digestão em forno de micro-ondas. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=2$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 58
- Figura 20.** Efeito da concentração de NaBH_4 na absorvância integrada de uma amostra de água de coco fortificada com Se (VI) (concentração final $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$), após digestão em forno de micro-ondas. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=2$). Condições experimentais: vazão da solução de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 59
- Figura 21.** Curvas de temperatura de pirólise e atomização utilizando uma solução padrão de $38 \mu\text{g L}^{-1}$ Se. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: volume injetado $20 \mu\text{L}$; T_{at} empregada durante a otimização da $T_{\text{pir}} 2000 \text{ }^\circ\text{C}$; T_{pir} empregada durante a otimização da $T_{\text{at}} 1400 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 62
- Figura 22.** Perfis de absorvância da amostra de água de coco 2 não diluída (a) e diluída cinco vezes (b). Sinal analítico (–) e sinal de fundo (⋯). $T_{\text{pir}} 1400 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g}$ de Ir. 63
- Figura 23.** Perfis de absorvância da amostra de água de coco 2 utilizando GF AAS com efeito Zeeman como sistema de correção de fundo, obtidos com a introdução de alíquotas de (a) $10 \mu\text{L}$, (b) $20 \mu\text{L}$, (c) $30 \mu\text{L}$ e (d) $40 \mu\text{L}$. Sinal analítico (–) e sinal de fundo (⋯). $T_{\text{pir}} 1400 \text{ }^\circ\text{C}$ e $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 65
- Figura 24.** Perfis de absorvância da amostra de água de coco 4 utilizando GF AAS com sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman, obtidos com a introdução de

alíquotas de (a) 10 μL , (b) 20 μL , (c) 30 μL e (d) 40 μL . Sinal analítico (–) e sinal de fundo (⋯); T_{pir} 1400 °C; T_{at} 2100°C; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$ 66

Figura 25. Espectro de absorção molecular resolvido temporalmente da amostra de água de coco 1 (sem diluição) na vizinhança da linha de 196,027 nm. T_{pir} 1400 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$ 68

Figura 26. Espectro de absorção resolvido no tempo de uma molécula de NO na vizinhança da linha de 196,027 nm, gerado a partir de NH_4NO_3 . T_{pir} 1100 °C; T_{at} 2300 °C; modificador químico 10 $\mu\text{g Ni}$ 69

Figura 27. Efeito da concentração de ácido fórmico sobre o sinal analítico de uma solução padrão de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (■) e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (□) de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra 2,5 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$ 70

Figura 28. Curva de temperatura de coleta e atomização para uma solução analítica de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se (IV) em 0,44 mol L^{-1} de ácido fórmico. Na otimização da T_{col} foi utilizada 2200 °C como T_{at} ; na otimização da T_{at} foi utilizada 300 °C como T_{col} . Condições experimentais: vazão da amostra 2,5 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$ 71

Figura 29. Perfil de absorvância obtido a partir de uma solução analítica de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV) em 0,44 mol L^{-1} de ácido fórmico. Sinal analítico (–) e sinal de fundo (⋯). Condições experimentais: T_{col} 300 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$; vazão da amostra 2,5 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} 72

Figura 30. Efeito da concentração de HNO_3 sobre o sinal analítico de uma solução padrão de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (■) e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (□) de Se (IV) em 0,44 mol L^{-1} de ácido fórmico. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra 2,5 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{col} 300 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$ 73

Figura 31. Efeito da concentração de ácido fórmico na absorvância integrada de Se (IV) (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) na presença de 14 mmol L^{-1} de HNO_3 . Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão de amostra 2,5 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{col} 300 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$ 74

- Figura 32.** Efeito da concentração de H_2O_2 na absorvância integrada de Se (IV), $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (■) e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (□) em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 75
- Figura 33.** Efeito da vazão do gás carreador introduzido após o reator fotoquímico na absorvância integrada de Se (IV) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 76
- Figura 34.** Efeito da vazão do gás carreador introduzido antes do reator fotoquímico, na absorvância integrada de Se (IV) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 77
- Figura 35.** Efeito da vazão da amostra sobre o sinal analítico de uma solução padrão de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (○) e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (●) de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n = 3$). Condições experimentais: vazão de Ar 115 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 78
- Figura 36.** Fluxograma das etapas de coleta das alíquotas para o balanço de massa..... 81
- Figura 37.** Efeito do óxido de titânio na pré-redução *on line* de uma solução padrão de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (VI) (■) em relação ao Se (IV) (▨). Condições experimentais: vazão da solução $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 115 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 85
- Figura 38.** Representação esquemática das reações de oxi-redução fotocatalíticas que ocorrem na superfície do TiO_2 . Adaptada de Sturgeon e Grinberg.⁴⁷ 85
- Figura 39.** Efeito da concentração de HCl na absorvância integrada de Se (IV) ($5 \mu\text{g L}^{-1}$ em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ ácido fórmico). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 115 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 86
- Figura 40.** Recuperação de SeMet na amostra de água de coco 1 fortificada com 15 ng de Se submetida à digestão UV com $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl (■) e com $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 (○) e H_2O_2 por PVG-GF AAS. Condições experimentais: vazão da solução $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 115 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$ 90

Figura 41. Fotos ilustrativas do processo de digestão com irradiação UV após (a) 1 e (b) 6 horas de digestão. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para a digestão das amostras de água de coco	32
Tabela II. Programa de temperatura utilizado para o recobrimento da parede do tubo de grafite com 250 µg Au	34
Tabela III. Programa de temperatura utilizado na determinação de Hg em peixe por PVG-GF AAS.....	34
Tabela IV. Programa de temperatura utilizado para o recobrimento da plataforma do tubo de grafite com 120 µg Ir.....	35
Tabela V. Programa de temperatura utilizado na determinação de Se por PVG e HG acoplada à GF AAS.....	37
Tabela VI. Programa de temperatura utilizado na determinação de Se por GF AAS por amostragem líquida	37
Tabela VII. Massa característica obtida com 250 e 500 µg de Au como modificador permanente para três compostos orgânicos de baixo peso molecular. Média n=3) (coeficiente de variação)	44
Tabela VIII. Parâmetros de mérito para a determinação de Hg em peixe por PVG-GF AAS. Condições experimentais: 2,5% (v/v) TMAH e 10% (v/v) <i>n</i> -propanol	48
Tabela IX. Concentração de Hg em CRM e amostras de peixe por PVG-GF AAS. As concentrações são expressas como média ± desvio padrão (n = 3)	50
Tabela X. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por HG-GF AAS	60
Tabela XI. Concentração de Se em amostras de água de coco obtida por HG-GF AAS e teste de recuperação. Nos testes de recuperação a concentração final de Se nas amostras fortificadas foi 3,0 µg L ⁻¹ . As concentrações estão expressas como média ± desvio padrão combinado (n=3)	61
Tabela XII. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por GF AAS com lâmpada de deutério como corretor de fundo	63
Tabela XIII. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por GF AAS com sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman	64

Tabela XIV. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por PVG-GF AAS.....	79
Tabela XV. Recuperação de Se (10 ng) em alíquotas submetidas à PVG, com introdução de Ar antes e após o reator, seguida de quantificação por HG*	82
Tabela XVI. Recuperação de Se (75 ng) em alíquotas submetidas à PVG seguida de quantificação por HG e por análise direta GF AAS.....	84
Tabela XVII. Preparo de amostras para determinação de Se em amostras de água de coco. As amostras foram fortificadas com uma solução de padrão de SeMet para resultar em 5 µg L ⁻¹ Se. Experimentos realizados em duplicata.....	88
Tabela XVIII. Concentração de Se em amostras de água de coco obtidas por PVG-GF AAS e testes de recuperação. Média ± desvio padrão (n=2)	91

LISTAS DE ABREVIATURAS

A_{int}	Absorvância integrada
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês “ <i>atomic fluorescence spectrometry</i> ”)
CV	Vapor frio (do inglês “ <i>cold vapor</i> ”)
CVG	Geração química de vapor (do inglês “ <i>chemical vapor generation</i> ”)
CRM	Material de referência certificado (do inglês “ <i>certified reference material</i> ”)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês “ <i>flame atomic absorption spectrometry</i> ”)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês “ <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> ”)
HCL	Lâmpada de cátodo oco (do inglês “ <i>hollow cathod lamp</i> ”)
HG	Geração de hidretos (do inglês “ <i>hydride generation</i> ”)
HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite (do inglês “ <i>high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> ”)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês “ <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ”)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês “ <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> ”)
ID	Diluição isotópica (do inglês “ <i>isotopic dilution</i> ”)
LD	Limite de detecção
LMWC	Composto orgânico de baixo peso molecular (do inglês “ <i>low molecular weight organic compound</i> ”)
LQ	Limite de quantificação
PVG	Geração fotoquímica de vapor (do inglês “ <i>photochemical vapor generation</i> ”)

QTA	Atomizador de tubo de quartzo (do inglês “ <i>quartz tube atomizer</i> ”)
T _{at}	Temperatura de atomização
T _{col}	Temperatura de coleta
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio (do inglês “ <i>tetramethylammonium hydroxide</i> ”)
T _{pir}	Temperatura de pirólise

RESUMO

A geração química de vapor (CVG) e a geração fotoquímica de vapor (PVG) são técnicas analíticas empregadas na conversão do analito, presente na fase condensada, em uma espécie volátil, previamente a sua introdução no sistema de detecção. Neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos analíticos para a determinação de Hg e Se em amostras biológicas por técnicas de geração de vapor acopladas à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). A determinação exata e precisa de Hg em amostras de peixe foi possível após a solubilização em hidróxido de tetrametilamônio e adição de *n*-propanol, como composto orgânico de baixo peso molecular, e detecção por PVG-GF AAS. O método analítico desenvolvido com o emprego da técnica de PVG para a determinação de Se em água de coco por GF AAS resultou em limites de detecção e quantificação de 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, os quais foram semelhantes aos obtidos por CVG. Os métodos desenvolvidos para a determinação de Hg e Se por PVG-GF AAS em amostras biológicas são sensíveis, livres de interferência espectral, de baixo custo e representam uma alternativa viável a CVG.

ABSTRACT

Chemical vapor generation (CVG) and photochemical vapor generation (PVG) are analytical techniques used to convert the analyte into a volatile species in liquid phase, before the introduction into the detection system. In this study, analytical procedures for the determination of Hg and Se in biological samples by vapor generation techniques coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) were developed. Accurate Hg determination in fish samples was possible after a solubilization in tetramethylammonium hydroxide and adding *n*-propanol, as low molecular organic compound, using PVG-GF AAS. The developed method for Se determination in coconut water with PVG-GF AAS have resulted in limits of detection and quantification of 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively and that were similar with those obtained with CVG. The developed methods for Hg and Se determination in biological samples using PVG-GF AAS are sensitive, free of spectral interference, low-cost, and are a feasible alternative for CVG.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por uma alimentação saudável, em oposição ao intenso processo de poluição dos recursos naturais, torna necessário o desenvolvimento de metodologias simples, exatas e precisas, para a determinação de elementos essenciais e tóxicos em níveis sub-traços em alimentos.

O Hg, ao entrar no ambiente aquático, sofre metilação pelos micro-organismos e posteriormente é acumulado ao longo da cadeia alimentar, principalmente como metilmercúrio. Desse modo, concentrações várias vezes maiores podem ser atingidas em peixes predadores e mamíferos do que em suas presas. Fato que levou a Agência de Proteção Ambiental e a Administração de Alimentos e Medicamentos do Estados Unidos a recomendarem às mulheres gestantes, lactantes e crianças a evitarem o consumo destes peixes¹.

Por outro lado, o Se é um elemento essencial presente em proteínas e enzimas que desempenham papéis-chave no metabolismo dos seres vivos. No entanto, o excesso bem como a carência deste elemento, podem resultar em prejuízos à saúde. Além disso, é atribuído ao Se a capacidade de proteção contra a toxicidade do Hg ao formar complexos inertes com este.

No Brasil, os principais alimentos fontes de Se são a castanha-do-pará, alimentos de origem animal como carne vermelha, ovos e peixes. Além destes, outros alimentos também são investigados como a água de coco. A crescente comercialização de água de coco, industrializada ou *in natura*, em toda extensão do território nacional deve-se a sua composição química (carboidratos, proteínas, vitaminas) de baixa caloria e ao seu caráter isotônico conferido pela presença de minerais (como K e Na). Por esse motivo, é indicada para a reposição de eletrólitos para pacientes com problemas gastrointestinais. No entanto, a concentração de Se em água de coco é variável e pouco estudada.

As técnicas de geração de vapor, que consistem na conversão do analito presente na fase líquida em uma espécie volátil, apresentam uma série de vantagens em relação às técnicas de amostragem líquida para determinação de elementos como Hg e Se. Dentre as vantagens, destacam-se a alta eficiência de transporte da analito em relação à nebulização pneumática (cerca 100%), separação prévia do analito da matriz, minimizando interferências espectrais, e capacidade de introdução de volumes maiores no sistema de geração de vapor, o que confere menores limites de detecção relativos.

Dessa forma, este trabalho de tese visa o desenvolvimento de metodologias baseadas na conversão dos analitos a espécies voláteis pelas técnicas CVG e PVG, acopladas à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para a determinação de Hg em amostras de peixes e Se em água de coco. A CVG, uma técnica de geração de vapor consolidada, foi empregada também como uma técnica comparativa à PVG. A PVG foi avaliada como uma alternativa simples à CVG, pois requer apenas uma lâmpada UV e um composto orgânico de baixo peso molecular para geração de compostos voláteis do analito.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Item serão abordados aspectos relacionados à toxicidade e à essencialidade associados à ingestão dos elementos Hg e Se, respectivamente. Será apresentada, também, uma breve revisão sobre os princípios da técnica de espectrometria de absorção atômica e das técnicas de geração química e fotoquímica de vapor, as quais foram empregadas neste trabalho. E por fim, serão apresentados aspectos práticos referentes à etapa de preparo de amostra para a determinação dos elementos Hg e Se em amostras biológicas por técnicas de geração de vapor acopladas a técnicas espectrométricas.

2.1 MERCÚRIO E SELÊNIO

Mercúrio ocorre na natureza como Hg elementar (Hg^0), inorgânico (íon mercurioso, Hg_2^{2+} , e íon mercúrico, Hg^{2+}) e orgânico (sendo metilmercúrio, CH_3Hg^+ , e dimetilmercúrio, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, os mais comuns), os quais possuem diferentes propriedades toxicológicas². Mercúrio circula naturalmente na biosfera e é liberado na atmosfera por processos naturais como desgaseificação da crosta terrestre e dos oceanos, atividade vulcânica, intemperização de rochas, depósitos geológicos de Hg, e volatilização dos oceanos. No entanto, as atividades antropogênicas, como mineração de Au (artesanal ou em pequena escala), queima de combustíveis fósseis (principalmente carvão), mineração de metais não-ferrosos, refino de óleo, produção de cimento, incineração de resíduos, amálgama dental, lâmpadas fluorescentes, entre outras atividades, representam a principal fonte de liberação de Hg. A emissão global de Hg para atmosfera oriunda das atividades humanas, em 2010, foi estimada em média 1.960 t, com um intervalo de incerteza de 1.010-4.070 t³⁻⁵.

No ambiente aquático, o Hg inorgânico é convertido em CH_3Hg^+ (composto orgânico lipofílico) pelos micro-organismos. O CH_3Hg^+ , por sua vez, é acumulado nos músculos dos peixes, principalmente pelo consumo de organismos que contêm CH_3Hg^+ , processo denominado de bioacumulação. Outra possibilidade é o CH_3Hg^+ ser biomagnificado através da cadeia alimentar, processo que ocorre quando predadores se alimentam de presas que já possuem CH_3Hg^+ bioacumulado em seus tecidos. No decorrer do tempo, peixes predadores do topo da cadeia alimentar, que consomem regularmente presas com altos níveis de CH_3Hg^+ , apresentam níveis várias vezes maiores que os presentes em suas presas⁶.

O consumo de determinados tipos de peixe pelos seres humanos representa a fonte mais comum de exposição ao CH_3Hg^+ , o qual possui potencial para causar distúrbios neurológicos, como Alzheimer, demência, Parkinson até problemas de má formação de feto e

infertilidade⁵. Por essa razão, as agências norte americanas de Proteção Ambiental e de Administração de Alimentos e Medicamentos recomendam que mulheres gestantes ou em fase de amamentação e crianças, evitem o consumo de certos peixes^{1,5,7}.

A toxicidade do Hg aos seres humanos varia com a forma química, a dose e a frequência de exposição. O metilmercúrio no sangue e em outros tecidos, ao se ligar a grupos sulfidrilas (-SH), principalmente em cisteínas, é transportado pelos aminoácidos através da barreira sangue-cérebro onde acumula, devido a sua alta lipofilicidade. De forma similar, o CH_3Hg^+ é transferido para a placenta. No entanto, o Hg pode reagir com grupos selenol (-SeH) presentes em selenocisteínas (SeCys), pois estes apresentam maior afinidade pelo Hg do que os grupos -SH, provavelmente devido ao menor pKa da SeCys (~5,4) que confere uma maior reatividade do que a cisteína (pKa ~8,0)⁸. O selênio tem efeito protetor contra a toxicidade causada pelo Hg e inibe os danos oxidativos causados por esse, possivelmente devido à formação de um complexo inerte Se-Hg^{9,10}.

O selênio é um elemento-traço essencial, presente em selenoproteínas, principalmente como selenocisteína, que corresponde ao 21º aminoácido. Os seres humanos elaboram 25 selenoproteínas, entre elas, enzimas como a glutathione peroxidase, iodotironina deiodinase e tioredoxina redutase¹¹. A família das selenoproteínas, embora pequena, inclui proteínas-chaves que desempenham funções antioxidantes, na sinalização redox, no metabolismo do hormônio da tireoide e no enovelamento de proteínas¹². Enzimas Se-dependente desempenham importante função na proteção do organismo contra estresse oxidativo através da redução de lipoperóxidos e peróxido de hidrogênio. Alguns estudos indicam que o Se pode prevenir ou minimizar efeitos tóxicos de Ag, As, Cd, Hg e Pt².

Apesar da sua importância, o Se é um micronutriente cuja dose que confere toxicidade e deficiência é próxima. O consumo diário de Se necessário para compensar perdas mínimas varia entre 10 e 75 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para recém-nascidos e mulheres lactantes, respectivamente, enquanto que, para homens e mulheres adultos é recomendado 70 e 60 $\mu\text{g dia}^{-1}$, respectivamente. A sua deficiência é responsável por cardiomiopatias, distrofia muscular e desordens na reprodução, e ocorre principalmente em habitantes de regiões onde os solos são pobres em Se¹³. A ingestão diária acima do limite superior de 400 $\mu\text{g dia}^{-1}$ de Se pode levar a selenose, caracterizada pela perda de cabelo e unhas, distúrbios gastrointestinais e hormonais, erupções cutâneas, entre outros¹⁴.

As principais fontes de Se são alimentos ricos em proteínas, como carnes, frutos do mar, ovos, legumes, cereais e castanhas, enquanto que em frutas a concentração é baixa. A

concentração de Se em espécies vegetais depende da disponibilidade de Se no solo onde as plantas se desenvolvem¹⁵.

Embora ainda não exista consenso, interações antagonistas entre Se e Hg foram relatadas. Em um estudo realizado com populações ribeirinhas do rio Amazonas, os quais possuem elevadas concentrações de Hg (devido à dieta baseada no consumo de peixes contaminados com Hg) e também de Se (resultante do consumo de castanhas-do-pará, na qual a concentração de Se é alta) foi observado que um elevado consumo de Se é crítico para o desenvolvimento adequado das funções cerebrais e musculares e também para compensar efeitos deletérios do Hg¹⁶. Em outro estudo realizado com ratos expostos a Hg e Se, os autores confirmaram o papel das selenoproteínas no processo de destoxificação do Hg. O mecanismo protetor deve-se à capacidade do Se de alterar a distribuição do Hg em órgãos e fluidos biológicos e induzir a formação de complexos inertes Hg-Se-S. O grupo altamente reativo selenol nas selenoproteínas P, aumentam a possibilidade de ligação Se-Hg. Esses autores concluíram que a administração de Se representa um tratamento promissor contra a toxicidade do Hg¹⁷.

Em razão do potencial tóxico conferido pela ingestão de Hg aos seres vivos, e as funções essenciais apresentadas pelo Se (em uma estreita faixa de concentração), o conhecimento da concentração destes elementos em alimentos é de extrema importância. A concentração de Hg e Se pode ser determinada por técnicas espectrométricas, como a espectrometria de absorção atômica (AAS - *atomic absorption spectrometry*), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS - *inductively coupled plasma mass spectrometry*), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES - *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e espectrometria de fluorescência atômica (AFS - *atomic fluorescence spectrometry*).

2.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A espectrometria de absorção atômica baseia-se na medida da absorção da radiação incidente por átomos gasosos no estado fundamental, após subtração da absorção pelo fundo. É uma técnica analítica aplicada para se conhecer a concentração de um elemento em uma dada amostra.

Um átomo no estado fundamental, ao absorver a radiação de um comprimento de onda específico, é promovido para um estado de maior energia (estado excitado). A energia necessária para essa transição é relacionada ao comprimento de onda pela equação de Planck, segundo a qual, um átomo absorve somente radiação de comprimento de onda (λ) ou

frequência (ν) específica. Nesta, E é a energia necessária para que a transição eletrônica ocorra, h corresponde à constante de Planck e c é a velocidade da luz (Equação 1)^{18,19}.

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

Na AAS, a população de átomos no estado fundamental é mensurada. Para isso, são necessários átomos livres no estado fundamental, que são produzidos com o fornecimento de energia térmica pelos atomizadores chama e forno de grafite, ou através de colisões com radicais $H\cdot$ no atomizador de tubo de quartzo. A população relativa de átomos no estado fundamental (N_0) e no estado excitado (N_e), em função da temperatura, é fornecida pela Equação de Maxwell-Boltzmann (Equação 2). Nesta equação, g_e e g_0 são os pesos estatísticos para os estados excitado e fundamental, respectivamente; E_e e E_0 são as energias nos dois estados; k é a constante de Boltzmann; e T a temperatura absoluta^{18,19}.

$$\frac{N_e}{N_0} = \left(\frac{g_e}{g_0} \right) e^{\frac{-(E_e-E_0)}{kT}} \quad \text{Equação 2}$$

Nas condições usuais de temperatura (inferiores a 3000 °C) e comprimento de onda utilizadas na AAS, a fração de átomos no estado excitado é desprezível em relação à fração de átomos que permanece no estado fundamental, e portanto, aptos a absorverem energia^{18,19}.

Através da Lei de Lambert-Beer (Equação 3), é possível relacionar a absorvância (A) e o número de átomos livres (N), na qual $\Phi_0(\lambda)$ é a intensidade da radiação incidente emitida pela fonte de radiação; $\Phi_{tr}(\lambda)$ é a intensidade da radiação transmitida, ℓ é o comprimento do caminho óptico e $\kappa(\lambda)$ é o coeficiente de absorção atômica espectral^{18,19}.

$$A = \frac{\Phi_0(\lambda)}{\Phi_{tr}(\lambda)} = 0,43N\ell\kappa(\lambda) \quad \text{Equação 3}$$

Nos espectrômetros de absorção atômica convencionais ou com fonte de linha, são empregadas fontes de radiação que emitem um comprimento de onda específico de um ou alguns poucos elementos. A fonte de radiação comumente utilizada em AAS é a lâmpada de cátodo oco (HCL). Estas são constituídas por um cátodo, confeccionado com o elemento que se deseja determinar, e um ânodo, ambos inseridos em um cilindro de vidro contendo uma janela de quartzo por onde a radiação é transmitida. A lâmpada é preenchida com um gás inerte (Ne, Ar e He), mantida sob baixa pressão (1-2 kPa). Uma diferença de potencial é aplicada entre o cátodo e o ânodo, promovendo a ionização do gás de preenchimento. Os íons são atraídos e acelerados em direção ao cátodo (carregado negativamente) por forças eletrostáticas, que ao colidirem contra a superfície do cátodo, promovem a ejeção de átomos

gasosos do metal. Após colidirem com íons do gás inerte, estes átomos são excitados. Porém, como este estado é instável, ao retornarem ao estado fundamental, os átomos emitem fótons com comprimento de onda característico do elemento. Outra opção de fonte de radiação são as lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL). Estas apresentam alta intensidade radiante e largas de linhas mais estreitas do que as HCL, além de maior vida útil, o que as torna especialmente atraentes para aqueles analitos, como As e Se, que apresentam linha de ressonância em baixos comprimentos de onda. A radiação emitida é modulada por uma corrente alternada para ser distinguida de outras radiações, que é sintonizada com o amplificador^{18,19}. A radiação emitida é, então, conduzida pelo volume de absorção (caminho óptico). No atomizador, a radiação é absorvida pelos átomos gasosos no estado fundamental e por possíveis concomitantes (absorção de fundo), cuja atenuação, após correção do fundo, é proporcional à massa de analito na amostra. A absorção de fundo pode ser causada por moléculas gasosas ou pelo espalhamento da radiação sobre partículas. Os atomizadores chama, forno de grafite e tubo de quartzo, empregados em AAS, dão origem às técnicas espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), com forno de grafite (GF AAS) e com tubo de quartzo (QTA AAS)^{18,19}.

Nos sistemas utilizados para correção de fundo, é necessária a medida da absorção total (absorção atômica mais absorção do fundo) e da absorção de fundo, que são realizadas sequencialmente. A diferença entre as duas medidas corresponde à absorção atômica. Os principais sistemas de correção de fundo empregados em AAS com fonte de linha são: correção com fonte contínua (lâmpada de deutério) e a correção baseada no efeito Zeeman^{18,19}.

No monocromador, a linha analítica é isolada das demais linhas de emissão (p.ex. emitidas pela fonte de radiação e pelo atomizador). A dispersão da radiação é realizada principalmente, com o uso de redes de difração, nas quais a radiação é decomposta em discretos comprimentos de onda. Após a dispersão da radiação, o comprimento de onda de interesse é selecionado pela fenda de saída^{18,19}.

Finalmente, no detector ocorre a conversão da radiação luminosa em corrente elétrica. Para este fim, geralmente é empregado um tubo fotomultiplicador. A incidência da radiação na superfície de um cátodo fotossensível causa a emissão de elétrons. Estes elétrons são acelerados e atraídos contra a superfície de uma série de dinodos, devido à voltagem aplicada sobre estes. Ao colidirem contra a superfície do dinodo são emitidos entre 2 e 10 elétrons, e assim sucessivamente por 9 a 12 dinodos normalmente. Os elétrons gerados na

fotomultiplicadora são encaminhados para um sistema de amplificação, e assim a absorvância é registrada¹⁸.

2.2.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

Boris L'vov foi o primeiro a utilizar um forno eletricamente aquecido como atomizador. Durante a década de 1970, diferentes atomizadores foram investigados, mas foi o *design* desenvolvido por Massmann, uma adaptação do forno do L'vov, que contribuiu significativamente para a sua comercialização. Os fornos modernos são versões menores do modelo de Massmann, com tubos com comprimento 2,5-3,0 cm e diâmetro interno 4-7 mm, e com aquecimento a partir das extremidades pela passagem direta de corrente através do forno^{20,21}.

Em 1981, Slavin *et al* introduziram o conceito "forno com plataforma e temperatura estabilizada" (*stabilized temperature platform furnace*), que compreende um conjunto de medidas para garantir condições o mais próximas possíveis do forno isotérmico ideal de L'vov, que inclui: uso de tubo de grafite com plataforma de L'vov e recobrimento pirolítico, corretor de fundo, elevada taxa de aquecimento na etapa de atomização, interrupção do gás de purga durante a atomização, sinal de absorvância registrado em área, emprego de modificador químico e componentes eletrônicos de resposta rápida^{18,21}.

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite é cerca de três ordens de magnitude mais sensível do que a espectrometria de absorção atômica com chama. As características que conferem maior sensibilidade à GF AAS são: (i) perfil da linha de absorção mais estreito; (ii) maior tempo de residência no caminho óptico, décimos de segundo até vários segundos, enquanto na chama o analito reside menos de 10 milissegundos; (iii) alta eficiência de transporte da solução na GF AAS *versus* cerca de 5% na FAAS^{18,20}.

Na GF AAS, uma alíquota com volume entre 10 e 50 μL é introduzida na plataforma do tubo de grafite por um orifício no centro do tubo e submetida ao programa de temperatura, a fim de remover o máximo possível dos constituintes da amostra, sem que ocorra perda do analito antes da atomização. Uma vez que toda a alíquota introduzida no tubo é atomizada em um curto tempo, um sinal dependente do tempo é gerado, cuja área é proporcional à massa de analito presente na alíquota^{18,20}.

As etapas do programa de temperatura, geralmente utilizados, consistem em secagem, pirólise, atomização e limpeza.

Geralmente, uma ou duas etapas de secagem com temperaturas variando entre 10 °C abaixo e 20 °C acima da temperatura de ebulição do solvente são suficientes para garantir a

dessolvatação da amostra. A ebulição e a projeção de gotículas da solução devem ser evitadas durante esta etapa para garantir repetibilidade entre as medidas¹⁸.

A etapa de pirólise tem como objetivo eliminar o máximo dos componentes orgânicos e inorgânicos da matriz, resíduo de água e ácido, sem que ocorra perda do analito.

Para se conhecer as condições ótimas de temperatura de pirólise (T_{pir}) e atomização (T_{at}), etapa em que ocorre a formação do vapor atômico, são estabelecidas curvas de temperatura *versus* absorvância integrada. Para a construção da curva de temperatura de pirólise, uma temperatura de atomização alta o suficiente para produzir átomos livres no estado fundamental, escolhida de um procedimento padrão, é fixada enquanto a temperatura de pirólise é variada. A temperatura de pirólise escolhida deve ser alta o suficiente para remover o máximo possível de concomitantes antes da atomização, sem que ocorra perda do analito. Na presença de matrizes complexas, são necessárias rampas de aquecimento lentas e longos tempos de permanência. Logo, a temperatura utilizada nesta etapa depende da matriz e do analito. A curva de temperatura de atomização é construída de forma semelhante à curva de pirólise: a temperatura de pirólise selecionada é fixada, enquanto a temperatura de atomização é variada e a absorvância integrada registrada em cada temperatura. A temperatura de atomização escolhida é aquela que fornecer o maior sinal analítico, ou no caso de um patamar, a menor temperatura em que o sinal é máximo, em um menor tempo de integração possível^{18,20} e que forneça um perfil do pico simétrico.

Na etapa de atomização, a atenuação da radiação, no interior do tubo de grafite, pelo vapor atômico produzido é proporcional ao número de átomos do analito. Durante esta etapa, o gás de purga é interrompido para maximizar o tempo de residência do analito no caminho óptico e garantir a máxima temperatura da fase gasosa^{18,20}.

Na etapa de limpeza é aplicada uma temperatura (maior que a temperatura de atomização) por um curto período de tempo para a remoção de resíduos da matriz e reduzir possíveis efeitos de memória¹⁸.

Para tornar as propriedades físicas e químicas do analito nas soluções padrão e amostra o mais semelhante possível são empregados modificadores químicos. Estes podem atuar como modificadores de matriz quando auxiliam na volatilização da matriz. Entretanto, o emprego mais comum é na estabilização do analito através da formação de um composto ou fase do analito mais estável, o que permite utilizar temperaturas mais altas durante a pirólise para a remoção dos constituintes indesejados da matriz, sem perda do analito. A mistura de Pd e Mg na forma de nitrato, utilizada para estabilizar um grande número de elementos, é conhecida como modificador universal^{18,20}.

Alternativamente, os modificadores químicos podem ser empregados como um recobrimento da plataforma do tubo de grafite pelo depósito de uma massa (0,1-1 mg) de modificador, que é então submetida a um tratamento térmico. Os modificadores permanentes como são designados, apresentam como vantagens: (i) simplicidade e redução do tempo de análise, pois dispensam a introdução de uma nova alíquota de modificador antes de cada medida; (ii) maior tempo de vida do tubo de grafite, pois o recobrimento protege contra ação de ácidos; (iii) menores valores de branco devido à eliminação de impurezas durante o tratamento térmico na etapa do recobrimento¹⁸⁻²².

O uso de modificadores permanentes confere grande vantagem à análise direta de sólidos e na coleta de vapor gerado, por exemplo, pelas técnicas de geração de hidreto (HG - *hydride generation*) e vapor frio (CV - *cold vapor*)¹⁸. Além das vantagens descritas anteriormente, quando empregados para coletar espécies voláteis geradas por técnicas de geração de vapor, é esperado um longo tempo de duração do recobrimento, devido à ausência de matriz²².

Metais normalmente empregados como modificadores permanentes incluem: metais nobres de alto ponto de ebulição (Ir, Pt, Rh e Ru) e de média volatilidade (Au, Ag e Pd) e elementos formadores de carbetos (W, Ta, Zr, V e Ti), sozinhos ou em misturas^{20,22}.

O irídio como modificador permanente é efetivo em sequestrar hidretos, e em razão de seu alto ponto de fusão (2410 °C), dependendo da temperatura de atomização, a durabilidade do recobrimento é grande (cerca de 520 queimas)^{22,30}. A eficiência do Ir em estabilizar o analito, assim como outros modificadores do grupo da platina que são reduzidos à forma elementar pelo condicionamento térmico, é atribuída à formação de solução sólida e/ou compostos entre o modificador e o analito, que é capturado no interior do modificador elementar²³.

2.3 GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A determinação de elementos-traço é comumente realizada com o emprego de técnicas espectrométricas, como a FAAS, GF AAS, ICP-MS e ICP OES. Embora algumas configurações permitam a análise direta de sólidos, geralmente, as técnicas citadas requerem que as amostras sejam convertidas para a fase líquida previamente à introdução no equipamento. Entretanto, com exceção da GF AAS a introdução destas soluções através da nebulização pneumática resulta em uma baixa eficiência de transporte (1-5%) e baixa sensibilidade. Alternativamente, o analito pode ser introduzido na forma de vapor, através da

sua conversão à uma espécie volátil pelas técnicas de geração química de vapor (CVG - *chemical vapor generation*)²⁴, geração eletroquímica²⁵ e geração fotoquímica de vapor (PVG - *photochemical vapor generation*)²⁶, entre outras. A conversão do analito em uma espécie volátil apresenta algumas vantagens, como (i) separação do analito da matriz, e com isso redução de possíveis interferentes; (ii) alta eficiência de transporte (próxima de 100%) do vapor do analito até o atomizador/cela de absorção; (iii) melhores limites de detecção e quantificação relativos, pois possibilita a utilização de um volume maior de solução; (iv) possibilita a análise de especiação devido aos diferentes comportamentos das espécies em função dos seus estados de oxidação; (v) pode ser acoplada a diferentes técnicas espectrométricas (AAS, AFS, ICP OES, ICP-MS); e (vi) condições mais brandas de atomização²⁷.

A CVG é uma técnica analítica na qual os analitos são vaporizados, na forma de átomos ou moléculas, através de uma reação química à temperatura ambiente e, posteriormente, transportados para o atomizador ou cela de absorção. Por meio da técnica de geração de hidretos, os elementos As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn, Te e Tl são convertidos a hidretos voláteis. Os elementos Hg e Cd são convertidos a vapor atômico pela técnica de vapor frio e Fe e Ni por geração de carbonil²⁴. Adicionalmente, diversos metais de transição e metais nobres foram convertidos a uma forma volátil pela CVG²⁸. Os sistemas empregados para a CVG são classificados em batelada ou sistemas em fluxo.

No sistema em batelada, o gerador é um frasco, geralmente cônico, de vidro ou plástico, que serve como reator e separador gás-líquido (GLS *gas-liquid separator*). A solução redutora (p.ex. NaBH₄), e um gás inerte são introduzidos no frasco onde se encontra a amostra em meio ácido. O vapor do analito liberado é carregado pelo fluxo de gás inerte junto com o hidrogênio liberado, formado pela decomposição do agente redutor, para o atomizador ou cela de absorção. Antes de cada medida, a solução residual é descartada e uma nova amostra é inserida no frasco reacional. Um sinal dependente do tempo é gerado, cujo perfil é determinado pela cinética de liberação do analito gasoso da solução e proporcional à massa de analito^{29,30}.

Durante a reação, quando NaBH₄ é utilizado como agente redutor, ocorrem mudanças no pH e no volume de hidrogênio liberado. Esta mudança provocada no fluxo de gás carreador torna a integração da área do sinal imprecisa. Por isso, na determinação *on line* com sistema em batelada, a medida da altura do pico é mais indicada. Com sistemas em batelada, é possível obter alta sensibilidade relativa (sensibilidade do método), pois permite a introdução de um grande volume de solução. Porém, apresenta como desvantagens a baixa sensibilidade

absoluta (sensibilidade instrumental), devido ao grande volume morto e à baixa frequência analítica^{18,30}.

Nos sistemas em fluxo, a amostra é introduzida continuamente (sistema de fluxo contínuo) ou um volume discreto de amostra é injetado (sistema de injeção em fluxo).

No sistema de injeção em fluxo (FI - *flow injection*), a solução carreadora e os reagentes são continuamente bombeados através de capilares para o sistema, enquanto um volume discreto e conhecido de amostra é introduzido no fluxo carreador (por exemplo, com auxílio de uma válvula de injeção). Após a reação, os produtos são encaminhados para o GLS, onde os analitos gasosos são separados da fase líquida e carreados para o atomizador ou cela de absorção. Um sinal transiente é gerado cuja forma, com as técnicas de atomização *on line*, depende da dispersão da solução da amostra na solução carreadora. A introdução da amostra, neste sistema, pode ser baseada no volume (neste caso, um volume definido de amostra é introduzido por um septo ou válvula) ou baseada no tempo (o volume de amostra injetado é controlado pelo tempo que é permitida a sua entrada no fluxo)³¹.

No sistema com fluxo contínuo (CF - *continuous flow*), um fluxo constante de amostra e de agente redutor (NaBH_4) e o gás de purga são transportados pelos capilares e misturados continuamente. Após passarem por uma zona de reação, as espécies voláteis geradas são separadas da fase condensada no GLS, e carreadas para o atomizador ou cela absorção. Um sinal independente do tempo é gerado, cuja absorvância é proporcional a concentração de analito em solução²⁹.

Ao contrário do sistema CF, no sistema FI não é necessário esperar o equilíbrio termodinâmico ser atingido antes da medida. Por isso, o consumo de amostra é menor e a frequência analítica maior. A repetibilidade do sistema FI é alta, resultando em alta precisão³⁰. Em relação ao sistema em batelada, o sistema FI apresenta sensibilidade absoluta de 1-2 ordens de magnitude melhor e sensibilidade relativa semelhante, menor consumo de amostra e de reagentes, maior frequência analítica e é passível de automação³⁰.

Os principais métodos de atomização empregados com as técnicas de geração de vapor acopladas à AAS são *on line*, cujo principal atomizador é o tubo de quartzo (QTA - *quartz tube atomizer*), ou coleta *in-situ* com atomização em forno de grafite³².

Na atomização *on line*, o hidreto gerado é imediatamente introduzido no volume de observação do espectrômetro e atomizado. Em um QTA, a atomização do hidreto ocorre devido às colisões com radicais H^\bullet extremamente energéticos, formados através de reações de hidrogênio com oxigênio³². O QTA com aquecimento externo (chama ou elétrico) ou do tipo *flame-in-tube* apresenta a vantagem do longo tempo de residência dos átomos livres no

caminho óptico e baixo ruído intrínseco do atomizador, características que conferem alta sensibilidade e baixo LD. As desvantagens apresentadas pelo QTA são a baixa resistência aos interferentes voláteis na atomização (como outros elementos formadores de hidretos voláteis) e linearidade limitada, devido à reação dos átomos livres do analito com outras espécies ao se distanciarem da nuvem de radicais $H\cdot$ que preenchem somente uma pequena porção ao longo do atomizador³².

A pré-concentração de hidretos *in situ* em um forno de grafite, em que este atua como meio de pré-concentração e como atomizador, apresenta limites de detecção relativos de uma ordem de magnitude melhores do que aqueles por análise de líquido em GF AAS para vários elementos formadores de hidretos. Os hidretos voláteis liberados da solução são carreados pelo fluxo de um gás inerte e introduzidos no tubo de grafite por um capilar de quartzo ou titânio, onde são coletados na superfície da plataforma do tubo de grafite pré-aquecida (designada como temperatura de coleta, T_{col} , no presente trabalho) contendo um modificador químico, geralmente permanente. Após a fase de geração e coleta, o analito é atomizado através do programa de temperatura convencional do forno de grafite (temperatura > 2000 °C). Esta abordagem proporciona: (i) uma maior sensibilidade relativa, como resultado da pré-concentração do analito; (ii) pode ser otimizada para cada elemento; (iii) coleta *in-atomizer* elimina o efeito de cinética de geração apresentada por alguns analitos e (iv) é menos propícia a interferências^{32,33}. Dependendo da concentração dos contaminantes resultantes do preparo da amostra e do processo de HG, a elevada sensibilidade relativa e baixo ruído do atomizador podem levar a baixos LD³².

Na técnica de vapor frio, o QTA, empregado como atomizador na HG, pode atuar como cela de absorção para a determinação de Hg, sem aquecimento da cela, uma vez que o Hg, após a redução, encontra-se na forma atômica. A determinação seletiva de Hg inorgânico e orgânico pode ser realizada após tratamento das amostras com TMAH ou HCl^{34,35}. Na ausência de aquecimento da cela, a concentração de Hg inorgânico é determinada, enquanto que, sob aquecimento há decomposição do Hg orgânico, resultando na determinação do Hg total. A concentração de CH_3Hg^+ é conhecida pela diferença de concentração entre o Hg total e o Hg^{2+} . O vapor de Hg também pode ser pré-concentrado em um tubo de grafite em temperatura ambiente ou aquecido, recoberto com um modificador químico, como Au ou Pd, e posteriormente atomizado¹⁸.

2.3.1 GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

Devido às vantagens citadas acima, a técnica de CVG acoplada à GF AAS tem sido utilizada desde 1980 para uma grande variedade de amostras³³. Segue abaixo a descrição de algumas aplicações reportadas na literatura com uso destas técnicas.

Flores *et al.*³⁶ investigaram Au, Ir e Rh como modificadores permanentes na determinação de Hg em carvão por CV-GF AAS. Inicialmente, foi utilizado um sistema CF, mas devido ao depósito da suspensão da amostra nas paredes dos capilares do sistema CF, um sistema em batelada foi adotado. A melhor resposta em termos de sensibilidade e LD foi fornecida pelo modificador em ordem decrescente Au > Rh > Ir. Apesar do Au ter fornecido melhor LD, o Rh foi escolhido devido ao maior número de ciclo de atomizações antes de um novo recobrimento ser necessário (150 *versus* 70 com Au) e ao LD adequado para as amostras.

A técnica de vapor frio foi empregada por Torres *et al.*³⁷ para gerar vapor de Hg em amostras de gasolina seguida da determinação por GF AAS. O vapor de Hg gerado foi pré-concentrado em uma coluna de Au e posteriormente coletado no forno de grafite recoberto com 600 µg Au. O limite de detecção relativo obtido foi de 0,08 µg L⁻¹ de Hg.

A determinação direta de Se por GF AAS em urina, soro sanguíneo e cabelo solubilizado, empregando Rh como modificador, foi comparada com dois sistemas de HG. Um sistema de injeção em fluxo foi utilizado na HG de Se com coleta no forno de grafite (HG-GF AAS), empregando uma mistura de Ir-Zr como modificador permanente, e um segundo sistema de HG com fluxo contínuo acoplado à espectrometria de fluorescência atômica não-dispersiva (HG-ND AFS). As duas técnicas baseadas na HG resultaram em melhores limites de detecção (0,6 µg L⁻¹ e 0,25 µg L⁻¹ com HG-GF AAS e HG-ND AFS, respectivamente) quando comparados com GF AAS (6 µg L⁻¹). No entanto, o tempo requerido para o preparo da amostra e pré-redução do Se (IV) diminuíram a frequência analítica³⁸.

Schneider *et al.*³⁹ empregaram HG-GF AAS para a determinação de Se (IV) em amostras de solo após extração alcalina. O hidreto gerado foi pré-concentrado na superfície da plataforma do tubo de grafite recoberto com 200 µg Ir, sob uma temperatura de 300°C, e atomizado em 2000 °C. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram 6 µg L⁻¹ e 20 µg L⁻¹ de Se, respectivamente.

Tyson *et al.*⁴⁰ desenvolveram um método para determinação de Se em urina por HG-GF AAS com injeção em fluxo e coleta do SeH₂ em um tubo de grafite recoberto com 120 µg

de Ir. O limite de detecção do método obtido foi $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Os autores observaram que os principais fatores que influenciaram o limite de detecção foram a pureza dos reagentes, que resultavam em elevados sinais analíticos de branco e desvios padrão, e o volume injetado. A eficiência da HG foi estimada em 75% em comparação com GF AAS.

A eficiência das técnicas de geração de vapor - a qual consiste na conversão do analito a uma espécie volátil, sua liberação da fase condensada para a fase vapor e o transporte das espécies voláteis para um sistema de atomização ou fonte de excitação/ionização - foi avaliada em um estudo utilizando radiotraçadores de Se, As e Sb. Os hidretos gerados foram coletados *in-situ* em um tubo de grafite com Pd como modificador químico. As eficiências obtidas foram $78,1 \pm 1,5\%$, $94 \pm 4\%$ e próximo de 100% para os hidretos Se, As e Sb, respectivamente⁴¹.

2.4 GERAÇÃO FOTOQUÍMICA DE VAPOR

A radiação UV tem sido aplicada em diversos estudos como uma etapa prévia a CVG. Bendicho *et al.*⁴² descreveram alguns exemplos em que, após a separação em uma coluna cromatográfica, as espécies dos analitos, como, As, Hg, Se, Sb, foram foto-oxidadas, e se seguiu a conversão do analito a uma espécie volátil por técnicas de geração de vapor que foram detectadas por espectrometria atômica. Exemplos de foto-redução, como redução do Se (VI) para Se (IV), com o objetivo de tornar as espécies do analito compatíveis com a CVG, também foram demonstrados pelos autores⁴².

Guo *et al.*²⁶ foram os primeiros pesquisadores a propor uma técnica de geração de vapor baseada no emprego da radiação UV para a conversão do analito em espécies voláteis. A geração fotoquímica de vapor baseia-se na formação de compostos voláteis do analito através da interação da radiação UV, proveniente de um reator fotoquímico, com um composto orgânico de baixo peso molecular (ácidos carboxílicos, álcoois e aldeídos) adicionado à solução da amostra. Em seguida, os compostos voláteis obtidos são separados da solução residual e transportados para o sistema de detecção.

As mesmas técnicas de detecção empregadas na CVG (AAS, AFS, ICP OES e ICP-MS) podem ser utilizadas para a quantificação dos analitos gerados através da PVG²⁷. Na Figura 1 é representado um esquema do sistema de PVG acoplado à um espectrômetro de absorção atômica.

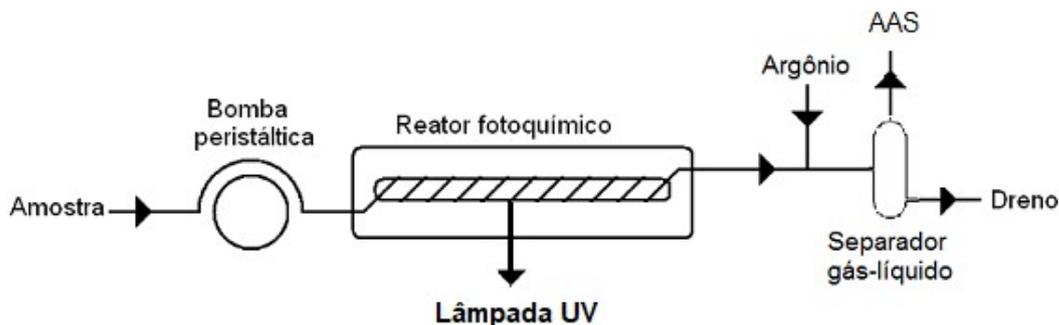


Figura 1. Representação do sistema para geração fotoquímica de vapor com UV. Adaptado de Viera *et al.*⁴³

A PVG é uma técnica alternativa à CVG, cujas principais vantagens apresentadas são:

(1) Não utiliza reagente(s) caro(s) e instável(is) em solução, como NaBH_4 , cuja solução deve ser preparada diariamente, além de representar uma possível fonte de contaminação. Na PVG somente reagentes simples e de baixo custo, geralmente um composto orgânico de baixo peso molecular (LMWC - *low molecular weight organic compound*), é utilizado^{26,44};

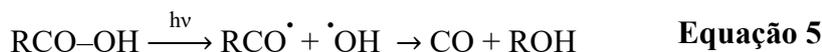
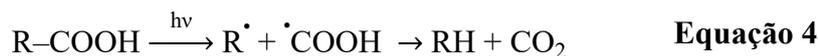
(2) É menos sujeita à interferência dos metais de transição (p.ex. Co (II), Cu (II) e Ni (II)), uma vez que os radicais produzidos nos processos fotoquímicos não são capazes de reduzir os interferentes para o estado metálico e formas coloidais, diferentemente do NaBH_4 empregado na CVG⁴⁵;

(3) Minimiza a geração de resíduos, uma vez que os LMWC são parcialmente degradados sob a irradiação UV. A exclusão do NaBH_4 e HCl , necessários na CVG, diminui a produção de resíduos químicos⁴⁶;

Como desvantagem apresentada pela PVG, pode ser citada a interferência causada pela presença de espécies oxidantes que possuem a tendência de extinguir as reações mediadas por radicais (*quench*)⁴⁷.

Embora ainda não exista consenso sobre o princípio da PVG, alguns mecanismos foram propostos, baseados tanto em reações via radicais quanto na ausência destes^{27,47,48}.

Dentre as espécies intermediárias formadas após a interação do composto orgânico de baixo peso molecular com a radiação UV, podem ser citados: H^\bullet , COOH^\bullet , R^\bullet e CH_3^\bullet . Estes radicais podem reduzir uma série de íons (p.ex. Hg (II) e Se (IV)), levando à formação de compostos voláteis (espécies elementares, hidrogenadas, alquiladas ou produtos carbonilados). As Equações 4 e 5 mostram um conjunto de reações propostas para a formação fotoquímica dos radicais a partir de um ácido carboxílico como LMWC, em um meio anaeróbico, no qual $\text{R}=\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ e $n=0,1,2$ ²⁶.



Na presença de Se (IV), as espécies radicalares formadas podem reduzir o Se a espécies voláteis²⁶, como apresentado nas Equações 6 e 7.



Quando ácido fórmico é utilizado como LMWC para a geração de vapor de Se, a Equação 4 ocorre com 6 vezes mais frequência do que a Equação 5. Neste caso, os radicais hidrogênio e carboxil, em teoria, podem reduzir o Se (IV) a SeH₂ e SeCO, respectivamente, conforme identificado por GC/MS²⁶.

A Equação 5 torna-se menos favorável com o aumento da cadeia (R). Por exemplo, na presença de ácido acético e propiônico, são produzidos Se(CH₃)₂ e Se(CH₃CH₂)₂, respectivamente, enquanto que com ácido malônico é formado o Se(CH₃)₂, devido à decomposição primeiramente a ácido acético^{26,27,47}. A formação destes compostos concorda com um mecanismo via radicais⁴⁷.

Por outro lado, Takatani *et al.*⁴⁸ sugeriram que a clivagem fotolítica de ácidos orgânicos seguida da foto-redução do Se(IV) não deve ser a rota principal para a PVG. Utilizando um método computacional, os autores propuseram um mecanismo alternativo para a geração fotoquímica de vapor do Se sem participação de radicais livres. Um mecanismo energeticamente favorável baseado na formação de CO e ceteno (CH₂CO) como produto da fotodissociação do ácido fórmico e ácido acético, respectivamente, ao invés de radicais livres, é responsável pela redução do Se sob irradiação UV. Segundo Sturgeon e Grinberg⁴⁷, é improvável que o CH₂CO, um intermediário transiente gerado a 750 °C e extremamente reativo à umidade, exista em meio aquoso por tempo suficiente para participar de uma série de reações intermediárias de redução do Se, que se encontra presente em concentrações de partes por bilhão em relação à água.

Para que se obtenha uma alta eficiência de conversão do analito em espécies voláteis, deve-se levar em consideração o LMWC a ser adicionado à amostra e que será introduzido no reator fotoquímico (álcool, aldeído ou ácido carboxílico), assim como sua concentração e vazão²⁷. Através do controle da vazão, pode-se ter informação do tempo de exposição da

amostra à radiação UV. Outro aspecto importante se refere ao *design* do reator e ao formato do percurso analítico, se interno ou ao redor da lâmpada UV, e ainda o tipo de material do qual é constituído. A utilização de quartzo como material apresenta a vantagem de permitir uma total transmissão da radiação proveniente da lâmpada, enquanto o politetrafluoretileno (PTFE) apresenta uma transmissão parcial (5%). Entretanto, Guo *et al.*²⁶ reportaram que mesmo um percentual de 5% de radiação incidente sobre a amostra é suficiente para a formação de compostos voláteis dos analitos. Igualmente importantes são os aspectos relacionados ao tipo de fonte UV e sua intensidade.

Segundo Qin *et al.*⁴⁹ as várias contradições em relação à eficiência da PVG podem ser resultado das diferenças entre os reatores empregados. Ao avaliarem sete possíveis configurações de reator, os autores concluíram que o percurso analítico de quartzo sintetizado, de elevada transparência em 185 nm, e sinterizado no interior do reator proporcionou maior eficiência na PVG do Hg em comparação aos demais.

2.4.1 APLICAÇÕES ANALÍTICAS DA GERAÇÃO FOTOQUÍMICA DE VAPOR

Desde 2003, quando Guo *et al.*²⁶ demonstraram a eficácia da PVG como uma técnica de geração de vapor, uma série de elementos, tais como os elementos formadores de hidretos (As, Bi, Sb, Se, Sn, Pb, Cd, Te), Hg, metais de transição (Ni, Co, Cu, Fe), metais nobres (Ag, Au, Rh, Pd, Pt), e não-metais (I, S e Br) foram convertidos em espécies voláteis através desta técnica^{27,50}.

Em uma revisão publicada por Yin *et al.*²⁷, em 2011, foram abordados alguns aspectos relacionados à PVG, como o histórico da técnica, avanços na instrumentação, aplicações da PVG em espectrometria atômica e os possíveis mecanismos envolvidos. Os autores relatam que a conversão do Hg^{2+} em vapor atômico Hg^0 pela PVG é promovida por ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido oxálico e ácido malônico), aldeídos (formaldeído, acetaldeído), álcoois (metanol, etanol, propanol, glicol e glicerol) e mercaptoetanol. Por exemplo, a determinação direta de Hg em vinhos e licores foi possível devido ao próprio etanol presente nas amostras promover a redução do Hg^{2+} em Hg^0 e, dessa forma, a adição de reagentes não foi necessária⁵¹. Jesus *et al.*⁵² propuseram um método de geração fotoquímica de vapor aplicado para a determinação de Hg em derivados de petróleo, no qual foi possível a formação de compostos voláteis de Hg diretamente a partir de microemulsões. A utilização de microemulsões, como o preparo da amostra, foi útil, uma vez que o propanol utilizado no preparo das mesmas atuou também como LMWC.

A fim de melhorar a eficiência da PVG em batelada, López-Rouco *et al.*⁵³ desenvolveram um sistema em que a radiação UV era aplicada em conjunto com radiação ultrassônica. Este sistema resultou em um procedimento rápido de redução do Hg iônico pela PVG, seguida da liberação do Hg⁰ para a fase gasosa pela ação das cavitações produzidas pelo ultrassom na solução. As amostras de tecido biológico foram solubilizadas com emprego de ultrassom e ácido fórmico, que também atuou como LMWC.

Lisboa *et al.*⁵⁴ compararam a geração de vapor do Hg, a partir de amostras de glicerina, empregando as técnicas de PVG e CV, esta última com os reagentes redutores NaBH₄ ou SnCl₂. Os limites de detecção obtidos foram 0,12; 0,11 e 0,04 µg L⁻¹ para PVG, CV com NaBH₄ e CV com SnCl₂, respectivamente. Os autores concluíram que é possível a PVG do Hg em amostras de glicerina com sensibilidade similar àquelas obtidas com a CV.

A possibilidade de empregar a PVG na especiação de Hg, com base nos diferentes comportamentos das espécies do analito frente à radiação, foi explorada por Zheng *et al.*⁵⁵. Ao submeterem amostras de água diluídas em ácido fórmico à radiação visível, Hg⁰ foi gerado a partir de Hg²⁺, e sob radiação UV, ambos, Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ foram reduzidos a vapor de Hg, o que permitiu conhecer a concentração total de Hg e por diferença a concentração de CH₃Hg⁺. Com um princípio semelhante, Chen *et al.*⁵⁶ desenvolveram um método para especiação de Hg em amostras de óleo de peixe. A exposição sequencial à radiação UV em 311 nm e em 254 nm forneceu as concentrações de Hg²⁺ e Hg total, CH₃Hg⁺ mais Hg²⁺, respectivamente.

A PVG foi aplicada na quantificação de Hg em diferentes tipos de amostras, como tecido biológico^{43,57}, cosmético⁵⁸, água⁴⁹, água de produção de petróleo⁵⁹, gasolina⁶⁰, etanol biocombustível⁶¹ e vacina^{62,63}.

Além do Hg inorgânico, metilmercúrio (CH₃Hg⁺) e timerosal (complexo etilmercúrio-tiosalicilato) também são convertidos a Hg⁰ pela PVG na presença de ácido fórmico, ácido acético, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH - *tetramethylammonium hydroxide*) e mercaptoetanol, dispensando assim a necessidade de converter o mercúrio orgânico em Hg²⁺²⁷.

Um método simples e que atende aos preceitos da Química Verde foi desenvolvido por Santos *et al.*⁶² para a determinação de timerosal em vacinas por PVG-ICP OES. Ácido fórmico foi o único reagente utilizado, tanto na diluição das amostras como LMWC. Com este procedimento, a eficiência da geração de vapor de Hg a partir do timerosal ou do Hg²⁺ foram equivalentes, possibilitando a calibração contra solução padrão de Hg inorgânico. O limite de detecção relativo obtido foi 0,3 ng mL⁻¹ Hg²⁺ ou 0,6 ng mL⁻¹ de timerosal.

A PVG também tem sido aplicada na geração de espécies voláteis de Se. Com PVG-QTA AAS para determinação de Se García *et al.*⁴⁶ observaram que o ácido fórmico, único reagente utilizado, desempenhou duas funções. Primeiramente, promoveu a PVG do Se e, em seguida, atuou como precursor para a formação de H₂ o que facilitou a atomização do Se na cela de quartzo aquecida.

A especiação de Se (IV) e Se (VI) por PVG em amostras de sal de cozinha e de água foi conduzida por Zheng *et al.*⁴⁵. Em baixas temperaturas, quando o sistema de refrigeração do reator estava ligado, somente Se (IV) era convertido em uma espécie volátil. Os autores observaram que na presença dos ácidos fórmico, acético, propiônico e malônico, em baixa temperatura e na ausência de nano-TiO₂, apenas 0-2% Se (VI) era convertido a uma espécie volátil, enquanto que, em um banho a 100 °C e com nano-TiO₂ no interior do percurso analítico, Se (IV) e Se (VI) foram convertidos à uma espécie volátil e Se total pôde ser determinado.

Outras aplicações da PVG do Se incluem água do mar, tecido biológico, água de poço, água de rio²⁷ e suplemento alimentar^{64,65}.

2.5 PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE Hg E Se POR TÉCNICAS DE GERAÇÃO DE VAPOR

Na HG, os elementos formadores de hidreto pertencentes ao Grupo VA (As e Sb) da tabela periódica necessitam ser pré-reduzidos para o estado de oxidação As (III), Sb (III), pois dependendo do sistema de geração e das condições utilizadas, pode haver diferenças de sensibilidade em função da espécie. Por exemplo, em sistemas em batelada, o As (V) gera AsH₃ mais lentamente do que o As (III), o que afeta mais a altura do pico do que a área (cinética reacional). Em sistemas de injeção em fluxo, a formação da AsH₃ a partir do As (V) é uma ordem de magnitude menos sensível em comparação ao As (III) (discriminação cinética). No caso do Sb, essa diferença é ainda maior³⁰. A pré-redução do As e Sb pode ser realizada com a adição de iodeto de potássio ou L- cisteína^{24,30}.

Por outro lado, para a determinação total dos elementos Se e Te a redução é obrigatória a Se (IV) e Te (IV), pois o Se (VI) e Te (VI) não geram hidreto. O número de oxigênios ligados ao analito influencia na acessibilidade ao átomo central para a formação do hidreto^{24,66}. Geralmente, a pré-redução do Se (VI) para Se (IV) é realizada após a etapa de decomposição da amostra e envolve o aquecimento da amostra de 15 a 30 min em HCl (0,2-10 mol L⁻¹)²⁴.

Shaltout *et al.*⁶⁷ observaram que além da pré-redução do Se (VI) com HCl sob aquecimento, após a decomposição da amostra em meio oxidante, é importante evitar a reoxidação do Se (IV) para Se (VI) devido ao gás cloro. Os autores evitaram a reoxidação do Se (IV) purgando as soluções com Ar durante a etapa de pré-redução. Após a adoção deste procedimento, as soluções mantiveram-se estáveis durante aproximadamente oito dias. Além disso, o emprego de menor tempo de redução (10 min) e o uso de solução de HCl menos concentrada foram possíveis purgando as soluções com Ar.

Para determinação de As, Sb e Se total em sucos de frutas por HG-ICP OES, Welna e Szymczycha-Madeja⁶⁸ investigaram cinco preparos de amostra, os quais consistiram em: (1) digestão via úmida com HNO₃/H₂O₂; (2) diluição da amostra (1:1) com HNO₃ 2% (v/v) e centrifugação; (3) idem ao 2, substituindo centrifugação por filtração; (4) análise direta da amostra após centrifugação e (5) solubilização em água-régia. Enquanto que para As e Sb, os cinco procedimentos renderam recuperações satisfatórias, para o Se apenas dois deles (digestão via úmida e solubilização com água-régia) resultaram em boas recuperações. Quando foram utilizadas condições de preparo de amostra mais brandas (2, 3 e 4), as recuperações foram nulas. Segundo os autores, as espécies voláteis de Se podem ter sido retidas nas partículas sólidas formadas na etapa de pré-redução com HCl antes da HG ser aplicada.

Bohrer *et al.*⁶⁹, após empregarem a mistura HNO₃/HClO₄ na decomposição de amostras de carne de frango, seguida da extração da gordura, investigaram quatro procedimentos de pré-redução. Recuperações satisfatórias foram obtidas com dois procedimentos, após exposição à radiação UV por 4 h, e um segundo, no qual a adição de ácido sulfâmico para a eliminação dos óxidos de nitrogênio foi seguida da redução do Se com NaBr. Este último procedimento foi adotado para a determinação de Se por HG AAS.

Além da fotorredução, a radiação UV também pode ser aplicada na foto-oxidação dos componentes orgânicos de diversas matrizes. As vantagens proporcionadas por esta técnica, como o menor consumo de reagentes, comparado com a digestão por via úmida convencional, condições de pressão e temperatura ambiente, estão de acordo com os preceitos da Química Verde. O preparo de amostra com emprego da radiação UV em conjunto com um reagente oxidante (O₃/reagente Fenton/HNO₃/H₂O₂/K₂S₂O₈) baseia-se na formação de radicais (p.ex. OH[•] e SO₄^{•-}) que promovem a oxidação dos componentes orgânicos⁴².

O preparo de amostra para determinação de Se por HG requer condições oxidantes drásticas para a completa conversão dos compostos orgânicos de Se em Se inorgânico. Lavilla *et al.*⁷⁰ submeteram amostras de peixe e mariscos à decomposição assistida por micro-ondas

com HNO₃ e H₂O₂, seguida de etapa de pré-redução a 90 °C e adição de HCl 6 mol L⁻¹. Os autores obtiveram melhor recuperação quando as amostras foram aquecidas até próximo a secura, antes da etapa de pré-redução, pois com este procedimento foi eliminada a interferência causada pelos subprodutos do HNO₃, como os NO_x. Entretanto, para mariscos contendo selenometionina, a recuperação somente foi satisfatória quando uma etapa de exposição à radiação UV foi utilizada, que foi útil tanto para a decomposição completa dos compostos orgânicos de Se como para a redução do Se (VI) para Se (IV).

Um dos grandes desafios da PVG é lidar com oxidantes aniônicos como NO₃⁻, NO₂⁻, incluindo Cl⁻, que normalmente são empregados na digestão/solubilização das amostras, mas que são responsáveis por produzirem interferência durante a PVG. Hou *et al.*⁷¹ reportaram um decréscimo significativo do sinal do Hg na presença de 20 mmol L⁻¹ de HCl na solução final. Completa supressão da PVG do Hg²⁺ foi observada por Sturgeon e Grinberg⁴⁷ em uma solução com 0,05 mol L⁻¹ de NO₃⁻. No caso do Se, Zheng *et al.*⁴⁵ observaram um aumento da eficiência da PVG em uma estreita faixa de concentração de HNO₃: uma resposta máxima foi obtida com 10 mmol L⁻¹ HNO₃ com 10% (v/v) de ácido fórmico, enquanto que com outros LMWC esse comportamento não foi observado. Campanella *et al.*⁷² reportaram forte inibição da PVG do Se na presença de HNO₃, efeito atribuído mais ao ânion NO₃⁻ do que ao pH.

Diversas abordagens foram propostas por Lopes *et al.*⁷³ para contornar a interferência causada pelas espécies NO₃⁻/NO₂⁻ à PVG do Se. Dentre essas, foram eficientes em remover os interferentes: (i) a redução fotoquímica do NO₃⁻ na presença de um tampão (EDTA-tiosulfato de sódio), (ii) redução NO₃⁻/NO₂⁻ com V (III) e (iii) a precipitação do NO₃⁻ com nitron. Porém, o meio resultante destes procedimentos suprimiu a PVG. Apenas a redução do NO₃⁻ com sulfato de hidrazina e radiação UV, seguida de eliminação do NO₂⁻ com ácido sulfâmico, permitiu a eficiente PVG do Se em ácido acético.

Além disso, assim como na HG, na PVG é necessária uma etapa de pré-redução do Se (VI) a Se (IV) para determinação de Se total. A determinação de Se (IV) e Se (VI) por PVG-QTA AAS, após a extração em ultrassom com H₂O e NaOH, respectivamente, em amostras de suplemento alimentar foi realizada por Nováková *et al.*⁷⁴. Na etapa de pré-redução, a solução contendo Se (VI) era misturada *in line* com uma suspensão de TiO₂ e a redução Se (VI) ocorria através da passagem pelo reator UV. Por outro lado, Rybínová *et al.*⁶⁴ procederam a pré-redução do Se (VI) em amostras de suplemento alimentar com solução de HCl 6 mol L⁻¹ e aquecimento. Entretanto, as amostras precisaram ser diluídas para a concentração de HCl final resultar na faixa de concentração entre 5-50 mmol L⁻¹. Foi possível

realizar a extração do Se das amostras com H_2O , HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl 50 mmol L^{-1} , com exceção de uma amostra comercializada em cápsula, para a qual foi necessária digestão em forno de micro-ondas seguida de uma etapa de evaporação até próximo à *secura* para garantir a eliminação do HNO_3 .

Um conjunto de duas lâmpadas UV em sequência foi empregado por Suzuki *et al.*⁷⁵ na especiação de Se. A primeira delas, de 40 W, garantiu a decomposição e oxidação dos compostos orgânicos de Se em Se (VI), enquanto que a segunda lâmpada UV (8W), na presença de ácido acético e catalisador TiO_2 , promoveu a redução e a PVG do Se (SeCO e SeH_2). Destaca-se que inclusive a selenobetaina, composto orgânico semelhante à arsenobetaina, resistente à oxidação, foi convertida quantitativamente a Se (VI) após um aumento no tempo de exposição à radiação UV no primeiro reator.

A especiação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em óleo de peixe por PVG-AFS foi conduzida por Chen *et al.*⁵⁶ após uma extração líquido-líquido. As amostras foram transferidas para um frasco e acrescidas de 40 mL de água. A mistura foi agitada vigorosamente por 10 min e centrifugada. A camada superior de óleo foi descartada e a fase aquosa contendo o analito utilizada para a análise.

Liu *et al.*⁵⁷ realizaram a determinação de Hg em tecido biológico por ID-PVG-ICP-MS (diluição isotópica PVG-ICP-MS), após a solubilização das amostras enriquecidas com o isótopo ^{201}Hg em banho ultrassônico com ácido fórmico. A ID permitiu contornar a baixa transmitância da radiação UV nas soluções opacas das amostras, resultando em valores concordantes com valores certificados.

O desenvolvimento de metodologias para a determinação de elementos tóxicos, como o Hg, e essências, como o Se, baseadas na conversão do analito a uma espécie volátil, pelas técnicas de geração de vapor acopladas à espectrometria de absorção atômica, representa uma alternativa sensível e de baixo custo à equipamentos multielementares e de alto custo de operação, como ICP-MS. Além disso, o emprego da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, como sistema de atomização/detecção, viabiliza a pré-concentração *on line* do analito, que se encontra na forma volátil, possibilitando melhores limites de detecção.

Dentre as técnicas de geração de vapor, a CVG é a técnica usualmente empregada. Enquanto que a PVG se encontra em pleno processo de desenvolvimento e, por isso, as otimizações dos parâmetros experimentais, como tipo de reator, tipo de LMWC, hifenação com técnicas de detecção, métodos de preparo de amostra, bem como aplicação da PVG a amostras reais, são ainda incipientes.

De acordo com a revisão da literatura realizada, metodologias desenvolvidas para determinar a concentração de Se em amostras de água de coco com emprego de técnicas de geração química e fotoquímica de vapor são inexistentes. O mesmo pode ser dito em relação à determinação de Hg em amostras de peixes com o uso da geração fotoquímica de vapor acoplada à GF AAS.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolvimento de métodos analíticos baseados nas técnicas de geração fotoquímica e química de vapor acopladas à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) para a determinação dos elementos-traço Hg e Se em amostras biológicas. Ênfase foi dada na investigação dos parâmetros experimentais do sistema para cada elemento, visando a obtenção da melhor eficiência na geração de vapor, e também no que tange ao método de preparo da amostra, buscando-se o desenvolvimento de métodos analíticos que fossem rápidos, sensíveis, exatos, precisos e de baixo custo.

3.2 ESPECÍFICOS

- Montar um sistema de geração fotoquímica de vapor e acoplar com o espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite;
- Investigar os parâmetros experimentais individuais dos sistemas de geração fotoquímica e química de vapor para cada analito, visando obter a melhor eficiência;
- Investigar métodos de preparo de amostras para a determinação de Hg em peixe por geração fotoquímica de vapor acoplada à GF AAS;
- Investigar métodos de preparo de amostras de água de coco para determinação de Se, pelas técnicas de geração fotoquímica de vapor e geração de hidretos acopladas à GF AAS;
- Estimar a eficiência da geração fotoquímica de vapor através da comparação com a geração química de vapor para cada analito;
- Avaliar a exatidão e a precisão dos métodos desenvolvidos, utilizando materiais de referência certificados (se disponíveis) e/ou por comparação dos resultados com os métodos convencionais de análise, baseados em dissolução ácida e na amostragem líquida por GF AAS;
- Aplicar os métodos desenvolvidos na quantificação de Hg e Se em amostras de peixe e água de coco, respectivamente.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a determinação de Hg e Se pelas técnicas de geração de vapor empregadas, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica AAS 5 EA equipado com forno de grafite com aquecimento transversal (Analytik Jena, Jena, Alemanha) e com uma lâmpada de deutério (NARVA G.L.E., Berlim, Alemanha) para a correção de fundo. Uma lâmpada de cátodo oco de mercúrio (NARVA G.L.E.) operada sob uma corrente de 3,0 mA, fenda espectral de 0,8 nm e comprimento de onda 253,4 nm foi empregada na determinação de Hg. Para a determinação de Se, foi empregada uma lâmpada de cátodo oco de Se (IST, Nova York, EUA) operada sob uma corrente de 11 mA, fenda espectral de 0,8 nm e comprimento de onda 196,0 nm.

Na análise direta de Se em água de coco, foi empregado um espectrômetro de absorção atômica Zeenit 650P (Analytik Jena) equipado com forno de grafite com aquecimento transversal e um sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman transversal, empregando um campo magnético de 0,8 T. Uma lâmpada de cátodo oco de Se (Analytik Jena) operada sob 6,0 mA, comprimento de onda 196,0 nm e fenda espectral de 0,5 nm, foi utilizada como fonte de radiação.

Para a identificação da interferência espectral na determinação de Se por análise direta em água de coco, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo contrAA 700 (Analytik Jena), equipado com chama e forno de grafite com aquecimento transversal em dois compartimentos diferentes. Este espectrômetro consiste em uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade que opera em modo *hot-spot* a 300 W, cuja emissão compreende uma faixa contínua de 190 a 900 nm; um monocromador duplo de alta resolução e um dispositivo de carga acoplada (CCD) como detector, com 588 *pixels* completamente independentes, cada um equipado com um amplificador individual. O monocromador de alta resolução é composto por um prisma para pré-dispersão da radiação, seguido de uma rede *echelle*, ambos em arranjo Littrow. A linha analítica principal do Se, 196,027 nm, e a vizinhança espectral de aproximadamente 0,22 nm, fornecida por 200 *pixels* que são utilizados para fins analíticos, foram utilizados para avaliar a interferência espectral. A absorvância integrada foi medida usando-se o *pixel* central (CP) e dois *pixels* adjacentes (CP±1), correspondendo a um intervalo espectral de 3,3 pm, os quais foram somados e utilizados para avaliar a linha analítica.

Na determinação de Hg, foram empregados tubos de grafite sem plataforma piroliticamente recobertos (Analytik Jena). Nos experimentos conduzidos para determinação de Se, foram utilizados tubos de grafite com plataforma integrada e recobrimento pirolítico (Analytik Jena).

A geração fotoquímica de vapor do Hg foi realizada utilizando um reator fotoquímico de alta eficiência (Beijing Titan Instrument Co. Ltda, Pequim, China), que consiste em uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (UV-C 185 nm/254 nm) contendo um percurso analítico interno de quartzo sintético (84,0 cm comprimento; 0,11 cm diâmetro interno; 800 μ L volume interno) posicionado ao longo do eixo central da lâmpada, proporcionando uma irradiação de 360° da solução (Figura 2a). Para promover uma irradiação mais eficiente e proteger o operador da radiação UV, a lâmpada foi colocada em uma caixa de aço inox contendo dois sistemas de arrefecimento por ventilação. A geração fotoquímica de vapor do Se foi realizada empregando-se uma lâmpada de Hg de 18 W –4 pinos, com comprimento de onda de 254 nm, modelo TUV PL-L (Philips, Pila, Polônia) observada na Figura 2b. Ao redor da lâmpada de Hg, foi inserido um percurso analítico confeccionado em quartzo, na forma de espiral (Figura 2c) com as seguintes dimensões: 115 cm de comprimento x 1,3 mm de diâmetro interno x 3,0 mm de diâmetro externo e volume interno de 2,3 mL.

Em ambos os reatores fotoquímicos, as soluções foram introduzidas no sistema com o auxílio de uma bomba peristáltica (Reglo Analog Ismatec, Zurique, Suíça). A vazão do gás carreador (argônio) foi controlada com um fluxômetro (Cole Parmer, Vernon Hills, EUA). Nos experimentos de PVG do Se, também foi utilizado um controlador de fluxo mássico de gases de 0-1000 mL min^{-1} , modelo FMA 5400A/5500A Series (Omega Engineering, Stamford, EUA). O transporte do vapor do analito do separador gás-líquido (volume interno de 10 mL) para o forno de grafite foi realizado através de uma linha de transferência de politetrafluoretileno (PTFE) (75,0 cm de comprimento e 0,76 mm de diâmetro interno), conectada ao amostrador automático MPE 5 (Analytik Jena) e a um capilar de titânio. O sistema HS 5 (Analytik Jena) de geração química de vapor foi utilizado para acionar o braço do amostrador automático e introduzir o capilar no forno de grafite. As medidas foram avaliadas no modo área do pico, o que resulta no sinal analítico de absorvância integrada (A_{int}).

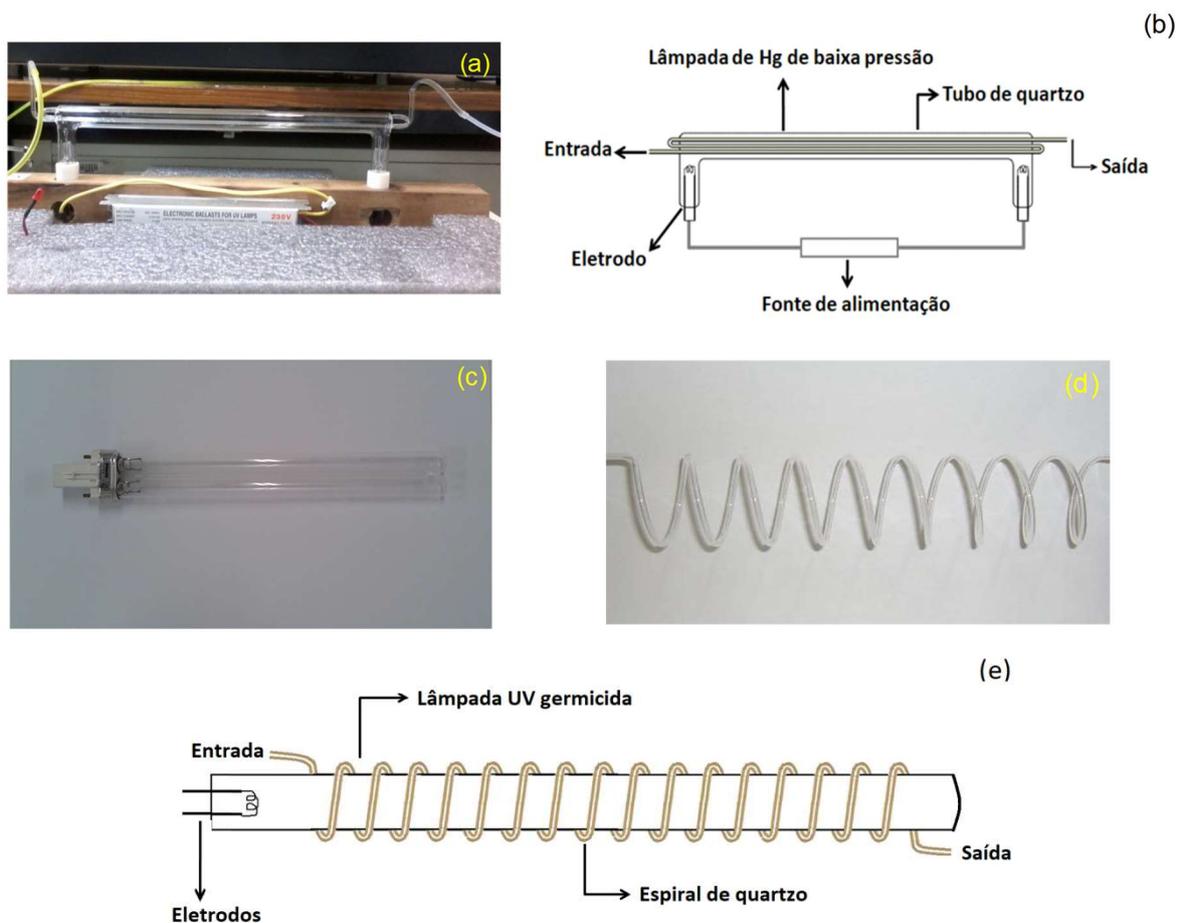


Figura 2. Reator fotoquímico (a) e esquema do reator (b) utilizados na PVG do Hg; lâmpada de UV (c), espiral de quartzo (d) e esquema do reator (e) empregados na PVG do Se.

O sistema HS 5 (Analytik Jena) de geração química de vapor, operado no modo batelada, acoplado ao espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite, foi empregado para avaliar a eficiência da geração fotoquímica de vapor do Hg.

A geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite foi empregada para a determinação de Se em água de coco. Na geração de hidretos de Se, a solução de NaBH_4 era misturada com a solução padrão/amostra ou com a solução carreadora (HCl) em uma bobina de reação de 40 cm de comprimento.

A geração de vapor do Se por ambas as técnicas PVG e HG foi conduzida utilizando um sistema de injeção em fluxo, sendo a inserção da solução padrão/amostra na solução carreadora realizada com uma válvula de injeção.

Um banho ultrassônico USC 1880A (Unique, São Paulo, Brasil) foi utilizado no preparo das amostras.

Para a pesagem das amostras e reagentes, foi utilizada uma balança analítica Europe modelo EU60 (Gibertini Elettronica, Milão, Itália).

Forno de micro-ondas modelo Multiwave PRO (Anton Paar, Graz, Áustria), equipado com um rotor de 24 posições e frascos de PTFE, foi utilizado para a digestão das amostras.

Para o preparo das amostras de água de coco para a determinação de Se por PVG-GF AAS, foram investigados três reatores. O primeiro (reator 1) consistiu de uma unidade de reação fotoquímica *Beam Boost* modelo hwg (International Chemie–Technik, Bad Homburg, Alemanha), contendo uma lâmpada UV (254 nm) de 8 W e uma bobina de reação de PTFE (reatores tipo *knotted*) de 0,5 mm de diâmetro interno e 10 m de comprimento. O segundo (reator 2) era constituído por uma lâmpada UV-C (185 nm) germicida de 22 W (Bravo, modelo GPH436T5VH/4P) com 43,7 cm de comprimento. Ao redor da lâmpada UV, foi colocada uma espiral de quartzo de mesmo comprimento como percurso analítico. O conjunto, lâmpada UV e percurso analítico, foi inserido em um tubo de PVC para proteção do operador contra a radiação UV. Durante a operação do reator, um fluxo de Ar foi introduzido para evitar a formação de O₃. O terceiro reator (reator 3) consistiu de um digestor UV, construído em uma oficina da Universidade Federal de Santa Maria, equipado com uma lâmpada de Hg de alta pressão (500 W) e dez frascos de quartzo dispostos ao redor da lâmpada. A temperatura do reator era controlada por um termostato e, quando excedida, um sistema de arrefecimento por ventilação era acionado.

4.2. LIMPEZA DO MATERIAL

A vidraria e os recipientes utilizados no trabalho foram previamente descontaminados e secos para posterior uso. Uma solução de HNO₃ ~ 1,4 mol L⁻¹ foi introduzida nestes recipientes, ficando em contato com o ácido por um período de 24 horas para a completa descontaminação. Após retirar a solução ácida, os frascos foram lavados por pelo menos três vezes com água destilada e deionizada.

4.3. REAGENTES E AMOSTRAS

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Água ultrapura de resistividade de 18 MΩ cm, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA), foi utilizada para o preparo de soluções padrão e amostras. Ácido clorídrico e ácido nítrico (Synth, Diadema, Brasil) foram destilados abaixo do ponto de ebulição em um sistema de destilação de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil). Tetrahidroboreto de sódio (Acros Organic, Geel, Bélgica) foi usado como redutor químico na geração química de vapor do Hg e

Se. Hidróxido de potássio (Merck) foi utilizado para estabilizar as soluções de NaBH_4 . Ácido acético, ácido fórmico e *n*-propanol (Synth) foram investigados como compostos orgânicos de baixo peso molecular na PVG. Uma solução de $10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ de Pd em 15% (v/v) HNO_3 (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizada como modificador químico. Peróxido de hidrogênio 35% (v/v) (Merck) foi empregado no preparo de amostra. Argônio de pureza 99,9% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás carreador nos sistemas de CVG e PVG e gás de purga e proteção em GF AAS.

4.3.1 Mercúrio

Soluções padrões de Hg foram preparadas diariamente a partir de uma solução estoque intermediária de 10 mg L^{-1} Hg em $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ HNO_3 , esta preparada mensalmente (tempo em que a solução permanecia estável) pela diluição de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} Hg, metal dissolvido em HNO_3 (Fluka, Buchs, Suíça). Uma solução de 1000 mg L^{-1} Au (SPEX Industries, Nova Jersey, EUA) foi utilizada para recobrir o forno de grafite como modificador permanente. Hidróxido de tetrametilamônio 25% (m/v) em água (Merck) foi empregado no preparo das amostras. Para minimizar a formação de espuma durante o procedimento, foi utilizado *n*-octanol (Synth).

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada pela análise dos seguintes materiais de referência certificados (CRM): DOLT-4 (*Dogfish Liver*) e TORT-2 (*Lobster Hepatopancreas*), ambos provenientes do *National Research Council Canada* (NRCC, Ottawa, Canada), e BCR 463 (*Tuna Fish*) oriundo do *European Commission Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM, Geel, Bélgica). Adicionalmente, dois materiais de referência foram analisados: (i) uma amostra de músculo de peixe, fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, em circunstância da participação em ensaio colaborativo para a caracterização da amostra candidata à material de referência certificado; (ii) e uma amostra de atum, candidato à material de referência, fornecida pela Universidade Federal do ABC. O método desenvolvido foi aplicado em duas amostras de peixe (merluza e sardinha), fornecidas pelo LANAGRO. Todas as amostras e materiais de referência foram fornecidos liofilizados e moídos.

4.3.2 Selênio

As soluções padrão de Se foram preparadas diariamente a partir de diluições sequenciais de uma solução intermediária de 10 mg L^{-1} de Se, preparada pela diluição de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} de Se inorgânico (SpecSol, Jacareí, Brasil). Soluções padrão

de 1000 mg L⁻¹ de selenato e selenometionina foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas de selenato de sódio e seleno-DL-metionina (C₅H₁₁NO₂Se), respectivamente, ambas adquirida da Sigma-Aldrich, (Munique, Alemanha). Soluções de 1000 mg L⁻¹ de Ir (Sigma-Aldrich), W (SpecSol) e Rh (SpecSol) foram empregadas para o recobrimento do forno de grafite como modificadores químicos permanentes, e uma solução de Ni (1000 mg L⁻¹, SpecSol), empregada como modificador químico. Soluções de nitrato de amônio (Sigma-Aldrich) e dihidrogenofosfato de amônio (Merck) foram utilizados na investigação da interferência espectral. Uma solução preparada a partir de isopropóxido de titânio (IV) (Sigma-Aldrich), etanol anidro (Dinâmica, Diadema, Brasil) e dietanolamina (Química Moderna, Barueri, Brasil) foi utilizada para recobrir a superfície do percurso de quartzo empregado na redução do Se (VI) a Se (IV) na PVG. As amostras de água de coco de diferentes marcas analisadas nesse trabalho foram adquiridas no comércio local. O CRM de leite em pó NIST 1549 (Non-fat milk powder) foi empregado na avaliação da exatidão da HG.

4.4 PREPARO DE AMOSTRA

4.4.1 Determinação de mercúrio em peixe por PVG-GF AAS

O método de preparo de amostra empregado para a determinação de Hg em peixe por PVG foi adaptado de Vieira *et al.*⁴³. Uma massa de amostra (10-100 mg) foi pesada em um frasco de polipropileno graduado de 15 mL, seguida da adição de 1,0 mL da solução de TMAH 25% (m/v). O frasco foi mantido fechado em um banho a 60 °C por 3 h. Ao atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 1,0 mL de *n*-propanol como LMWC e uma gota de *n*-octanol. Em seguida, o volume foi completado até 10 mL com água ultrapura. A exceção foi o CRM TORT-2, ao qual foi adicionado 3,0 mL de solução de H₂O₂ 35% (v/v) antes de completar o volume final (10 mL), e agitado manualmente por cerca de 1 minuto antes da análise. As amostras e os CRM foram solubilizados em triplicata.

4.4.2 Determinação de selênio em água de coco por HG-GF AAS

As amostras de água de coco foram digeridas em forno de micro-ondas utilizando o programa descrito na Tabela I. Alíquotas de 1,0 mL de amostra foram transferidas para frascos de PTFE, seguida da adição de 3,0 mL de HNO₃ bidestilado e 1,0 mL de H₂O₂ 30% (v/v). Para avaliar a exatidão do método, nas amostras foram adicionadas soluções padrão de Se, cuja concentração final resultou em 3 µg L⁻¹ de Se (IV), Se (VI) e selenometionina: as adições foram feitas em frascos separados. Ao final da digestão, os extratos foram transferidos quantitativamente para frascos de polipropileno graduados de 15 mL, seguida de

sucessivas lavagens do frasco de digestão utilizando 5 mL de HCl 12 mol L⁻¹, resultando em um volume final de 10 mL. Posteriormente, as amostras foram mantidas em um banho a 90 °C por 30 minutos com o objetivo de promover a redução das espécies de Se (VI) para Se (IV).

Para o preparo do CRM de leite em pó NIST 1549, foi pesada uma massa de 0,1 g e solubilizada em 1,0 mL de H₂O, com ajuda de um agitador do tipo vortex. Após a solução ser transferida para o frasco de PTFE, procedeu-se o mesmo procedimento de digestão e pré-redução descrito para as amostras de água de coco.

Tabela I. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para a digestão das amostras de água de coco

Etapa	Temperatura / °C	Rampa /°C min ⁻¹	Tempo /min
1	100	10	10
2	180	8	10

4.4.3 Determinação de Se em água de coco por PVG-GF AAS

Na PVG, as amostras foram digeridas em um digestor UV. Alíquotas de 1,0 mL de amostra foram transferidas para frascos de quartzo junto com 50 µL de HNO₃ 1,4 mol L⁻¹ e 50 µL de H₂O₂ 35% (v/v). A cada hora transcorrida, 50 µL de H₂O₂ era adicionado, por um período de 6h, totalizando 0,3 mL de H₂O₂. A temperatura foi mantida próxima de 75 °C. Ao final, os extratos foram completados para 5 mL com ácido fórmico 0,44 mol L⁻¹. A etapa de pré-redução do Se (VI) a Se (IV) foi realizada *on line* em uma segunda espiral de quartzo, inserida no reator, recoberta com um filme fino de TiO₂ (detalhes do procedimento se encontram no Item 4.5.2).

4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1 Mercúrio

Inicialmente, 250 µg de Au foram depositadas na parede do tubo de grafite como modificador permanente de acordo com o procedimento descrito por Flores *et al.*³⁶. A parede do tubo de grafite foi recoberta através de 5 injeções sucessivas de 50 µL cada de uma solução padrão de 1000 mg L⁻¹ Au. Cada alíquota introduzida no tubo de grafite foi submetida ao programa de temperatura apresentado na Tabela II.

Na otimização da PVG, as soluções utilizadas consistiram em 10 mL de uma solução contendo 5 µg L⁻¹ Hg e 10% (v/v) de um dos LMWC investigados. A partir destas, uma alíquota de 2,0 mL de solução padrão ou amostra contendo 2,5% (v/v) TMAH e 10% (v/v) *n*-

propanol como LMWC, foi inserida pela bomba peristáltica no reator com uma vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, onde a solução foi exposta à radiação UV por cerca de 16 s. Após a passagem pelo reator, a solução foi direcionada para o GLS, onde o vapor de Hg gerado foi carregado pelo gás Ar (vazão de 95 mL min^{-1}) para o forno de grafite e coletado na superfície do tubo de grafite pré-aquecido, recoberto com Au. O tempo total de cada medida foi de aproximadamente 150 s. As medidas de todos padrões e amostras foram conduzidas em triplicata, sob as condições otimizadas. O vapor de Hg, coletado na parede do tubo de grafite, foi submetido ao programa de temperatura apresentado na Tabela III. Neste estudo, foi utilizado um sistema de geração fotoquímica de vapor representado no esquema ilustrado na Figura 3.

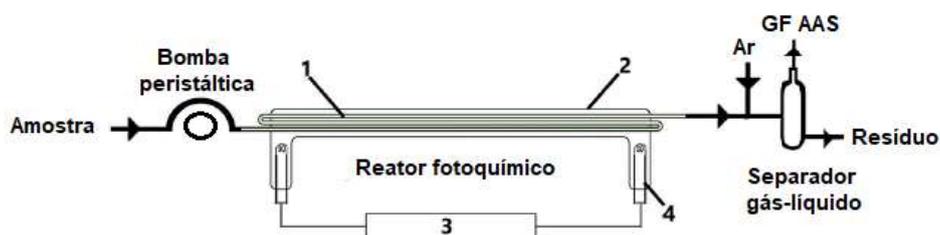


Figura 3. Esquema do sistema de geração fotoquímica de vapor. 1) percurso analítico de tubo de quartzo sintético fino ($800 \mu\text{L}$ volume interno); 2) lâmpada de mercúrio de baixa pressão (Figura 2a); 3) fonte de energia; 4) eletrodo de tungstênio. Adaptado de Jesus *et al.*⁷⁶

Para estimar a eficiência da geração fotoquímica de vapor do Hg, foi empregada a CV-GF AAS conduzida em um sistema em batelada. O sistema de geração foi operado sob as seguintes condições: tempo de bombeamento 40 s; tempo de reação 30 s; tempo de limpeza 10 s. No frasco de reação do gerador, foram adicionados 1,0 mL de solução padrão e 5 mL de uma solução de HCl 3% (v/v). A solução redutora de NaBH_4 1,0% (m/v), estabilizada com KOH 0,3% (m/v), foi bombeada para o frasco de reação sob uma vazão de 10 mL min^{-1} . O gás Ar (vazão de 25 mL min^{-1}) auxiliou na remoção e no transporte do vapor de Hg para o atomizador, onde foi coletado sobre a parede do tubo de grafite recoberta com $250 \mu\text{g Au}$ como modificador permanente. A temperatura de coleta e de atomização selecionadas foram $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e $600 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Tabela II. Programa de temperatura utilizado para o recobrimento da parede do tubo de grafite com 250 $\mu\text{g Au}$

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / °C s⁻¹	Permanência / s	Fluxo Ar / L min⁻¹
1	110	10	50	2,0
2	160	30	50	2,0
3	900	50	10	0,1
4	1000	1	5	2,0

Tabela III. Programa de temperatura utilizado na determinação de Hg em peixe por PVG-GF AAS

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / °C s⁻¹	Permanência / s	Fluxo Ar / L min⁻¹
Pré-aquecimento	100	25	20	0,1
Coleta	100	0	130	0
Auto zero	100	0	4	0
Atomização	600	1400	4	0
Limpeza	900	200	4	2,0

4.5.2 Selênio

Para a determinação de Se, a plataforma do tubo de grafite foi recoberta com 120 $\mu\text{g Ir}$ como modificador permanente, conforme descrito por Tyson *et al.*⁴⁰. O recobrimento foi realizado através da introdução de 4 alíquotas sequenciais de 30 μL de uma solução de 1000 mg L^{-1} de Ir, utilizando o programa de temperatura descrito na Tabela IV. Este procedimento foi adotado para ambas as técnicas de geração de vapor de Se empregadas.

Tabela IV. Programa de temperatura utilizado para o recobrimento da plataforma do tubo de grafite com 120 μg Ir

Etapa	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Rampa / $^{\circ}\text{C s}^{-1}$	Permanência / s	Fluxo Ar / L min^{-1}
1	110	1	40	2,0
2	130	20	50	2,0
3	1200	20	30	2,0
4	2000	10	5	0

Na Figura 4, é apresentado um esquema do sistema de geração de hidretos utilizado no presente trabalho. Na HG do Se, a solução padrão/amostra e a solução carreadora foram introduzidas no sistema pela bomba peristáltica por um tempo de 30 s, com uma vazão de 4,0 mL min^{-1} . O mesmo canal da bomba foi empregado para a introdução da solução padrão/amostra e a solução carreadora, sendo a intercalação entre as mesmas feita manualmente através de uma válvula. Um segundo canal da bomba foi utilizado para a introdução da solução de NaBH_4 , a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . A solução de NaBH_4 foi adicionada ao sistema através de uma confluência

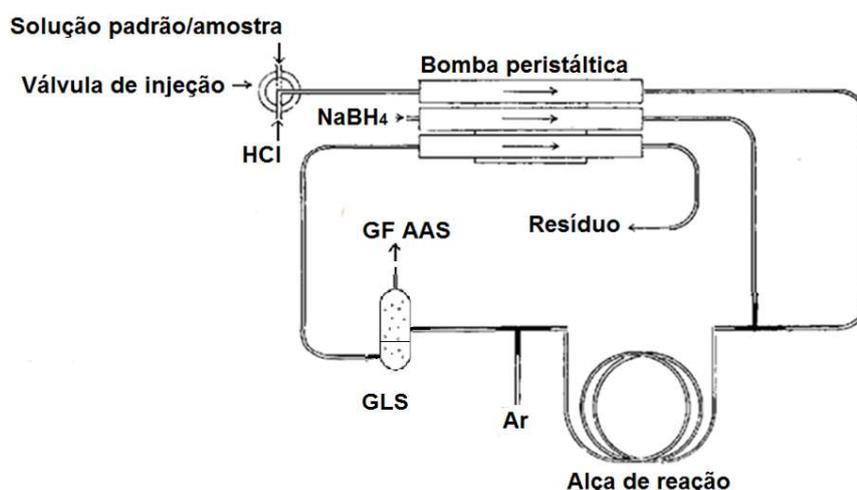


Figura 4. Esquema do sistema de HG utilizado para determinação de Se por GF AAS. Adaptado de Matoušek *et al.*⁷⁷

do tipo T, antes da alça de reação (comprimento total de 40 cm, contendo duas alças). Neste sistema, a solução padrão/amostra era injetada na solução carreadora ($\text{HCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) por 30s, seguida da reação da solução padrão/amostra e o NaBH_4 na alça de reação. O gás Ar foi introduzido através de uma segunda confluência do tipo T entre a saída da alça de reação e o GLS. O hidreto gerado foi carreado pelo gás Ar (vazão 125 mL min^{-1}) para o forno de grafite,

onde foi coletado pelo Ir na superfície da plataforma de grafite. O programa de temperatura utilizado se encontra na Tabela V.

Na PVG do Se, foi empregado o mesmo sistema de injeção em fluxo utilizado na HG, exceto pela substituição da alça de reação pelo reator fotoquímico, constituído pela lâmpada de UV e a espiral de quartzo, como percurso analítico, apresentados na Figura 2b e 2c (Figura 5). Além disso, um único canal da bomba foi utilizado, tanto para introduzir a solução padrão/amostra como a solução carreadora ($0,44 \text{ mol L}^{-1}$ ácido fórmico) no sistema, sendo a intercalação entre estas feita através de uma válvula. Nas soluções padrão e amostra, antes de serem completadas para o volume final, foi adicionado um volume de ácido fórmico 85% (v/v) para resultar na concentração final de $0,44 \text{ mol L}^{-1}$. Uma solução com esta mesma concentração foi utilizada como solução carreadora. A solução padrão/amostra (injetada por 40 s) e a solução carreadora foram introduzidas no sistema pela bomba peristáltica com uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Após exposição à radiação UV no reator, as soluções foram direcionadas para o GLS. O gás

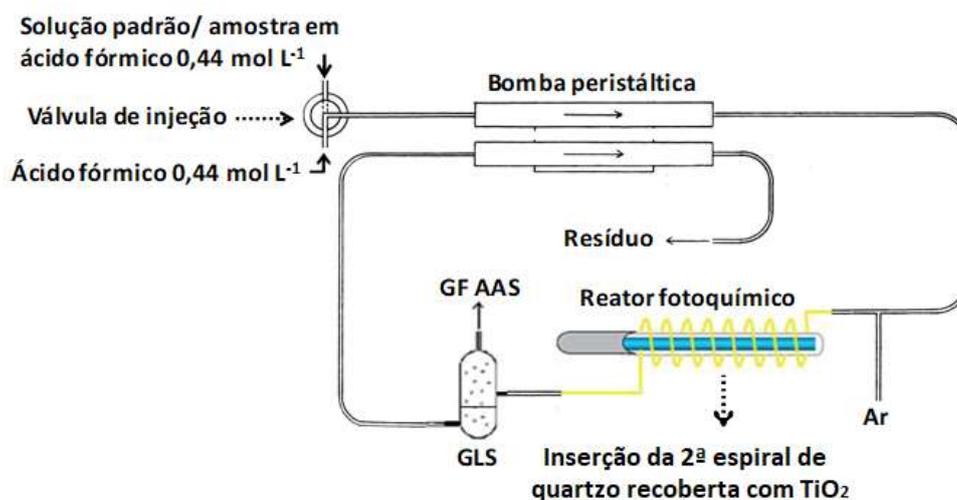


Figura 5. Esquema do sistema de PVG utilizado na determinação de Se por GF AAS. Modificado de Matoušek *et al.*⁷⁷

Ar, utilizado como gás carreador, foi introduzido no sistema por um T localizado antes do reator fotoquímico. Com uma vazão de 115 mL min^{-1} de Ar, as espécies voláteis de Se foram carregadas para o forno de grafite pela linha de transferência e introduzidas no interior do tubo de grafite, onde foram coletadas pelo modificador permanente Ir. O programa de temperatura empregado está descrito na Tabela V.

Tabela V. Programa de temperatura utilizado na determinação de Se por PVG e HG acoplada à GF AAS

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / °C s⁻¹	Permanência / s	Fluxo Ar / L min⁻¹
Pré-aquecimento	100	20	55 ^a , 135 ^b	0,1
Coleta	300	200 ^b , 300 ^a	50 ^a , 60 ^b	0
Auto zero	300	0	6	0
Atomização	2100 ^b , 2200 ^a	1000 ^a , 1100 ^b	7	0
Limpeza	2200	0 ^a , 100 ^b	3	2,0

^ageração de hidretos; ^bgeração fotoquímica de vapor

Nos experimentos com Se (VI), a pré-redução a Se (IV) foi realizada em uma segunda espiral de quartzo recoberta com um filme fino de TiO₂, conforme procedimento descrito por Suzuki *et al.*⁷⁵ Para o recobrimento, foi preparada uma solução pela adição gota a gota de 10,4 mL de isopropóxido de titânio a 40 mL de etanol anidro e 3,5 mL de dietanolamina. Esta solução foi lentamente misturada a 30 mL de etanol anidro e a mistura agitada por 4 h. A solução final foi introduzida continuamente na espiral de quartzo por 20 min, com o auxílio de uma bomba peristáltica (vazão 0,3 mL min⁻¹). Na sequência, ar foi cuidadosamente bombeado através da espiral para expulsar a fase líquida, mas mantendo a superfície úmida. A espiral foi seca em uma estufa a 100 °C por 20 min e, em seguida, calcinada a 500 °C por 2 h em mufla. Dessa forma, um filme fino de TiO₂, aderente e transparente ao UV, foi formado sobre a superfície da espiral de quartzo.

Tabela VI. Programa de temperatura utilizado na determinação de Se por GF AAS por amostragem líquida

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / °C s⁻¹	Permanência / s	Fluxo Ar / L min⁻¹
Secagem	110	10	50	2,0
Pirólise	1400	300	50	2,0
Auto zero	1400	0	5	0
Atomização	2100	1500	4	0
Limpeza	2200	100	5	2,0

Na análise direta de Se em água de coco, foram utilizados os dois espectrômetros com fonte de linha descritos no Item 4.1. As amostras foram homogeneizadas e introduzidas na

plataforma integrada do tubo de grafite com auxílio do amostrador automático. Da mesma forma se procedeu a investigação e identificação da interferência espectral utilizando HR-CS GFAAS (Item 4.1). O programa de temperatura empregado nos três equipamentos se encontra na Tabela VI. Neste estudo, foram utilizados tubos de grafite com plataforma integrada recobertos com 120 µg de Ir como modificador permanente.

4.6 PARÂMETROS DE MÉRITO

O limite de detecção (LD), expresso como a quantidade mínima detectável com uma dada certeza analítica, é uma medida da concentração ou massa de analito que, quando excedida, permite o reconhecimento de que a quantidade de analito na amostra é maior que a da solução branco^{30,78}. O LD foi calculado utilizando o desvio padrão de dez medidas do branco (σ) e o coeficiente angular (S) da curva de calibração (também definido como sensibilidade), conforme Equação 8.

$$LD = \frac{3\sigma}{S} \quad \text{Equação 8}$$

O limite de quantificação (LQ), definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente com risco de erro inferior a 5%, foi calculado pela Equação 9.

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 9}$$

Outro parâmetro avaliado foi a massa característica (m_0), a qual consiste na massa de analito necessária para produzir um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s, equivalente a 1% do sinal de absorção³⁰. Este parâmetro é calculado pela Equação 10, na qual m é a massa de analito correspondente a uma massa intermediária da curva de calibração externa e A_{int} é o valor da absorvância integrada, em segundos, produzida por esta massa.

$$m_0 = \frac{0,0044m}{A_{\text{int}}} \quad \text{Equação 10}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, os resultados serão apresentados em dois subitens. No subitem 5.1, serão abordados os resultados referentes ao método desenvolvido para determinação de Hg em amostras de peixe por PVG. Neste, a geração de vapor frio foi empregada com a única finalidade de estimar a eficiência da PVG do Hg.

No subitem 5.2, serão apresentados os resultados obtidos com os métodos desenvolvidos para determinação de Se em água de coco por HG e PVG. Nesta parte do trabalho, a HG foi empregada com o propósito de estimar a eficiência da PVG do Se, bem como uma técnica comparativa na avaliação da exatidão dos resultados da PVG do Se. Será também apresentada a interferência espectral observada nas amostras de água de coco quando analisadas diretamente por GF AAS com fonte de linha e a posterior identificação dessa interferência por HR-CS AAS.

5.1 MERCÚRIO

5.1.1 Otimização das condições de geração fotoquímica de vapor

Neste trabalho, foi investigada a influência de diferentes compostos orgânicos de baixo peso molecular (ácido acético, ácido fórmico e *n*-propanol) como fonte de radicais redutores, tais como $\dot{\text{H}}$, $\dot{\text{C}}\text{H}_3$, e $\dot{\text{C}}\text{OOH}$, para a geração de vapor de Hg. Estes LMWC foram previamente empregados com sucesso na geração fotoquímica de vapor do Hg^{47,60,79}. As investigações foram conduzidas utilizando alíquotas de 2 mL de uma solução padrão de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II) contendo 10% (v/v) de um dos LMWC estudados.

Inicialmente, o efeito da vazão da solução através do reator fotoquímico, a qual determina o tempo de exposição da solução à radiação UV, foi avaliado para cada LMWC. Na Figura 6, observa-se que, em geral, vazões maiores que 3 mL min^{-1} resultaram em um decréscimo do sinal analítico, possivelmente devido à menor quantidade de radicais presentes, resultante do menor tempo de exposição à radiação UV, e logo em uma menor eficiência da geração de vapor. Por outro lado, vazões menores aumentaram o tempo de análise, reduzindo a frequência analítica. As vazões 2,7; 2,9 e $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, (correspondendo a um tempo de irradiação de 16-18 s) foram escolhidas para o ácido acético, ácido fórmico e *n*-propanol respectivamente, para os demais experimentos.

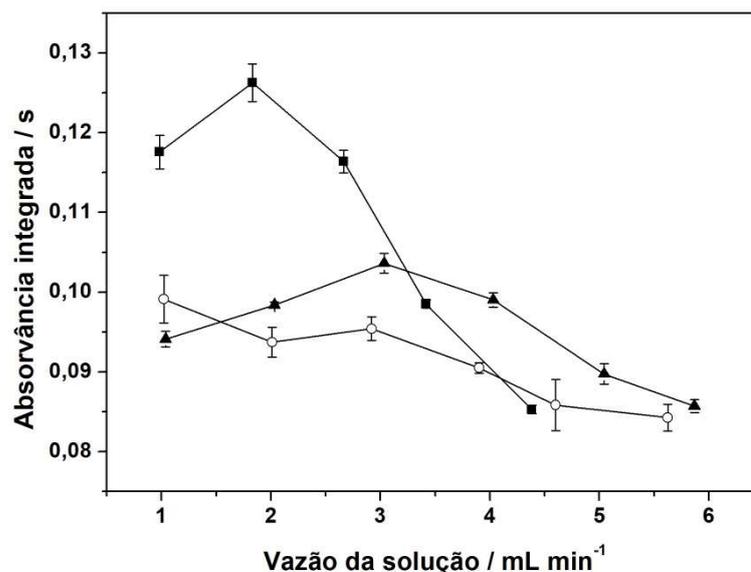


Figura 6. Efeito da vazão da solução na absorvância integrada de Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em 10% (v/v) de: ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 700 \text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente $250 \mu\text{g Au}$.

A concentração do LMWC nas soluções padrão e nas amostras é determinante para a eficiência da geração fotoquímica de vapor. Assim, um estudo foi conduzido para verificar a melhor concentração do LMWC para a geração de vapor de Hg. Esta avaliação foi realizada utilizando soluções padrão contendo diferentes concentrações dos LMWC. Na Figura 7, é possível observar que a maior resposta analítica foi obtida com a concentração de 10% (v/v) para o ácido fórmico e para o *n*-propanol, enquanto que, para o ácido acético, o sinal permaneceu constante entre 10 e 20% (v/v) e diminuiu com concentrações maiores. A concentração de 10% (v/v) foi selecionada para os três LMWC para os estudos seguintes. Em concentrações maiores, a presença de subprodutos derivados de reações fotoquímicas provavelmente resultou na menor eficiência da geração de vapor⁵⁴.

Argônio foi utilizado para separar os compostos voláteis de Hg gerados da fase condensada e também para transportá-los do GLS para o forno de grafite. A vazão de Ar avaliada variou entre $50\text{-}125 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 8). Em geral, o sinal de absorvância aumentou e permaneceu praticamente constante entre $80\text{-}110 \text{ mL min}^{-1}$ para os três LMWC. A vazão de 95 mL min^{-1} de Ar foi escolhida, pois forneceu menor desvio padrão entre as medidas.

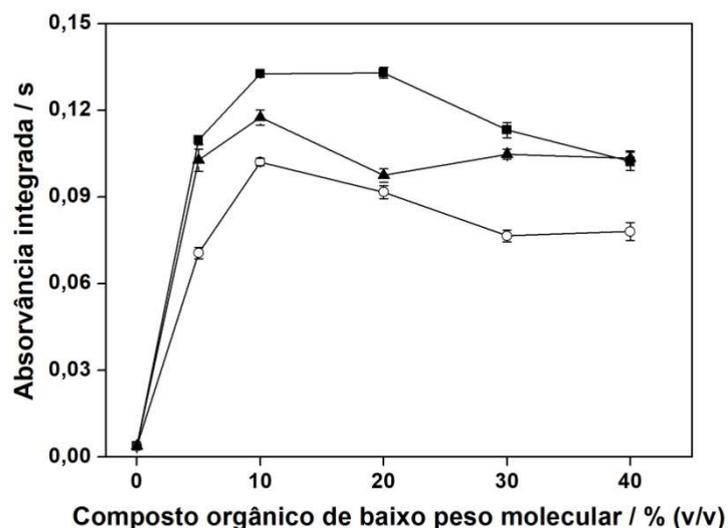


Figura 7. Efeito da concentração de ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲) na absorvância integrada de Hg (5 µg L⁻¹). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução 2,7-3,0 mL min⁻¹; vazão de Ar 95 mL min⁻¹; T_{col} 100 °C; T_{at} 700 °C; modificador permanente 250 µg Au.

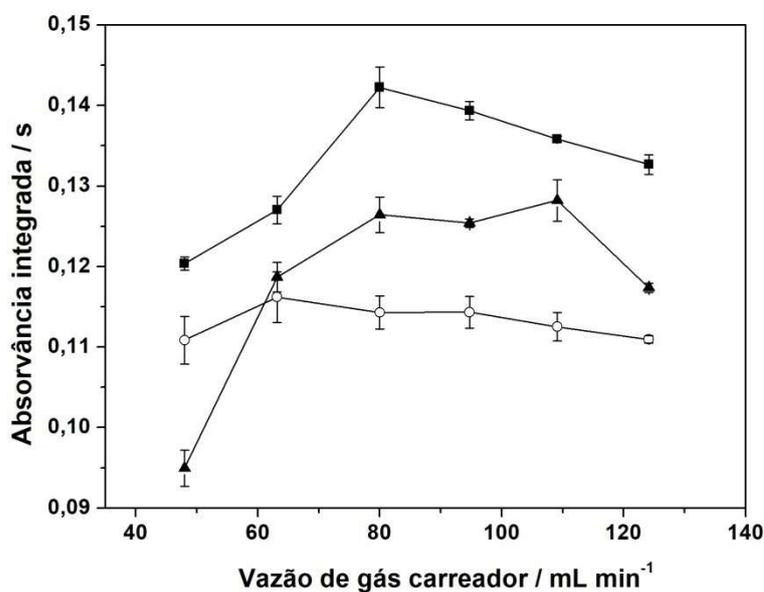


Figura 8. Efeito da vazão do gás carreador na absorvância integrada de Hg (5 µg L⁻¹) em 10% (v/v) de: ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução de 2,7-3,0 mL min⁻¹; T_{col} 100 °C; T_{at} 700 °C; modificador permanente 250 µg Au.

5.1.2 Programa de temperatura e modificador químico

Em testes preliminares, Pd foi investigado como modificador químico e Au como modificador permanente. Uma alíquota de 20 μL de uma solução de 1,0 g L^{-1} de Pd foi injetada no forno de grafite antes de cada medida e seca a 110 $^{\circ}\text{C}$ por 20 s. O recobrimento com Au seguiu como descrito no Item 4.5.1. A massa característica encontrada utilizando Au (0,33-0,43 ng) foi semelhante àquela obtida com Pd (0,38 ng). Ouro foi adotado como modificador permanente, pois apresentou sensibilidade semelhante à do Pd e dispensou a etapa de introdução de uma nova alíquota de modificador a cada medida no forno de grafite, o que reduz o ciclo de análise.

Após a definição do modificador químico, as etapas do programa de temperatura foram otimizadas utilizando duas massas de Au (250 e 500 μg) como modificador permanente. Na Figura 9, é apresentada a curva de temperatura de coleta de vapor de Hg no tubo de grafite.

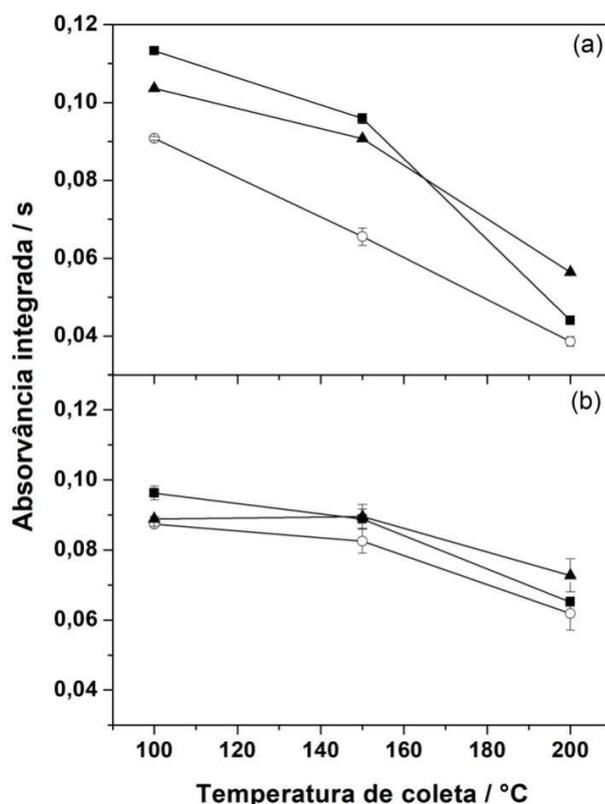


Figura 9. Curvas de temperatura de coleta de Hg a partir de uma solução analítica de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg com 10% (v/v) de: ácido acético (■), ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲) com (a) 250 μg e (b) 500 μg de Au como modificador permanente. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução 2,7-3,0 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; T_{at} 700 $^{\circ}\text{C}$.

É possível observar que a temperatura de coleta de 100 °C (temperatura mínima permitida pelo *software* do equipamento utilizado neste trabalho), em todos os casos, resultou em maior absorvância integrada, e em temperaturas maiores houve uma redução no sinal analítico. Portanto, a temperatura de coleta de 100 °C foi escolhida. He *et al.*⁸⁰ observaram comportamento similar em relação ao aumento da temperatura de coleta, utilizando forno de grafite recoberto com nanobastões de Au com PVG-GF AAS. Os autores sugeriram que provavelmente o vapor Hg é retido mesmo em temperatura ambiente. Fato este confirmado por Jesus *et al.*⁶⁰, os quais adotaram 25 °C como temperatura de coleta de Hg usando Pd e PVG-GF AAS.

A Figura 10 apresenta a curva de temperatura de atomização para uma solução padrão de 5 µg L⁻¹ de Hg para as duas massas de modificador permanente e para os três LMWC investigados. Em todos os casos, verificou-se um acentuado decréscimo do sinal analítico

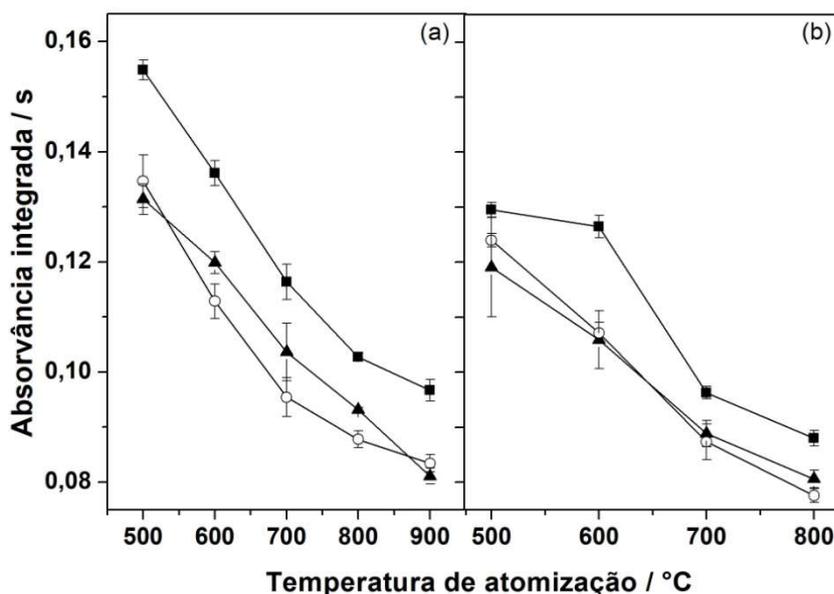


Figura 10. Curvas de temperatura de atomização de Hg, a partir de uma solução analítica de 5 µg L⁻¹ Hg em 10% (v/v) de ácido acético (■); ácido fórmico (○) e *n*-propanol (▲) com (a) 250 µg e (b) 500 µg de Au como modificador permanente. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução 2,7-3,0 mL min⁻¹; vazão de Ar 95 mL min⁻¹; T_{col} 100 °C.

com o aumento da temperatura de atomização. Devido à alta volatilidade do Hg, as perdas por difusão aumentaram significativamente com o aumento da temperatura.

Na Figura 11, observa-se que, embora 500 °C tenha resultado em um sinal de absorvância maior, para os três LMWC, o tempo de integração foi longo (8 s) e o perfil do sinal analítico apresentou cauda. Assim, 600 °C foi escolhida como temperatura de atomização. Jesus *et al.*⁶⁰ empregaram 1300 °C como temperatura de atomização, utilizando Pd como modificador químico. Neste caso, uma nova alíquota de modificador era introduzida antes de cada medida, com PVG-GF AAS. Este comportamento, provavelmente, resulta das diferentes energias de ligação com que o Hg é retido em uma superfície recoberta com Pd ou Au.

Após a otimização do programa de temperatura, foi calculada a massa característica para os três LMWC para cada massa de modificador avaliada (Tabela VII). A massa de 250 µg de Au foi escolhida para o recobrimento do forno de grafite, pois mesmo com a metade da massa de Au, os valores das m_0 foram ligeiramente menores para os três LMWC em relação a 500 µg Au.

Tabela VII. Massa característica obtida com 250 e 500 µg de Au como modificador permanente para três compostos orgânicos de baixo peso molecular. Os valores são expressos pela média (n=3) e seus coeficientes de variação entre parênteses

Composto orgânico	Massa característica / ng	
	250 µg Au	500 µg Au
Ácido acético	0,33 (1,2)	0,47 (2,8)
Ácido fórmico	0,43 (1,1)	0,47 (1,2)
<i>n</i> -Propanol	0,38 (1,8)	0,51 (2,3)

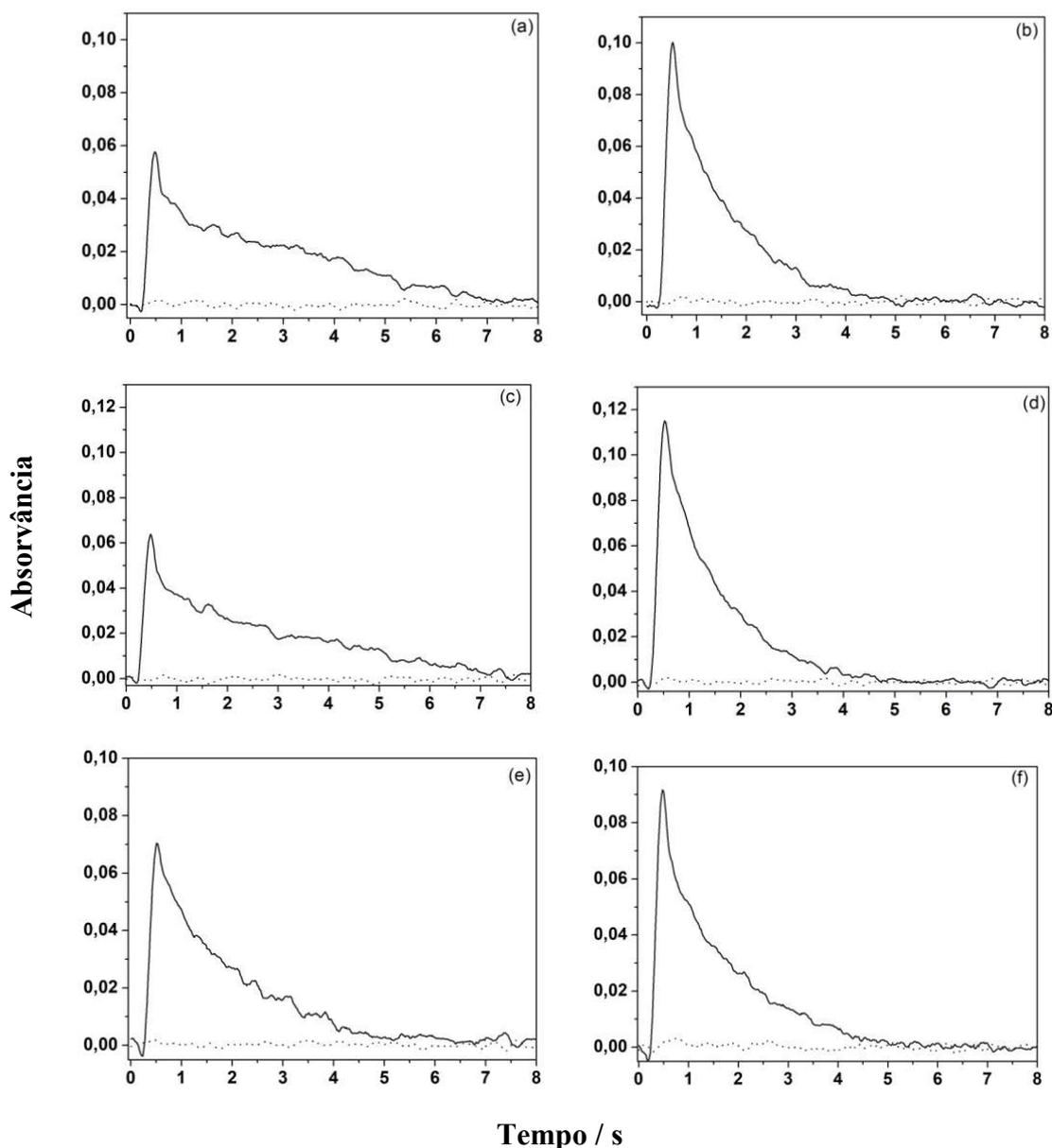


Figura 11. Perfis de absorvância de Hg a partir de uma solução contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg com temperatura de atomização (a) $500 \text{ }^\circ\text{C}$ e (b) $600 \text{ }^\circ\text{C}$ em 10% (v/v) ácido acético; (c) $500 \text{ }^\circ\text{C}$ e (d) $600 \text{ }^\circ\text{C}$ em 10% (v/v) ácido fórmico; (e) $500 \text{ }^\circ\text{C}$ e (f) $600 \text{ }^\circ\text{C}$ em 10% *n*-propanol. Sinal analítico (—) e sinal de fundo (⋯). Condições experimentais: $250 \mu\text{g Au}$ como modificador permanente; vazão da solução $2,7\text{-}3,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 100 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.1.3 Linearidade e pré-concentração

A massa máxima de Hg que poderia ser pré-concentrada na superfície do tubo de grafite, pela retenção do vapor de Hg pelo Au, foi investigada. Para isso, diferentes volumes de uma solução de $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg foram inseridos no reator fotoquímico e o

Hg⁰ gerado foi coletado na superfície do tubo de grafite. Uma relação linear positiva entre o volume de solução padrão e o sinal analítico ($R = 0,9941$) foi obtida até 5 mL, correspondente a 40 ng Hg (Figura 12). Volumes maiores de solução foram evitados, pois vapor de água era carregado junto com o vapor do analito através da linha de transferência e poderia atingir o atomizador. Este problema poderia ser contornado com o uso de um GLS maior, mas isto não foi investigado neste trabalho.

5.1.4 Preparo de amostra

Compostos orgânicos são preferencialmente selecionados para o preparo de amostra na PVG ao invés de ácidos inorgânicos, como o HNO₃ e HCl, uma vez que, além de solubilizar as amostras, os mesmos podem atuar como precursores das espécies redutoras, enquanto que a presença dos íons H⁺, Cl⁻ e NO₃⁻ causa a supressão da PVG do Hg^{47,71}. A geração fotoquímica de vapor do Hg foi obtida a partir de diversos tipos de amostras, solubilizadas ou diluídas em ácido fórmico, e também a partir de amostras solubilizadas com TMAH⁴³.

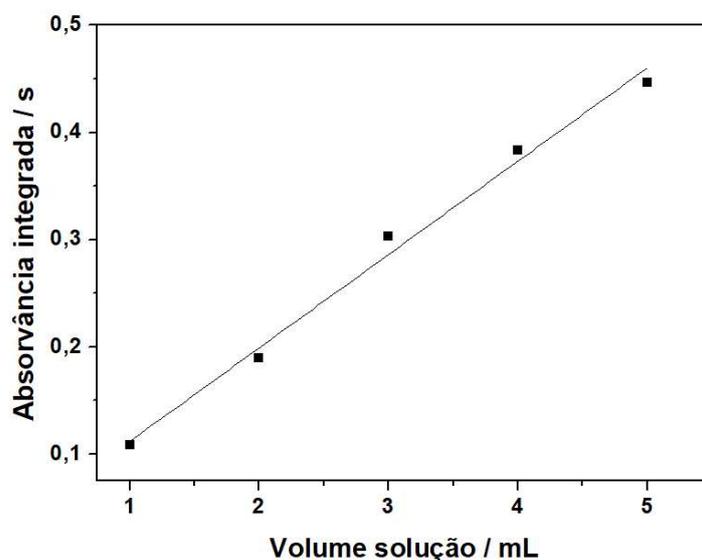


Figura 12. Efeito do volume de solução na absorvância integrada de Hg ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em 10% (v/v) *n*-propanol). Condições experimentais: vazão da solução $3,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 100^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 600^\circ\text{C}$; modificador permanente $250 \mu\text{g Au}$.

No presente trabalho, duas abordagens foram investigadas como preparo de amostra utilizando CRM. A primeira consistiu na solubilização das amostras em ácido fórmico por 8 h em um banho a 50°C . Em seguida, as amostras foram diluídas para uma

concentração final de 10% (v/v) de ácido fórmico. Com este procedimento, as soluções dos CRM resultantes eram escuras e os valores encontrados não concordaram com os valores certificados. O mesmo foi observado por Vieira *et al.*⁴³, que atribuíram este resultado à baixa penetração da radiação UV nas soluções escuras geradas com ácido fórmico. Os autores solucionaram este problema após um aumento no tempo de irradiação total (108 s, 9 mL de amostra, vazão de 5 mL min⁻¹) da solução contendo a amostra. No presente trabalho, o aumento do tempo de irradiação (120 s, 2 mL amostra, vazão de 1,0 mL min⁻¹) não resultou em aumento da sensibilidade. É possível que outros fatores, como a diluição da amostra (duas vezes mais concentrada neste trabalho), vazão da amostra e espessura do percurso analítico, tenham exercido maior influência sobre a PVG. Similarmente, Liu *et al.*⁵⁷ observaram que soluções escuras de amostras biológicas solubilizadas com ácido fórmico levaram a resultados analíticos insatisfatórios devido à baixa penetração da radiação UV, utilizando calibração externa com PVG-ICP-MS, o que foi solucionado empregando diluição isotópica.

O uso do TMAH foi investigado no segundo procedimento, conforme descrito no Item 4.4.1, porém sem a adição do *n*-propanol. A análise utilizando somente TMAH resultou em uma baixa recuperação do valor certificado (62%). Visando aumentar a sensibilidade, após a solubilização das amostras com TMAH, 10% (v/v) de ácido acético ou *n*-propanol foi adicionado à solução. Observou-se que a adição de *n*-propanol, como LMWC, resultou em um aumento da absorvância integrada de cerca de 30% em relação à adição de somente TMAH, enquanto que a adição de ácido acético levou à formação de precipitados na solução. Assim, a concentração final de TMAH e *n*-propanol nas amostras e nas soluções padrões foram 2,5% (v/v) e 10% (v/v), respectivamente. Neste segundo procedimento, são necessárias 3 h, em contraste com às 8 h requeridas no primeiro.

5.1.5 Parâmetros de mérito

Diversos autores reportaram a PVG de Hg a partir de espécies orgânicas de Hg, como metilmercúrio e etilmercúrio, evidenciando que a própria PVG é capaz de liberar Hg de ligações do tipo Hg-C^{43,54,60,61}. Portanto, é possível estabelecer uma curva analítica somente a partir de soluções padrão de Hg²⁺ para a determinação de Hg total em amostras biológicas, empregando a PVG.

Os parâmetros de mérito foram estabelecidos por meio da curva de calibração construída na faixa de concentração de 2,5 a 15,0 µg L⁻¹ Hg (correspondente a 5,0-30,0

ng Hg) utilizando 2,5% (m/v) TMAH e 10% (v/v) *n*-propanol nas condições otimizadas. A solução branco foi preparada e medida nas mesmas condições. Os parâmetros de mérito, calculados conforme descrito no Item 4.6, estão resumidos na Tabela VIII. Para estimar o LD e o LQ do método, a massa de amostra usada no preparo (0,10 g) e o volume final de 10 mL foram levados em consideração.

A massa característica obtida foi menor do que aquela encontrada por Jesus *et al.*⁶⁰ (0,6 ng), utilizando PVG-GF AAS com Pd como modificador químico. O LD do método para a determinação de Hg em amostras de peixe foi similar ao reportado por López-Rouco *et al.*⁵³, em que um sistema em batelada, combinando radiação UV e ultrassom acoplado à AAS, foi empregado na geração de vapor de Hg e apresentou valor superior (menos sensível) ao obtido com ID-PVG-ICP-MS por Liu *et al.*⁵⁷ (0,5 pg g⁻¹). Vieira *et al.*⁴³ obtiveram melhor LQ do método por PVG-QTA AAS, pois introduziram alíquotas de 9,0 mL de amostra no reator. O LQ obtido está de acordo com os valores máximos de Hg permitidos em peixe pela legislação brasileira (1,0 µg g⁻¹ peixes predatórios e 0,5 µg g⁻¹ peixes não-predatórios)⁸¹. Estes limites poderiam ser melhorados aumentando a alíquota de amostra analisada, o que reforça a versatilidade de acoplar um

Tabela VIII. Parâmetros de mérito para a determinação de Hg em peixe por PVG-GF AAS. Condições experimentais: 2,5% (v/v) TMAH e 10% (v/v) *n*-propanol

Parâmetro	Resposta
Regressão linear	$A_{\text{int}} = 0,00469 + 0,01168m$
R	0,9996
m_0 / ng	0,36
LD / ng	0,52
LQ / ng	1,7
LD ^a / µg g ⁻¹	0,030
LQ ^a / µg g ⁻¹	0,10

^aLD e LQ do método foram calculados considerando uma massa de 0,1 g amostra e um volume final de 10 mL.

sistema de geração de vapor com GF AAS. O número de ciclos de atomização por recobrimento e o tempo de vida do tubo de grafite foram de, aproximadamente, 80 e 500,

respectivamente. Número semelhante de ciclos de queima (n=70) foi obtido por Flores *et al.*³⁶ com 250 µg de Au. A exatidão e a precisão do método serão apresentadas na Tabela IX no Item 5.1.7.

5.1.6 Eficiência da geração fotoquímica de vapor

As eficiências conjuntas da geração fotoquímica de vapor, do GLS, do transporte e da coleta das espécies voláteis pelo modificador no forno de grafite definem a eficiência total do método de PVG²⁶. Esta foi estimada pela comparação da sensibilidade obtida pela PVG com aquela obtida pela geração de vapor frio CV-GF AAS ($A_{int} = 0,0075 + 0,01379m$, $R = 0,9983$), baseada na redução do Hg com solução de NaBH₄. As condições empregadas de temperatura de coleta e atomização e massa de modificador foram as mesmas nos dois sistemas. Considerando a eficiência da CV-GF AAS como 100%, a PVG apresentou uma eficiência de 85%. Esta eficiência é superior à encontrada por Gao *et al.*⁸², correspondente a 65% utilizando PVG-AFS, e menor do que a eficiência de 95% obtida por Vieira *et al.*⁴³ com PVG-QTA AAS.

5.1.7 Resultados analíticos

A exatidão do método proposto foi avaliada pela análise de três materiais de referência certificados e duas amostras candidatas a materiais de referência (atum e músculo de peixe). Duas amostras de pescado (merluza e sardinha) foram analisadas posteriormente. Todas as amostras, CRM e candidatas a materiais de referência foram tratados com TMAH e receberam adição de *n*-propanol no final, conforme descrito no Item 5.1.4. Os resultados descritos na Tabela IX para os CRM e para os candidatos a material de referência estão de acordo com os valores certificados e de referência, com 95% de intervalo de confiança (teste t-Student). Entretanto, não foi possível quantificar Hg no CRM TORT-2 nestas condições, provavelmente devido à opacidade da solução, que reduziu a penetração da radiação UV e, logo, a radiação disponível para a geração de radicais. Para superar esta limitação, algumas abordagens foram investigadas.

Primeiramente, um maior tempo de exposição à radiação UV (vazão da amostra 1 mL min⁻¹) foi aplicado, mas sem êxito. A seguir, um volume maior de amostra foi injetado com a intenção de pré-concentrar uma massa maior de analito no forno de grafite, mas os resultados analíticos continuaram abaixo do limite de detecção. Após, foi investigada a adição de diferentes volumes de H₂O₂ (0,4; 1,5 e 3,0 mL, correspondente a 0,6; 2,2 e 5,0 mol L⁻¹) com a intuito de oxidar a matéria orgânica remanescente e, assim,

remover a coloração da solução da amostra. De fato, após a adição de 3,0 mL de H₂O₂ e agitação manual por aproximadamente 1 min, observou-se uma redução na coloração escura. Além disso, é relatado na literatura que quando o H₂O₂ é exposto à radiação UV, ocorre a formação de radicais $\cdot\text{OH}$ que assistem a fotorredução do Hg⁴². Finalmente, com a adição de 3,0 mL de H₂O₂, o valor encontrado estava de acordo com o valor certificado. Destaca-se que a medida do Hg foi realizada logo após a adição de H₂O₂, pois uma redução do sinal de absorvância foi observada após um tempo maior que 10 min. Durante estes 10 min, se necessário, poderiam ser realizadas quatro medidas sucessivas da mesma replicata da amostra com um desvio padrão relativo (RSD) menor do que 10%, indicando que esta permanece estável por um tempo apropriado para a análise. Embora este procedimento tenha funcionado para a determinação de Hg no TORT-2, deve ser ressaltado que esta etapa é crítica, pois o tempo disponível para a análise provavelmente irá mudar de acordo com a quantidade e a composição da amostra. Assim, investigações adicionais sobre o comportamento de diferentes amostras na presença de H₂O₂ são necessárias. No entanto, dentre todas as amostras analisadas neste trabalho, este procedimento foi necessário somente para o TORT-2, devido à coloração da solução.

Tabela IX. Concentração de Hg em CRM e amostras de peixe por PVG-GF AAS. As concentrações são expressas como média \pm desvio padrão (n = 3)

Amostra	Valor certificado / $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor de referência / $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor encontrado / $\mu\text{g g}^{-1}$	RSD / %
DOLT-4	2,58 \pm 0,22	-	2,58 \pm 0,06	2
BCR 463	2,85 \pm 0,16	-	3,11 \pm 0,13	4
TORT-2	0,27 \pm 0,06	-	0,31 \pm 0,05	16
Músculo de peixe ^a	-	1,03 \pm 0,26	1,05 \pm 0,08	8
Atum ^b	-	3,03 \pm 0,22	3,17 \pm 0,08	2
Merluza ^c	-	0,56 \pm 0,01	0,61 \pm 0,02	3
Sardinha	-	NA	0,31 \pm 0,02	6

^aEnsaio colaborativo LANAGRO; ^breferência83; ^creferência84, NA: amostra não analisada por métodos comparativos

O desvio padrão relativo de cada amostra (n=3) variou entre 2,0 a 16%. TORT-2 apresentou o maior RSD, possivelmente devido à baixa concentração de analito e à maior complexidade deste CRM.

Adicionalmente, considerando que o preparo de amostra empregado neste trabalho provavelmente não converteu todos os compostos orgânicos de Hg em espécies inorgânicas, é possível concluir que, como mencionado anteriormente, espécies voláteis de Hg podem ser eficientemente geradas a partir de compostos orgânicos de Hg pela irradiação UV. Isto é evidenciado pela alta concentração de CH_3Hg^+ nos CRM analisados ($1,33 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$, $3,04 \pm 0,16 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,15 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ para DOLT-4, BCR 463 e TORT-2, respectivamente).

Entre as três amostras de peixe analisadas, somente a sardinha apresentou concentração de Hg abaixo do valor máximo permitido em peixes pela legislação brasileira (Tabela IX).

5.2 SELÊNIO

5.2.1 Otimização das condições de geração de hidreto de Se acoplada à GF AAS

Os experimentos de HG foram conduzidos com o sistema descrito no Item 4.5.2 (Figura 4). As otimizações da HG foram realizadas com soluções padrão de 1,0 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV) e Se (VI), injetada por 30 s, com uma vazão de 4,0 mL min^{-1} , resultando na introdução de 2 e 6 ng de Se, respectivamente.

5.2.1.1 Efeito da concentração de ácido e de reagente redutor

As concentrações de HCl e NaBH_4 são variáveis determinantes na eficiência da geração dos hidretos. O efeito da concentração de HCl sobre a HG foi avaliada no intervalo de concentração entre 0,5 e 8 mol L^{-1} utilizando uma solução padrão de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV) e Se (VI) separadamente. Para isso, diferentes volumes de HCl foram adicionados às soluções padrão de Se (IV) e Se (VI), previamente à etapa de pré-redução descrita no Item 4.4.2, resultando nas concentrações avaliadas. Como pode ser visto na Figura 13, o sinal analítico do Se (IV) permaneceu constante na faixa de concentração estudada, com exceção de um aumento de 13% com 4 mol L^{-1} de HCl. Em relação ao Se (VI), concentrações de HCl maiores que 5 mol L^{-1} foram necessárias para a conversão quantitativa deste em Se (IV). A concentração de 6 mol L^{-1} de HCl foi selecionada para

os próximos experimentos, pois resultou em geração de SeH_2 equivalente à solução de Se (IV). A concentração de HCl na solução carreadora foi mantida em 3 mol L^{-1} .

Em relação ao efeito da concentração de NaBH_4 na HG de Se, foram avaliadas concentrações no intervalo entre 0,1 a 1,0% (m/v), mantendo-se constante a concentração de KOH 0,3% (m/v) adicionado para estabilizar as soluções. Como mostrado na Figura 14, foi verificado um aumento do sinal analítico com o aumento da concentração de NaBH_4 , permanecendo praticamente constante em concentrações maiores do que 0,3% (m/v). Para garantir a conversão do analito em SeH_2 , soluções contendo 0,5% (m/v) de NaBH_4 foram adotadas nos estudos seguintes.

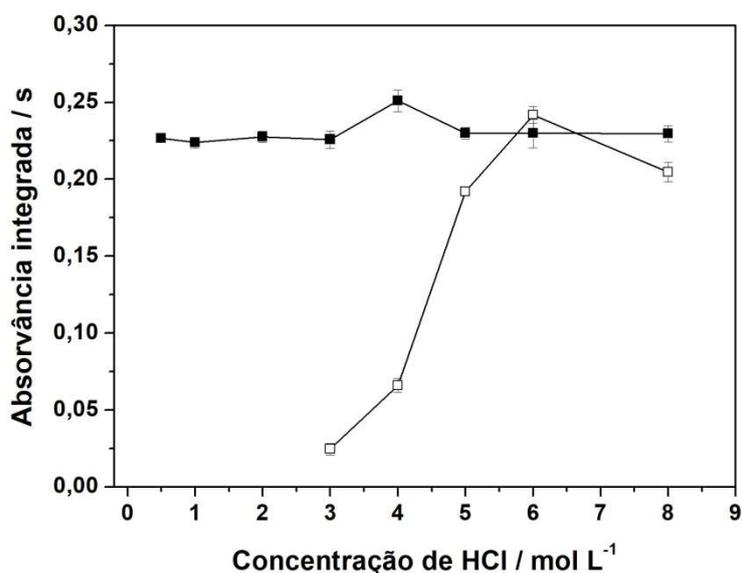


Figura 13. Efeito da concentração de HCl na absorvância integrada de uma solução padrão de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV) (■) e Se (VI) (□). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 110 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

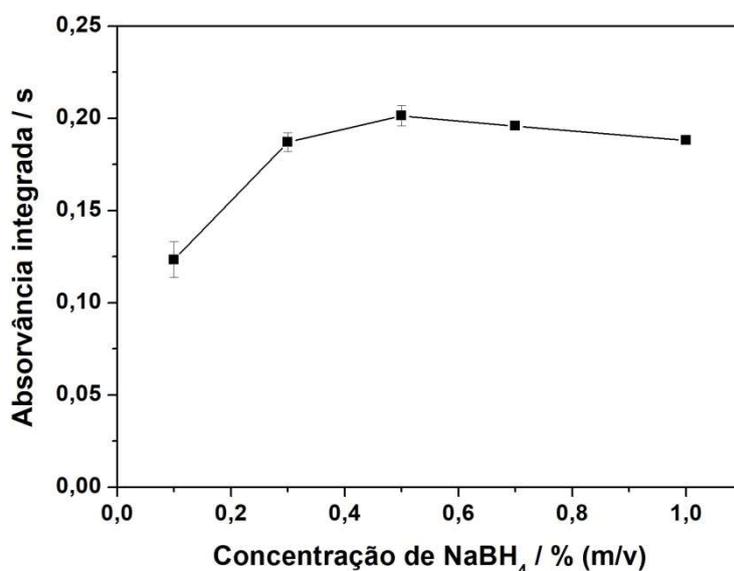


Figura 14. Efeito da concentração de agente redutor (NaBH₄) na absorvância integrada de Se (IV) (1,0 µg L⁻¹). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução de NaBH₄ 2,0 mL min⁻¹; vazão de Ar 110 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

5.2.1.2 Efeito da vazão de argônio

Argônio foi empregado como gás de arraste na separação do SeH₂ da solução no GLS e no transporte deste até o tubo de grafite. Na Figura 15, é apresentado o efeito da vazão de Ar sobre a HG de Se. Observou-se um aumento da absorvância integrada quando a vazão aumentou de 110 para 125 mL min⁻¹ de Ar e, em vazões maiores, o sinal diminuiu e permaneceu praticamente constante até 210 mL min⁻¹. Vazões de Ar menores que 110 mL min⁻¹ não foram avaliadas, pois, nestas condições, observou-se que a solução entrava pelo capilar que conduzia Ar. Escolheu-se a vazão de 125 mL min⁻¹ de Ar devido à maior sensibilidade, menor desvio padrão e menor consumo de Ar.

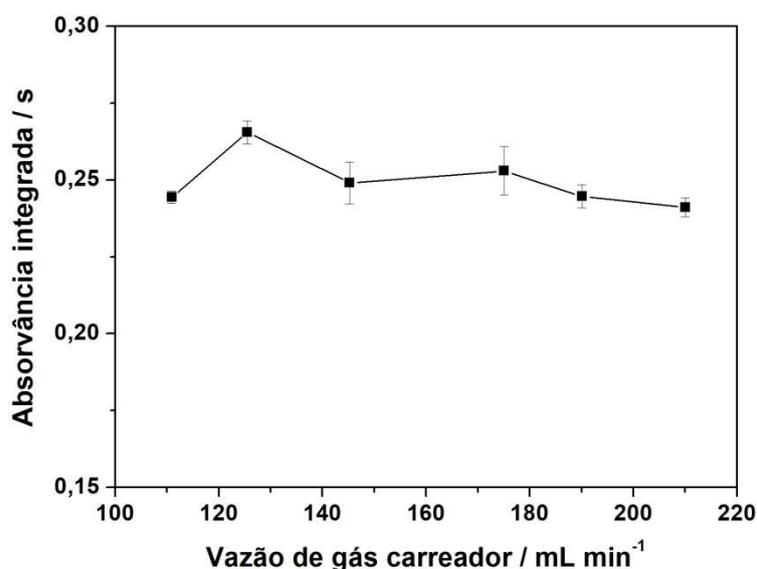


Figura 15. Efeito da vazão de argônio na absorvância integrada de Se (IV) ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; T_{col} $300 \text{ }^\circ\text{C}$; T_{at} $2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

5.2.1.3 Programa de temperatura

Dentre os modificadores permanentes, o Ir é frequentemente empregado na coleta de SeH_2 na superfície do tubo de grafite^{22,39}. Assim, neste trabalho, Ir foi selecionado como modificador permanente. A massa de $120 \mu\text{g}$ de Ir utilizada por Tyson *et al.*⁴⁰ foi adotada no presente trabalho para o recobrimento da plataforma integrada do tubo de grafite.

Na etapa de coleta dos hidretos sobre a plataforma do tubo de grafite recoberta com Ir, a faixa de temperatura investigada variou entre 100 e $500 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 16). A maior sensibilidade e menor desvio padrão entre as medidas foi obtida com a temperatura de $300 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura esta adotada.

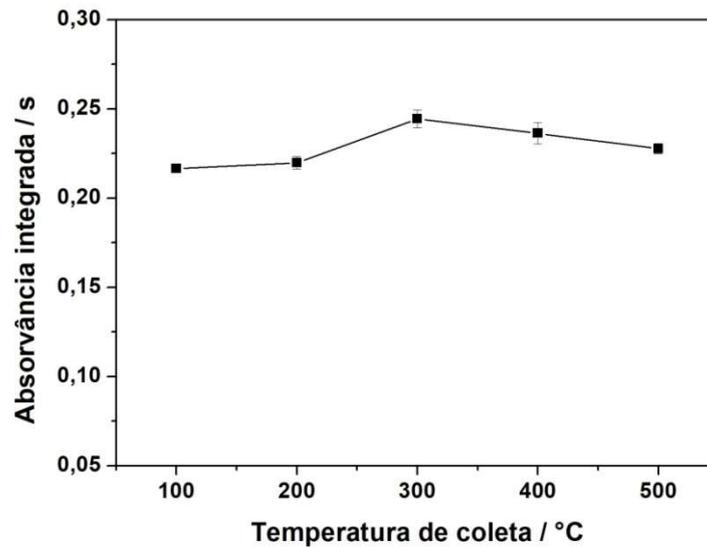


Figura 16. Curva de temperatura de coleta de SeH_2 a partir de uma solução analítica de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} ; T_{at} $2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

Quanto à temperatura de atomização, pode-se observar na Figura 17 que o sinal analítico foi crescente até $2200 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura máxima permitida pelo *software* do equipamento), sendo esta a temperatura selecionada para atomização. Na Figura 18 é apresentado o perfil do sinal de absorção obtido a partir de uma solução analítica de Se (IV) e do fundo, com o emprego das condições otimizadas. A mesma temperatura de coleta foi selecionada por Schneider *et al.*³⁹ para a coleta SeH_2 em um tubo de grafite sem plataforma e recoberto com $200 \mu\text{g Ir}$, utilizando HG-GF AAS, porém maior sensibilidade foi obtida com uma temperatura de atomização de $2000 \text{ }^\circ\text{C}$.

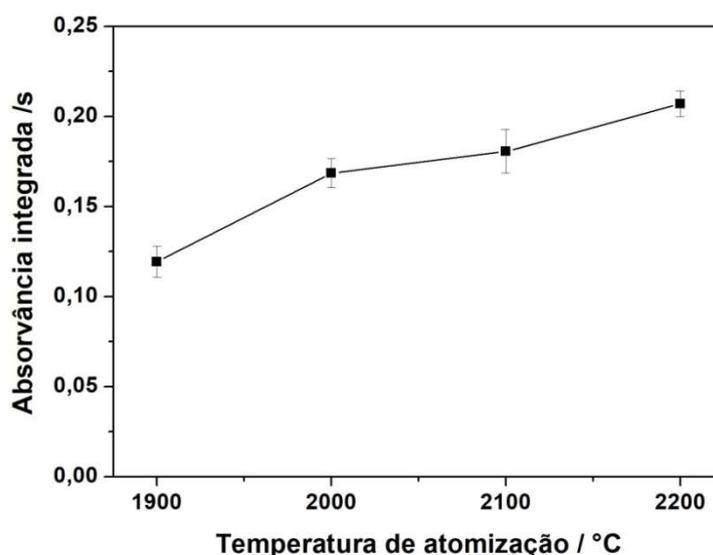


Figura 17. Curva de temperatura de atomização de SeH_2 a partir de uma solução analítica de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da solução de $0,5\%$ (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

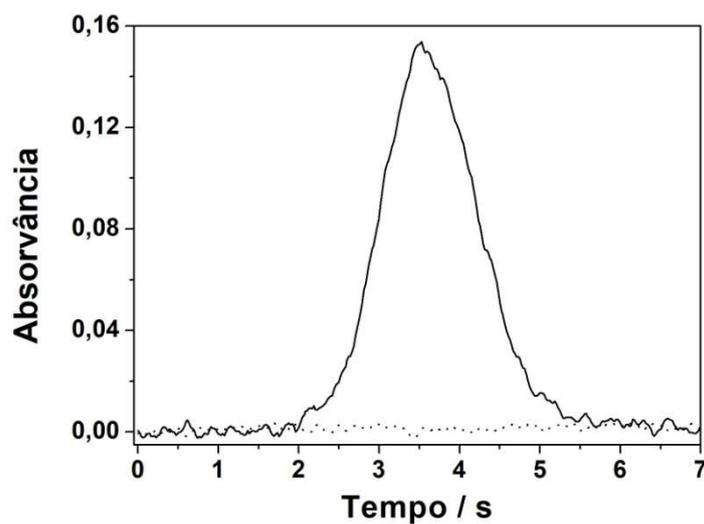


Figura 18. Perfil de absorvância de Se obtido a partir de uma solução analítica de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV). Sinal analítico (—) e sinal de fundo (⋯). Condições experimentais: $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2200 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$; vazão da solução de $0,5\%$ (m/v) de NaBH_4 $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 125 mL min^{-1} .

5.2.1.4 Preparo de amostra

Três procedimentos de preparo de amostra foram investigados para a determinação de Se em amostras de água de coco. A escolha do procedimento de preparo de amostra foi baseada na recuperação do padrão adicionado. As amostras foram fortificadas com 30 ng de Se (IV) para resultar em uma concentração final de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$, e em seguida submetidas às mesmas etapas de preparo.

Como a determinação de Se por HG requer que o analito esteja presente no estado de oxidação (IV), após cada procedimento, as amostras foram avolumadas com HCl para resultar em uma concentração final de 6 mol L^{-1} , (de acordo com o resultado apresentado no Item 5.2.1.1), e em seguida aquecidas a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min a fim de reduzir as espécies de Se (VI) a Se (IV).

Em testes preliminares, visando o mínimo preparo, as amostras foram diluídas com HCl 6 mol L^{-1} e, posteriormente, submetidas à etapa de pré-redução. Entretanto, quando as amostras foram aquecidas, houve aglomeração de material particulado tornando a solução turva, e inviabilizando a análise. O mesmo foi observado por Welna e Szymczycha-Madeja⁶⁸, quando amostras de suco de fruta foram submetidas a etapa de pré-redução do Se (VI) com HCl 6 mol L^{-1} sob aquecimento.

O segundo procedimento investigado foi adaptado de Welna e Szymczycha-Madeja⁶⁸, que consistiu na solubilização das amostras com água-régia (3 HCl:1 HNO₃). Aliquotas de 5 mL de água de coco foram acrescidas de 2 mL de água-régia e mantidas em banho a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de pré-redução. Com este procedimento, a recuperação de Se (IV) obtida foi de 70 a 73%.

O terceiro procedimento investigado foi baseado no método recomendado para digestão de materiais biológicos pelo fabricante do forno de micro-ondas, no qual 1,0 mL de água de coco foi transferido para um frasco de PTFE, seguida da adição de 3,0 mL de HNO₃ e 1 mL H₂O₂ e submetidas ao programa de aquecimento descrito na Tabela I. As amostras foram pré-reduzidas ao final. As recuperações obtidas por este procedimento foram superiores aos demais procedimentos (92-94%). Portanto, este procedimento foi selecionado para o preparo de amostras por resultar em melhores recuperações.

Como o ambiente químico da amostra digerida é diferente daquele da solução padrão, o efeito da concentração de HCl e de NaBH₄ na HG de Se (VI) foi investigado em amostras digeridas e fortificadas (concentração final de Se (VI) igual a $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Além do ambiente químico, a presença de metais de transição oriundos da amostra pode

causar interferência na geração e liberação do hidreto da fase líquida, o que poderia ser minimizado pela otimização da concentração de HCl e do agente redutor⁸⁵.

Na Figura 19, observa-se que, diferentemente da otimização realizada com a solução padrão de Se (VI) (Figura 13), 4 mol L⁻¹ HCl foi suficiente para obter uma recuperação equivalente a 87% em relação a solução padrão de Se (IV). A concentração de 6 mol L⁻¹ HCl foi escolhida pois resultou em maior recuperação (93%) comparada à solução padrão de Se (IV). Quanto à concentração de NaBH₄, nota-se um comportamento semelhante ao observado durante a otimização com a solução padrão de Se (IV) (Figura 14), em que 0,5% (m/v) NaBH₄ resultou em maior sinal analítico para a amostra (Figura 20).

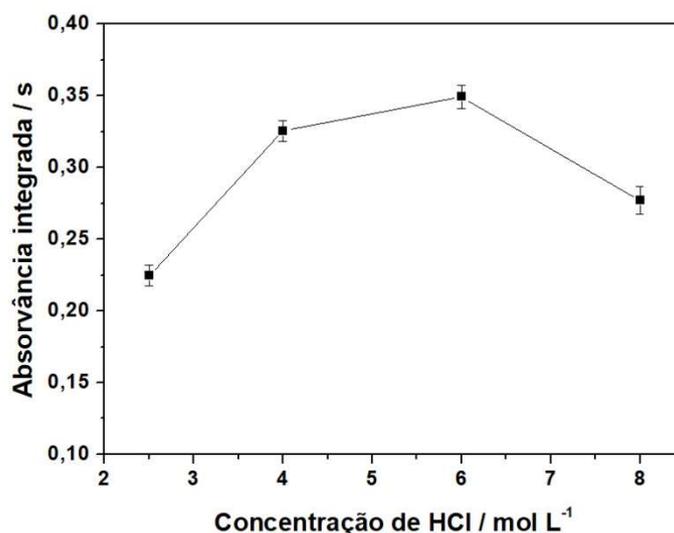


Figura 19. Efeito da concentração de HCl na absorvância integrada de uma amostra de água de coco fortificada com Se (VI) (concentração final 3,0 µg L⁻¹), após digestão em forno de micro-ondas. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=2). Condições experimentais: vazão da solução de 0,5% (m/v) de NaBH₄ 2,0 mL min⁻¹; vazão de Ar 125 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

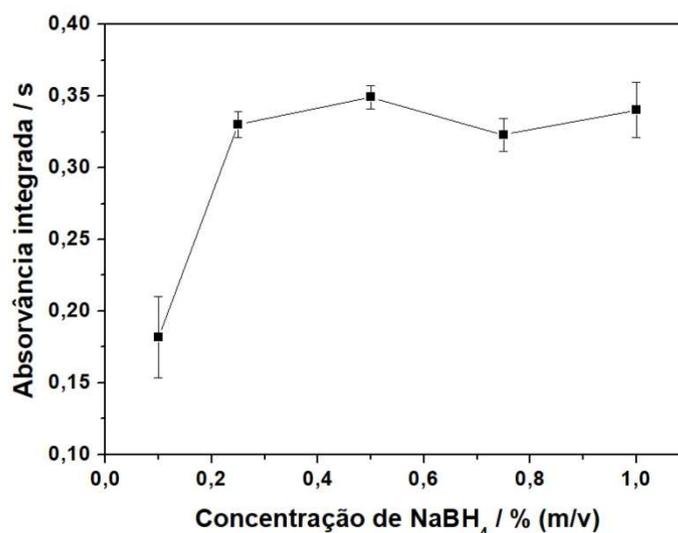


Figura 20. Efeito da concentração de NaBH₄ na absorvância integrada de uma amostra de água de coco fortificada com Se (VI) (concentração final 3,0 µg L⁻¹), após digestão em forno de micro-ondas. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=2). Condições experimentais: vazão da solução de NaBH₄ 2,0 mL min⁻¹; vazão de Ar 125 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

5.2.1.5 Parâmetros de mérito

Após a otimização das condições experimentais relacionadas à geração de vapor, e a pré-concentração e atomização do hidreto, foi construída uma curva de calibração para a obtenção dos parâmetros de mérito (Tabela X). A curva de calibração foi estabelecida na faixa de concentração de 0,5 a 4,0 µg L⁻¹ (1,0 a 8,0 ng) de Se (IV) utilizando 6 mol L⁻¹ HCl. A massa característica encontrada (51 pg) foi melhor do que valores obtidos por HG-GF AAS (95 pg)⁸⁶ e por GF AAS (80 pg)⁸⁷ reportados na literatura. O LD do método foi semelhante aos encontrados por Welna e Szymczycha-Madeja⁶⁸ para Se (IV) (0,67 µg L⁻¹) e Se (VI) (0,73 µg L⁻¹) em amostras de suco de fruta por HG-ICP OES. Nas condições de trabalho utilizadas, a plataforma era recoberta com Ir a cada 500 ciclos de análise. A exatidão e a precisão do método serão apresentadas na Tabela XI no Item 5.2.1.6.

Tabela X. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por HG-GF AAS

Parâmetro	Resposta
Regressão linear	$A_{int} = 0,01982 + 0,08654m$
R	0,9991
m_0 / pg	51
LD / ng	0,15
LQ / ng	0,50
LD ^a / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,73
LQ ^a / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,4

^aLD e LQ do método foram calculados considerando 1 mL de amostra e o volume final da solução (10 mL)

5.2.1.6 Resultados analíticos

Devido à inexistência de material de referência certificado de água de coco, a exatidão do método foi avaliada pela análise de um material de referência certificado de leite em pó (Non-fat milk powder, NIST 1549) e por testes de recuperação; e a precisão através do RSD.

O selênio ocorre em diversas formas de compostos orgânicos em matrizes biológicas. Por isso, além das espécies de Se inorgânico, os testes de recuperação também foram conduzidos com um composto orgânico de Se, representado pela selenometionina (SeMet).

Assim, o teste de recuperação foi empregado com o intuito de avaliar: (i) possíveis perdas do analito durante as etapas de preparo de amostra e pré-redução, (ii) a conversão do Se (VI) a Se (IV) pela etapa de pré-redução e (iii) a decomposição de um composto orgânico de Se pela digestão. Para os testes de recuperação, em alíquotas de amostra distintas, foram adicionados 30 ng de padrão para resultar em $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV), Se (VI) e SeMet.

Foram analisadas quatro amostras de água de coco, três delas comercializadas em embalagens Tetra Pak e uma amostra de água de coco *in natura*. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XI.

Tabela XI. Concentração de Se em amostras de água de coco obtida por HG-GF AAS e teste de recuperação. Nos testes de recuperação a concentração final de Se nas amostras fortificadas foi 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As concentrações estão expressas como média \pm desvio padrão combinado (n=3)

Amostra	Concentração de Se encontrada / $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação / %		
		Se (IV)	Se (VI)	SeMet
1	< LD	107 \pm 9	111 \pm 5	92 \pm 4
2	4,00 \pm 0,58	93 \pm 6	91 \pm 5	90 \pm 3
3	< LD	92 \pm 3	89 \pm 7	91 \pm 4
4	3,00 \pm 0,14	94 \pm 2	107 \pm 4	89 \pm 3

Os valores de Se determinados nas amostras de água de coco diferiram dos valores reportados na literatura. Oliveira *et al.*⁸⁸ obtiveram concentrações entre 7,0 e 22,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se em águas de coco por GF AAS, que foram similares aos encontrados por Aleixo *et al.*⁸⁹ (6,5 a 21,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) também por GF AAS. As concentrações de Se em águas de coco foram menores do que o LD obtido por Virgilio *et al.*⁹⁰ (< 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) e por Sousa *et al.*⁹¹ (< 13 $\mu\text{g L}^{-1}$) utilizando ICP OES. É possível que as diferenças de concentração de Se em água de coco encontradas neste trabalho e as reportadas na literatura resultem de variações naturais, tais como tipo de solo e clima em que as plantas são cultivadas e nível de maturação do fruto na época da colheita.

O valor encontrado para o CRM de leite em pó (0,10 \pm 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$) não diferiu significativamente do valor certificado (0,11 \pm 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$) para um nível de confiança de 95% (teste t-Student, n =3).

É importante considerar que o teste de recuperação só é válido se o (i) analito originalmente presente na amostra e o analito adicionado se encontram na mesma forma, ou (ii) quando o efeito de espécie é eliminado pela conversão completa do analito presente na amostra para a mesma forma do analito adicionado⁹². O teste de recuperação forneceu resultados aceitáveis, segundo critério recomendado pela Associação da Comunidade Analítica (AOAC Internacional)⁹³, para as três espécies de Se avaliadas, demonstrando a eficiente conversão das espécies de Se orgânico (SeMet) e inorgânico Se

(VI) pelas etapas de preparo de amostra e pré-redução a Se (IV). O RSD de cada amostra (n=3) variou entre 1 e 15%.

5.2.2 Análise direta de Se em água de coco por GF AAS

A fim de corroborar a exatidão do método de HG, procedeu-se à determinação de Se por GF AAS com análise direta de água de coco. Neste estudo, foram utilizadas soluções padrão de Se (IV).

As temperaturas de pirólise e atomização foram otimizadas utilizando 20 μL de uma solução padrão de 38 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se (0,76 ng) e 120 μg Ir como modificador permanente (Figura 21). As temperaturas de pirólise e de atomização escolhidas foram 1400 $^{\circ}\text{C}$ e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, pois estas proporcionaram maior sensibilidade e menores desvios padrão entre as medidas.

A seguir, foi construída uma curva de calibração utilizando seis soluções padrão na faixa de 20-60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (equivalente a uma faixa de 0,4-1,2 ng) nas condições de temperatura otimizadas. Os parâmetros de mérito, calculados conforme descrito no Item 4.6, estão apresentados na Tabela XII. A massa característica obtida está de acordo com

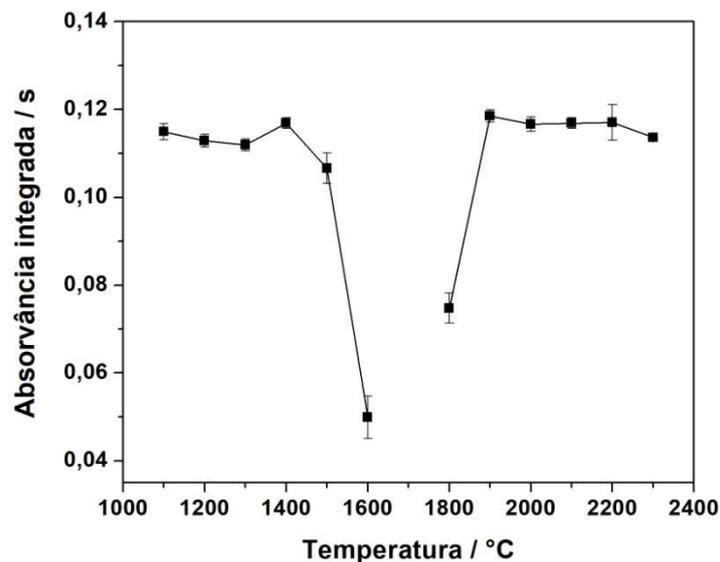


Figura 21. Curvas de temperatura de pirólise e atomização utilizando uma solução padrão de 38 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: volume injetado 20 μL ; T_{at} empregada durante a otimização da T_{pir} 2000 $^{\circ}\text{C}$; T_{pir} empregada durante a otimização da T_{at} 1400 $^{\circ}\text{C}$; modificador permanente 120 μg Ir.

àquela (34 pg) fornecida pelo fabricante do equipamento e menor do que a obtida por Ieggli *et al.*⁸⁷ (80 pg).

Tabela XII. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por GF AAS com lâmpada de deutério como corretor de fundo

Regressão linear	R	LD / ng	LQ / ng	m ₀ / pg
$A_{int} = 0,0002 + 0,1184m$	0,9998	0,044	0,15	28

No entanto, ao se proceder às mesmas otimizações do programa de temperatura utilizando uma amostra de água de coco não diluída, foi observada uma inflexão do sinal de absorvância para valores negativos, ocasionada por uma sobrecorreção pelo sistema de correção de fundo (lâmpada de deutério) (Figura 22). Como pode se observar na Figura 22, após uma diluição de cinco vezes da amostra com HNO₃ 1% (v/v), o sinal de absorvância do fundo reduziu proporcionalmente ao fator de diluição, mas ainda

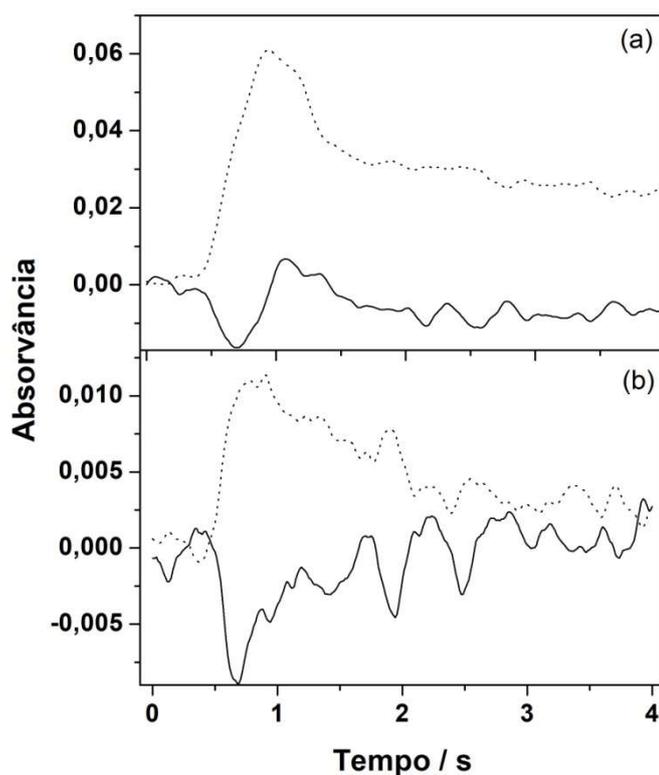


Figura 22. Perfis de absorvância da amostra de água de coco 2 não diluída (a) e diluída cinco vezes (b). Sinal analítico (—) e sinal de fundo (···). T_{pir} 1400 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 µg de Ir.

suficiente para causar um sinal de absorvância integrada negativo. Ressalta-se que com este fator de diluição (1:5), a concentração de Se na amostra 2 ($0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, correspondente a $0,016 \text{ ng Se}$) era menor que o LD.

As principais dificuldades reportadas na literatura na determinação de Se por GF AAS são relacionadas a perdas do analito, devido à sua baixa estabilidade térmica, e a interferências espectrais, por exemplo, aquelas causadas por fundo molecular estruturado de moléculas como PO e NO^{30} . Geralmente, o sistema de correção de fundo baseado em fonte contínua (lâmpada de deutério), dependendo da concentração do fundo, não é capaz de corrigir esse tipo de interferência espectral.

A partir destes resultados, investigou-se o uso do sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman para a realização desta análise. Foi estabelecida uma curva de calibração utilizando seis soluções padrão na faixa de 20 a $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (equivalente a uma faixa de $0,4$ a $1,6 \text{ ng}$). Os parâmetros de mérito estão apresentados na Tabela XIII. Observa-se que os parâmetros de mérito foram maiores que aqueles

Tabela XIII. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por GF AAS com sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman

Regressão linear	R	LD / ng	LQ / ng	m₀ / pg
$A_{\text{int}} = -0,00183 + 0,08138m(\text{ng})$	0,9974	0,10	0,34	60

atingidos com GF AAS com correção com lâmpada de deutério. Além disso, a massa característica obtida foi maior do que a fornecida pelo fabricante (34 pg).

Alíquotas de 10 , 20 , 30 e $40 \mu\text{L}$ da amostra 2 ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, Tabela XI) correspondentes a $0,04$; $0,08$; $0,12$ e $0,16 \text{ ng}$ de Se, respectivamente, foram introduzidas no forno de grafite (Figura 23). Essencialmente, o mesmo perfil de fundo visto anteriormente com a lâmpada de deutério, como sistema de correção, foi observado (Figura 23). Pode-se observar na Figura 23d que, mesmo após a injeção de $40 \mu\text{L}$, não foi observado sinal de Se na amostra de água de coco, possivelmente em razão da concentração de Se na amostra estar próxima ao LD e do elevado ruído. Além disso, o analito pode ter sido perdido juntamente com o material particulado liberado durante a etapa de pirólise. Para suportar esta hipótese, adicionou-se sacarose (55 g L^{-1} , conforme concentração de carboidrato descrita no rótulo da amostra de água de coco) à solução padrão de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se. Durante a etapa de pirólise, foi observada intensa liberação de

material particulado que resultou em perda do analito adicionado, pois não foi observado sinal de absorção do mesmo.

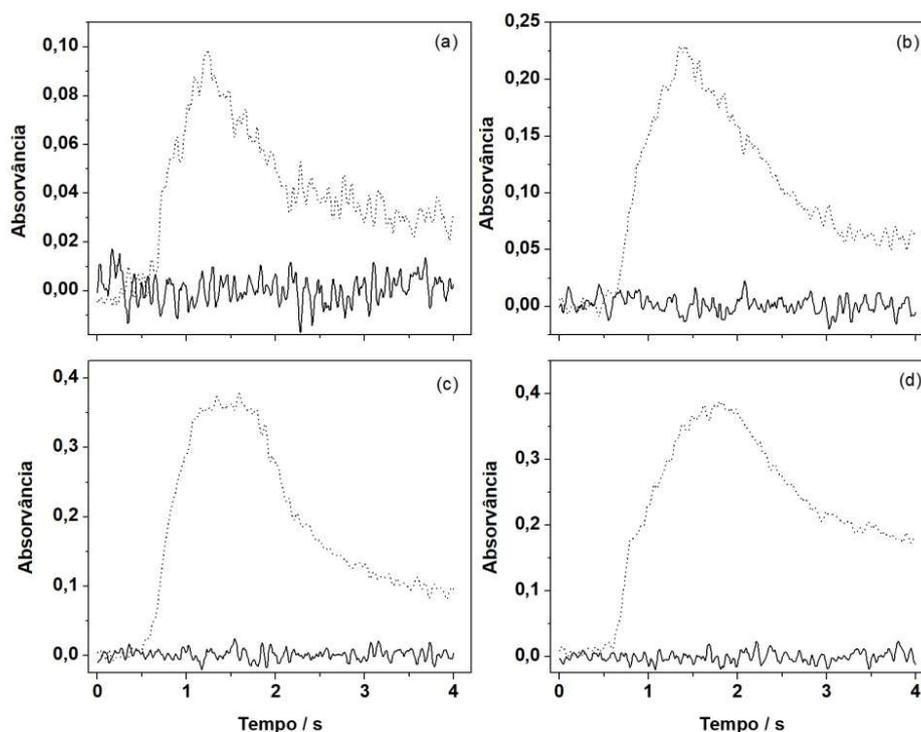


Figura 23. Perfis de absorvância da amostra de água de coco 2 utilizando GF AAS com efeito Zeeman como sistema de correção de fundo, obtidos com a introdução de alíquotas de (a) 10 μL , (b) 20 μL , (c) 30 μL e (d) 40 μL . Sinal analítico (—) e sinal de fundo (⋯). $T_{\text{pir}} 1400\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{at}} 2100\text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$.

Em uma segunda amostra (amostra 4 da Tabela XI), na qual o sinal de fundo era mais pronunciado, uma inflexão da linha de base foi observada com o aumento do volume de amostra injetado (Figura 24). Ressalta-se que a correção de fundo baseada no efeito Zeeman promove maior estabilidade da linha base do que a lâmpada de deutério, pois a altura do pico (e conseqüentemente a área) do fundo necessária para causar uma sobrecorreção é maior.

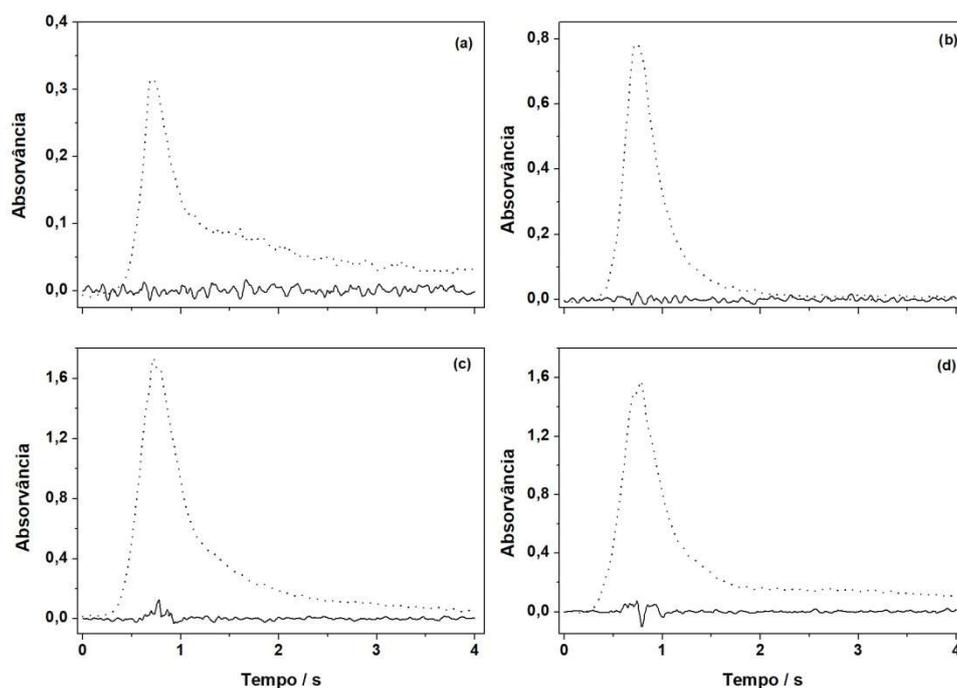


Figura 24. Perfis de absorvância da amostra de água de coco 4 utilizando GF AAS com sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman, obtidos com a introdução de alíquotas de (a) 10 μL , (b) 20 μL , (c) 30 μL e (d) 40 μL . Sinal analítico (—) e sinal de fundo (···); T_{pir} 1400 $^{\circ}\text{C}$; T_{at} 2100 $^{\circ}\text{C}$; modificador permanente 120 μg Ir.

Oliveira *et al.*⁸⁸ empregaram GF AAS com detecção multielementar simultânea e sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman na determinação de Se em amostras de água de coco. As medidas foram conduzidas com as amostras diluídas 5 vezes com uma solução de HNO_3 1% (v/v) e introduzidas em um forno de grafite recoberto com uma mistura de W e Rh como modificador permanente e, durante a etapa de pirólise (600 $^{\circ}\text{C}$ por 40 s), um fluxo de ar comprimido foi introduzido para evitar o depósito de resíduos carbonáceos remanescente de matrizes orgânicas. Ao realizarem teste de recuperação de padrão, os autores obtiveram recuperações entre 70-80%. No entanto, resultados mais exatos, próximos de 100%, foram obtidos após a adição de As como padrão interno.

Com exceção da padronização interna, os demais procedimentos (programa de temperatura, modificador permanente, 250 μg W + 200 μg Rh, e diluição da amostra), utilizados por Oliveira *et al.*⁸⁸ foram investigados no presente trabalho. Esperava-se que a introdução de ar na etapa de pirólise pudesse auxiliar na oxidação da matéria orgânica e com isso eliminar a interferência espectral, entretanto o fundo permaneceu inalterado. O

teste de recuperação realizado com a amostra 1, diluída 5 vezes, resultou em uma recuperação de 101% da massa de 1,6 ng Se adicionada à solução.

Com o objetivo de identificar a origem da interferência espectral observada utilizando os dois espectrômetros com fonte de linha, a mesma amostra (não diluída) foi analisada por HR-CS GF AAS na linha do Se 196,027 nm, uma vez que este espectrômetro permite a visualização do ambiente espectral ao redor da linha analítica (janela espectral de 0,22 nm). O mesmo perfil espectral de fundo em relação ao tempo na região vizinha à linha analítica do Se foi observado, o qual é característico de absorção de fundo estruturado devido à presença de molécula diatômica na fase gasosa, que se sobrepõe parcialmente à linha analítica. O espectro de absorção atômica da amostra resolvido temporalmente obtido na vizinhança do comprimento de onda 196,027 nm é apresentado na Figura 25.

Para identificar a molécula responsável pelo fundo estruturado, em um primeiro momento foi realizada uma inspeção no banco de dados do *software*, no qual são sugeridas as moléculas CH₃OH, CS, NO, OH, PO e SiO como possíveis interferentes na linha do Se. Com base na composição química da amostra, cujos componentes majoritários são açúcares, lipídeos, proteínas e minerais, inicialmente foram investigadas as moléculas PO e CS, através da introdução de 20 µL de soluções preparadas a partir de NH₄H₂PO₄, como fonte de PO, e Triton X-100 e L-cisteína, como fontes de C e S, respectivamente. A formação das moléculas foi confirmada nas linhas de máxima sensibilidade correspondentes ao PO (196,4 nm) e CS (257,6 nm)⁹⁴. Porém, na linha do Se o perfil temporal e por comprimento de onda destas moléculas não coincidiu com o da molécula interferente, por isso foram desconsideradas.

Verificou-se que a molécula interferente apresentava perfil semelhante à reportada por Becker-Ross *et al.*⁹⁵, identificada como NO pelos autores. Além disso, a molécula havia sido indicada pelo *software*. Para confirmar a identidade da molécula,

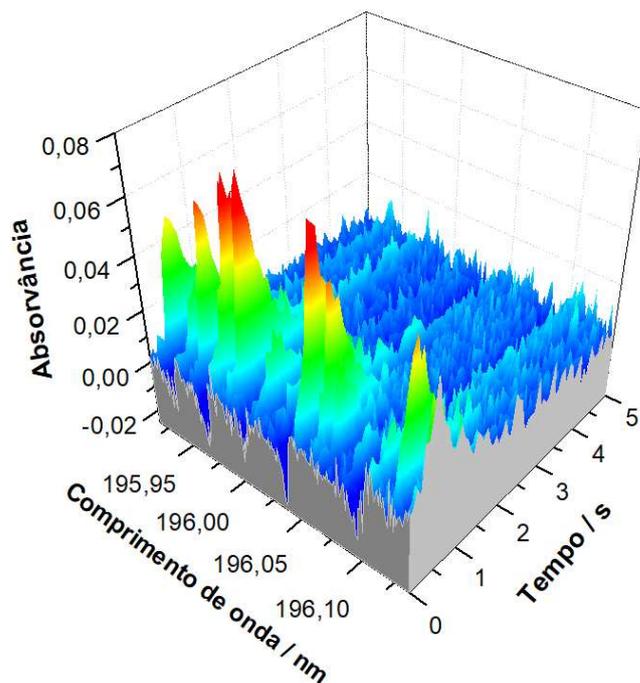


Figura 25. Espectro de absorção molecular resolvido temporalmente da amostra de água de coco 1 (sem diluição) na vizinhança da linha de 196,027 nm. $T_{\text{pir}} 1400\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100\text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$.

foi empregado 20 μL de uma solução de NH_4NO_3 (1 g L^{-1} de N na forma de nitrato) 120 μg de Ir como modificador permanente. Entretanto, nestas condições a molécula não foi detectada. O espectro de NO só foi observado após a utilização de Ni como modificador químico (Figura 26), conforme descrito Becker-Ross *et al.*⁹⁵ Portanto, o Ni atua como modificador para o NO. Neste trabalho, a molécula diatômica NO possivelmente foi gerada a partir de resíduos de proteínas, remanescentes durante a etapa de pirólise.

Devido ao pronunciado ruído na linha base após a correção para eventos contínuos e à baixa concentração do analito na amostra, não foi possível realizar a correção de fundo via algoritmo de mínimos quadrados para a amostra.

É possível que a maior exatidão obtida por Oliveira *et al.*⁸⁸, após a padronização interna com As, como mencionado anteriormente, foi devido à existência de bandas de NO que se estendem até a linha analítica do As, afetando ambos analito (Se) e padrão interno. Assim, a eficácia do procedimento descrito pelos autores seria justificada.

Embora a determinação de Se em água de coco por análise direta não tenha sido possível, este estudo permitiu elucidar a identidade e a origem da interferência espectral. A superação das dificuldades encontradas envolveria o uso de modificador

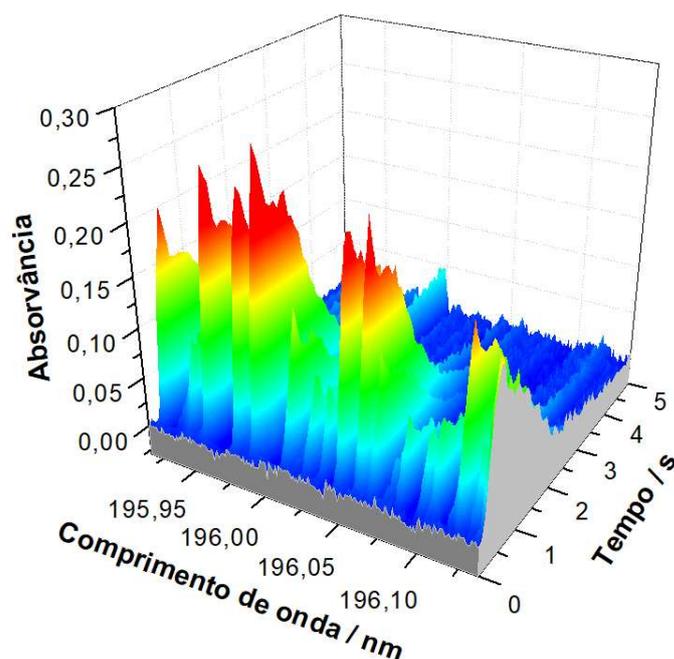


Figura 26. Espectro de absorção resolvido no tempo de uma molécula de NO na vizinhança da linha de 196,027 nm, gerado a partir de NH_4NO_3 . $T_{\text{pir}} 1100\text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2300\text{ }^\circ\text{C}$; modificador químico $10\text{ }\mu\text{g Ni}$.

convencional e digestão das amostras, o que acarretaria em diluição e, conseqüentemente, em concentrações de Se menores que o LD. Este estudo ressalta a vantagem proporcionada pelas técnicas de geração de vapor como sistemas de introdução de amostra, p.ex. a HG e PVG, em contornar este tipo de interferência, pela separação prévia do analito da matriz.

5.2.3 Otimização da geração fotoquímica de vapor de Se

5.2.3.1 Efeito da concentração de ácido fórmico

Na geração fotoquímica de vapor do Se, ácido fórmico e ácido acético são comumente utilizados como fonte de radicais redutores^{26,64}. Em estudos preliminares com ácido acético, observou-se formação de espuma no GLS. Estas carregavam a solução para o capilar que conduzia o vapor do analito para o atomizador ocasionando erro na análise. Campanella *et al.*⁷² reportaram que além de menos sensível, a PVG do Se com ácido acético demandou maior concentração do LMWC e um tempo maior de reação em comparação ao ácido fórmico. Com base nestas informações, no presente trabalho optou-se por utilizar ácido fórmico como LMWC para a PVG do Se (IV). Destaca-se que quando somente um LMWC é empregado na PVG do Se, apenas Se (IV) é convertido à uma espécie volátil, enquanto que o Se (VI) exige uma etapa de pré-

redução, o que geralmente envolve a presença de um foto-catalisador como o TiO_2 ^{75,96}, assunto que será discutido no Item 5.2.3.9.

Inicialmente, investigou-se a concentração de ácido fórmico na faixa de 0 a 9,0 mol L⁻¹. Como pode ser visto na Figura 27, houve um aumento do sinal analítico com o aumento da concentração, atingindo um valor máximo em 0,44 mol L⁻¹, permanecendo praticamente constante até 2,2 mol L⁻¹, seguida de um decréscimo em concentrações maiores. A concentração de 0,44 mol L⁻¹ de ácido fórmico foi selecionada, pois resultou em maior sinal analítico e menor desvio padrão entre as medidas, além de menor consumo de reagente. É possível também observar que este comportamento foi comum a ambas as concentrações de analito avaliadas, demonstrando que o efeito da concentração de ácido fórmico sobre a PVG do Se, neste caso, é independente da massa de analito. Concentração de ácido fórmico semelhante para PVG do Se foi escolhida por Rybínová *et al.*⁶⁴ (0,5 mol L⁻¹) com QTA AAS. Em contraste, Zheng *et al.*⁹⁷ escolheram 3,44

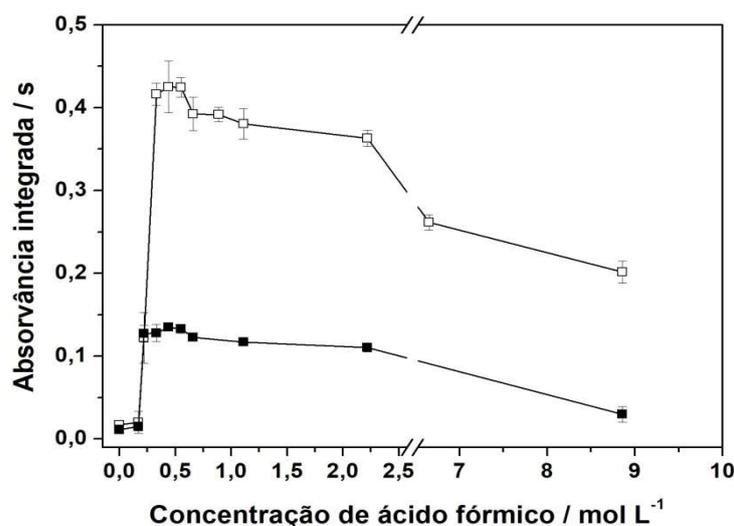


Figura 27. Efeito da concentração de ácido fórmico sobre o sinal analítico de uma solução padrão de 10 µg L⁻¹ (■) e 25 µg L⁻¹ (□) de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da amostra 2,5 mL min⁻¹; vazão de Ar 95 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2200 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

mol L⁻¹ de ácido fórmico utilizando ID-PVG-ICP-MS. Estas diferenças de concentração do LMWC indicam que na PVG as condições ótimas de geração de vapor são dependentes do sistema fotoquímico empregado e suas características.

5.2.3.2 Programa de temperatura

Assim como na HG, Ir (120 μg) foi empregado como modificador permanente neste estudo, pois este resultou em uma massa característica mais sensível do que as reportadas na literatura e longa durabilidade na HG (Item 5.2.1.5). Além disso, Ir como modificador permanente foi capaz de reter as espécies voláteis resultantes da PVG de Se, como demonstrado por Rybínová *et al.*⁶⁴.

Neste estudo, a temperatura de coleta foi investigada no intervalo de 100 a 600 $^{\circ}\text{C}$. Na Figura 28, pode-se observar um aumento do sinal com o aumento da temperatura de coleta até 300 $^{\circ}\text{C}$, seguida de um decréscimo em temperaturas superiores. Logo, a temperatura de coleta escolhida foi de 300 $^{\circ}\text{C}$. Em relação à temperatura de atomização, na Figura 28, observa-se que o aumento da temperatura promoveu um aumento do sinal analítico e, acima de 2000 $^{\circ}\text{C}$, o sinal analítico permaneceu constante. Selecionou-se 2100 $^{\circ}\text{C}$ como temperatura de atomização, pois esta forneceu menor desvio padrão entre

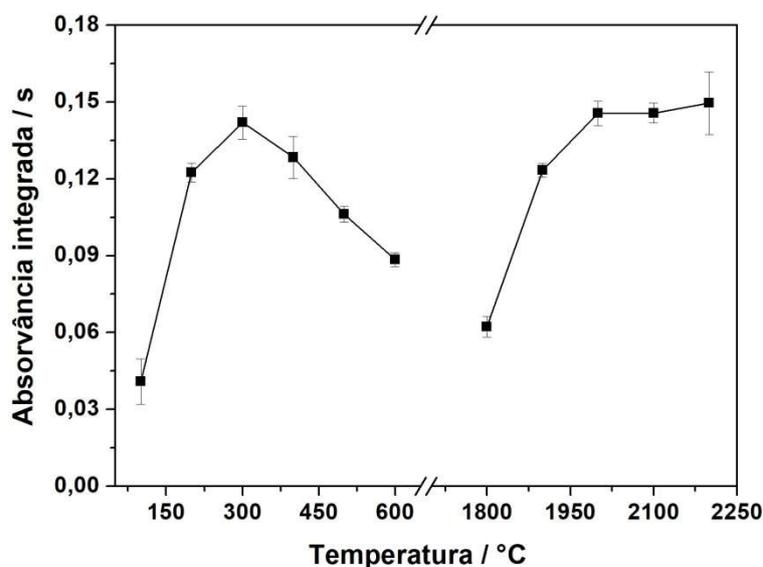


Figura 28. Curva de temperatura de coleta e atomização para uma solução analítica de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se (IV) em 0,44 mol L^{-1} de ácido fórmico. Na otimização da T_{col} foi utilizada 2200 $^{\circ}\text{C}$ como T_{at} ; na otimização da T_{at} foi utilizada 300 $^{\circ}\text{C}$ como T_{col} . Condições experimentais: vazão da amostra 2,5 mL min^{-1} ; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; modificador permanente 120 $\mu\text{g Ir}$.

as medidas. Temperaturas semelhantes de coleta e atomização do Se (350 $^{\circ}\text{C}$ e 2000 $^{\circ}\text{C}$) foram selecionadas por Rybínová *et al.*⁶⁴, utilizando PVG-GF AAS e 200 μg de Ir como

modificador permanente. Na Figura 29, é apresentado o perfil do sinal de absorção de uma solução analítica de Se (IV) e do fundo, obtido com o emprego das condições otimizadas.

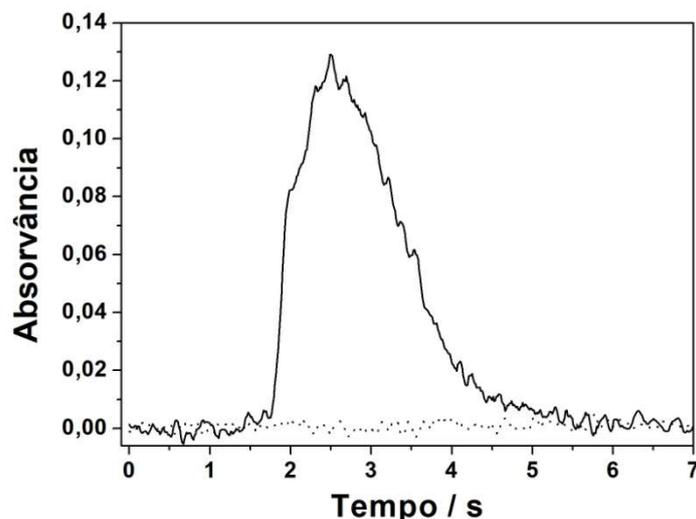


Figura 29. Perfil de absorvância obtido a partir de uma solução analítica de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV) em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico. Sinal analítico (—) e sinal de fundo (⋯). Condições experimentais: $T_{\text{col}} 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g}$ de Ir; vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} .

5.2.3.3 Efeito da concentração de HNO_3 e H_2O_2

Na literatura, é reportado que a presença das espécies NO_3^- , NO_2^- ou H_2O_2 , em uma determinada faixa de concentração, promove um aumento da geração das espécies voláteis de Se na PVG²⁶. A fim de investigar esta faixa de concentração, a influência do HNO_3 e H_2O_2 na PVG do Se foi avaliada. Na Figura 30, observa-se que a adição de HNO_3 na faixa de concentração entre 7 e 28 mmol L^{-1} promoveu um aumento do sinal analítico de uma solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se com $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico em relação à mesma solução contendo apenas ácido fórmico com igual concentração. A absorvância integrada máxima foi obtida com a adição de 14 mmol L^{-1} de HNO_3 , que correspondeu a um incremento no sinal analítico de cerca de 5 vezes em relação à ausência de HNO_3 . Comportamento semelhante foi observado com uma solução padrão de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, resultando em um aumento de resultando em um aumento de cerca de 3 vezes em relação a ausência de HNO_3 . É possível que o menor incremento do sinal analítico resulte da não linearidade da resposta (absorvância integrada *versus* massa de analito) com a solução padrão de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se em relação a de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ na presença

de HNO_3 (14 mmol L^{-1}). O decréscimo do sinal analítico em concentrações de HNO_3 maiores que 14 mmol L^{-1} , pode ter resultado da oxidação do Se devido ao excesso de radicais oxidantes $\cdot\text{OH}$.

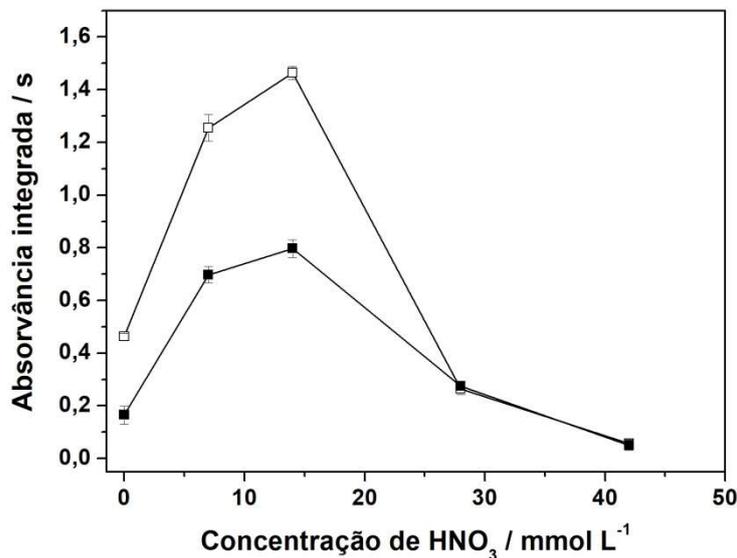


Figura 30. Efeito da concentração de HNO_3 sobre o sinal analítico de uma solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (■) e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (□) de Se (IV) em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

Para avaliar se a geração de compostos voláteis de Se na presença de HNO_3 (Figura 30) era limitada pela concentração de ácido fórmico, um estudo foi realizado variando-se a concentração de ácido fórmico adicionado à solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, enquanto a concentração de HNO_3 era mantida constante (14 mmol L^{-1}). Observa-se na Figura 31, que a variação da concentração de ácido fórmico não contribuiu para um aumento do sinal, indicando a existência de uma razão molar

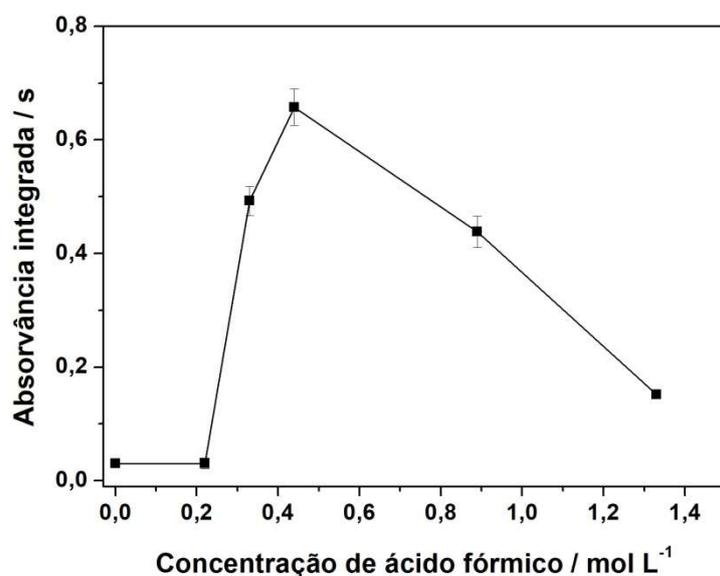


Figura 31. Efeito da concentração de ácido fórmico na absorvância integrada de Se (IV) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de 14 mmol L^{-1} de HNO_3 . Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão de amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 95 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

($\text{HCOOH}:\text{HNO}_3$, aproximadamente 30:1) ótima entre esses dois reagentes. Também se observa que, utilizando somente HNO_3 , não houve formação de espécies voláteis de Se. Os radicais formados a partir do HNO_3 provavelmente não participam da reação de formação das espécies voláteis de Se (Equação 11).

Comportamento similar ao do HNO_3 foi observado quando H_2O_2 foi adicionado a uma solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se contendo $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico (Figura 32). Um incremento no sinal de aproximadamente 3 vezes foi observado para ambas as concentrações com a adição de 145 mmol L^{-1} de H_2O_2 . Assim como reportado em outros trabalhos o HNO_3 e o H_2O_2 interferem positivamente na PVG do Se em uma estreita faixa de concentração^{26,64,65}. Este comportamento foi atribuído por Guo *et al.*²⁶ ao aumento de radicais $\cdot\text{OH}$ oriundos da decomposição do H_2O_2 e HNO_3 que favorecem o ataque ao ácido fórmico promovendo a formação de mais radicais.

Em um meio contendo apenas ácido fórmico, os principais produtos da PVG do Se são SeH_2 (60-70% v/v) e SeCO (30-40% v/v)²⁶. Quando, além do ácido fórmico, há

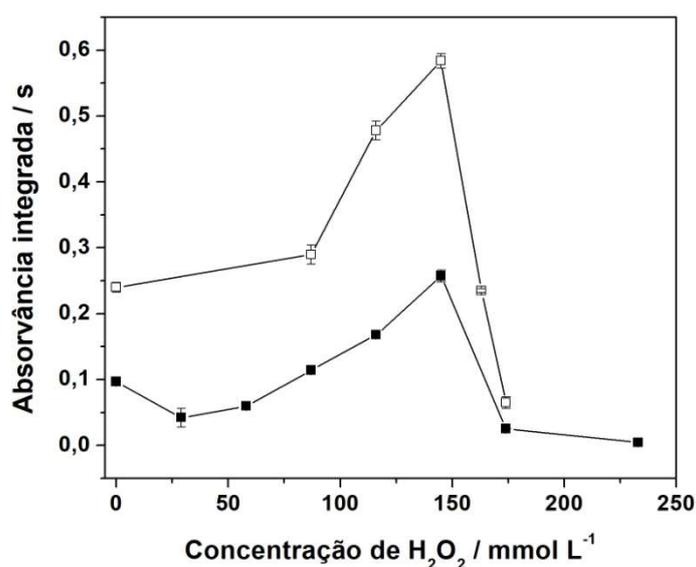
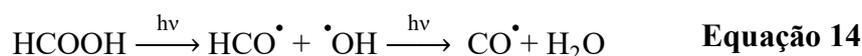
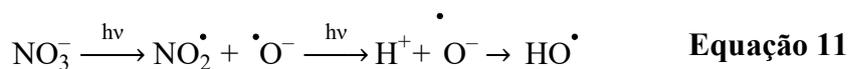


Figura 32. Efeito da concentração de H₂O₂ na absorvância integrada de Se (IV), 10 µg L⁻¹ (■) e 25 µg L⁻¹ (□) em 0,44 mol L⁻¹ de ácido fórmico. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da amostra 2,5 mL min⁻¹; vazão de Ar 95 mL min⁻¹; T_{col} 300°C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

espécies como NO₃⁻ ou H₂O₂ presentes, os radicais [•]OH (Equação 11 e 12) gerados consomem os radicais H[•] (Equação 13), inibindo a formação SeH₂ enquanto que a eficiência de geração dos radicais CO[•] (Equação 14) aumenta, tornando SeCO o único produto da PVG do Se nestas condições, conforme identificado por GC/ICP-MS.²⁶



O comportamento obtido neste trabalho, com a adição de HNO₃ ou H₂O₂, concorda com os resultados reportados na literatura e sugere que com este procedimento houve uma maior geração de Se volátil como SeCO. Por outro lado, Campanella *et al.*⁷²

identificaram, por GC-MS, SeCO como único produto resultante da PVG em ácido fórmico.

De acordo com os resultados obtidos e a discussão apresentada neste estudo, salienta-se que a faixa de concentração de HNO_3 e H_2O_2 possível de ser utilizada sem que a PVG seja suprimida deve ser levada em consideração se estes reagentes são empregados na etapa de preparo de amostra.

5.2.3.4 Efeito da vazão do gás carreador

Nas otimizações anteriores, o fluxo de gás carreador (Ar) era introduzido entre a saída do reator fotoquímico e o GLS. Como se observa na Figura 33, com a inserção do Ar após a saída do reator, o sinal analítico permaneceu constante, independentemente da vazão. Porém, quando o Ar foi inserido em linha na solução (através de um T) antes do reator, foi observado um aumento do sinal de absorvância integrada com o aumento da vazão de Ar entre 9 e 100 mL min^{-1} , em vazões maiores que 115 mL min^{-1} de Ar um patamar foi atingido (Figura 34). A partir deste estudo, foi adotada a introdução de Ar

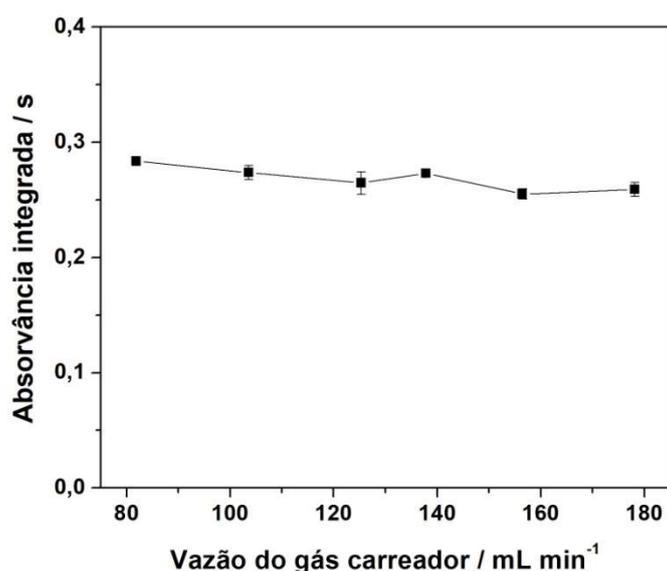


Figura 33. Efeito da vazão do gás carreador introduzido após o reator fotoquímico na absorvância integrada de Se (IV) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

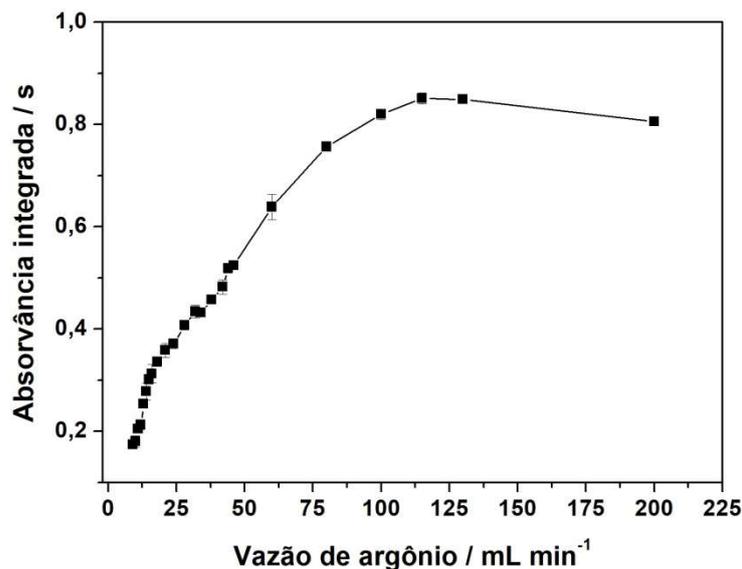


Figura 34. Efeito da vazão do gás carreador introduzido antes do reator fotoquímico, na absorvância integrada de Se (IV) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ em $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fórmico). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas ($n=3$). Condições experimentais: vazão da amostra $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

antes do reator com uma vazão de 115 mL min^{-1} de Ar, pois resultou em um aumento do sinal analítico de cerca de 3 vezes. A inserção de Ar simultaneamente, antes e após o reator, não alterou a sensibilidade.

Com inserção do gás de arraste (Ar) antes do reator, Rybínová *et al.*⁶⁴ obtiveram melhores respostas com vazões cerca de 9 vezes menores, quando comparadas ao presente estudo. Características como temperatura do reator, dimensões (comprimento e diâmetro) e tipo de material utilizado como percurso analítico pelos autores podem ter resultado nas diferentes vazões de Ar utilizadas.

A introdução de Ar antes do reator ocasionava a fragmentação da solução, pois interrompia momentaneamente o fluxo de solução. Este fato proporcionou uma maior turbulência da solução (aumenta a reatividade pela interação entre as bolhas de gás e solução) e, ao mesmo tempo, um aumento da área da solução exposta à radiação UV. Ambos os fatores possivelmente resultaram no aumento da geração de radicais redutores, formados pela decomposição fotolítica do ácido fórmico. Além disso, a remoção das espécies voláteis de Se geradas da solução pelo Ar pode ter sido mais eficiente. A ação isolada ou a combinação destes fatores, entre outros, pode ter sido o responsável pelo aumento da eficiência da PVG do Se.

5.2.3.5 Efeito da vazão da solução

Em decorrência da introdução do Ar antes do reator, o tempo de irradiação em relação à inserção do Ar depois do reator era menor, devido à soma das vazões da solução e de Ar. Portanto, a turbulência aliada à maior exposição à radiação UV foram mais relevantes na promoção da geração de vapor do que o tempo de irradiação.

A otimização da vazão da solução foi realizada através da variação da rotação da bomba, mantendo-se um volume fixo de solução. Na Figura 35, observa-se um declínio do sinal de absorvância integrada com o aumento da vazão da solução e, conseqüentemente, com o decréscimo do tempo de irradiação da solução. Um comportamento similar foi observado para as duas concentrações distintas avaliadas, evidenciando não haver uma dependência entre massa de analito e o tempo de irradiação (Figura 35). O contrário foi observado por Guo *et al.*²⁶: para uma concentração de analito 10 vezes maior, foi necessário um tempo de irradiação 4,5 vezes maior, para a mesma eficiência ser obtida. Porém, os autores utilizaram ácido acético como LMWC e entrada de Ar após o reator.

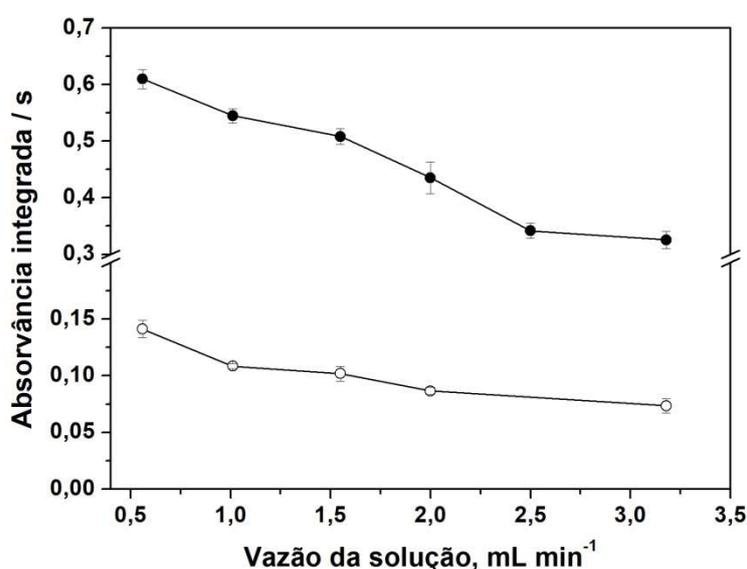


Figura 35. Efeito da vazão da amostra sobre o sinal analítico de uma solução padrão de 1,0 µg L⁻¹ (○) e 5,0 µg L⁻¹ (●) de Se (IV). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n = 3). Condições experimentais: vazão de Ar 115 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

Apesar da maior sensibilidade com a vazão de 0,5 mL min⁻¹, a vazão da solução escolhida foi de 1,5 mL min⁻¹, pois com a menor vazão seria necessário um tempo três

vezes maior por análise, dessa forma, reduzindo a frequência analítica. Destaca-se que, caso seja necessária uma melhora da sensibilidade, a diminuição da vazão seria uma estratégia válida para atingir o objetivo.

5.2.3.6 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito foram estabelecidos a partir da curva de calibração construída na faixa de concentração de 1,0 a 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se (correspondente a 1,0-6,0 ng Se) em 0,44 mol L^{-1} de ácido fórmico, empregando as condições otimizadas anteriormente (Tabela XIV). Destaca-se que a sensibilidade apresentada pela PVG poderá ser melhorada com a adição de 14 mmol L^{-1} de HNO_3 ou 145 mmol L^{-1} H_2O_2 ao ácido fórmico, embora seja necessário garantir essa mesma concentração na amostra. Os LD e LQ tanto instrumental como do método, obtidos pela PVG, foram ligeiramente melhores comparados com a HG (Item 5.2.1.5). Rybínova *et al.*⁶⁴ obtiveram melhores LD e LQ absolutos, 0,081 ng e 0,27 ng respectivamente, quando a área do pico foi avaliada, utilizando 200 $\mu\text{g Ir}$ por PVG-GF AAS. O LD do método foi menor do que o LD (0,89 $\mu\text{g L}^{-1}$) obtido por Nováková *et al.*⁷⁴ com amostras de suplemento alimentar por PVG-QTA AAS.

Tabela XIV. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por PVG-GF AAS

Parâmetro	Resposta
Regressão linear	$A_{\text{int}} = 0,0027 + 0,0680m(\text{ng})$
R	0,9993
m_0 / pg	62
LD / ng	0,13
LQ / ng	0,44
LD / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,65
LQ / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,2

Condições experimentais: 0,44 mol L^{-1} ácido fórmico; LD e LQ do método foram calculados considerando o volume de 1 mL de amostra e o volume final de 5 mL.

A exatidão e a precisão do método serão apresentadas na Tabela XVIII no Item 5.2.3.12.

5.2.3.7 Eficiência da geração fotoquímica de vapor

A eficiência da PVG do Se foi estimada a partir da comparação da sensibilidade obtida pela PVG com aquela estabelecida pela HG, pois a eficiência de ambas as técnicas, acopladas à GF AAS, depende das etapas: (i) de geração vapor, (ii) da separação da espécie volátil do analito da solução residual no GLS, (iii) do seu transporte do separador até o forno de grafite e (iv) da coleta na plataforma do tubo de grafite. Dessa forma, a eficiência da PVG foi estimada em 79% em relação à HG. A eficiência da PVG do Se reportada por Guo *et al.*²⁶ em ácido fórmico variou entre 10 - 15% utilizando QTA AAS, quando comparada com a HG. Uma eficiência de 68% utilizando 0,5 mol L⁻¹ de ácido fórmico, e de 89%, quando este era misturado a 5 mmol L⁻¹ HNO₃ foram obtidas por Rybínová *et al.*⁶⁴ com PVG-GF AAS, quando comparado com a amostragem líquida por GF AAS. Em outro experimento realizado por Rybínová *et al.*⁹⁸ utilizando ⁷⁵Se como radiotraçador os autores obtiveram eficiências entre 21-57% com HCOOH e HCl e entre 58-67% com adição de HNO₃ a estes reagentes. Estes valores de eficiências foram corrigidos pela eficiência da HG em batelada (77-84%).

Destaca-se que a eficiência da HG (S=0,0865 s ng⁻¹) e da PVG (S = 0,0680 s ng⁻¹) em relação à amostragem líquida por GF AAS (S = 0,1184 s ng⁻¹) foi de 73% e 57%, respectivamente. Contudo, a HG foi escolhida para comparação devido às semelhanças citadas anteriormente com a PVG. O valor de eficiência da HG encontrada concorda com os valores de 78,1%⁴¹, 75%⁴⁰ e 60-63%⁶⁴ reportados na literatura.

5.2.3.8 Balanço de massa

A fim de se investigar os motivos pelas quais a eficiência da geração de vapor pela PVG foi inferior à HG, um estudo de balanço de massa foi realizado. Três alíquotas distintas, contendo 10 ng Se (IV) cada, foram introduzidas no reator e coletadas após exposição à radiação UV, e posteriormente quantificadas por HG-GF AAS. A primeira alíquota foi coletada imediatamente após a saída do reator (chamada de "solução da saída do reator"). A segunda alíquota foi coletada na saída do GLS (chamada de "solução residual") com o objetivo de quantificar a fração de analito que permaneceu na fase aquosa. A terceira alíquota, também recolhida no GLS, foi submetida à sonicação por 60 min, a fim de expulsar qualquer espécie volátil do analito que ainda pudesse estar contida na solução após o GLS (chamada de "solução residual após sonicação"). Na Figura 36 é apresentado um fluxograma ilustrando as etapas de coleta das alíquotas para o balanço de massa.

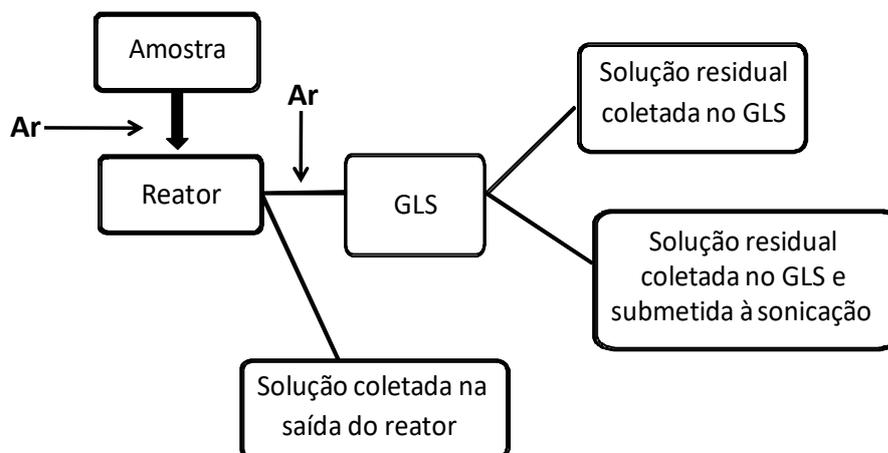


Figura 36. Fluxograma das etapas de coleta das alíquotas para o balanço de massa.

As três alíquotas foram avolumadas com $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ e o Se nelas contido quantificado pela HG, após pré-redução. A fração do analito na fase gasosa gerada pela PVG foi estimada pela HG, ou seja, o sinal analítico das espécies geradas pela PVG foi determinado por uma curva de calibração obtida por HG. Considera-se, desta forma, que a HG é o sistema mais eficiente de geração de vapor e, por isso, mais adequado para avaliar possíveis perdas do analito na fase gasosa. O mesmo experimento também foi conduzido com a introdução de Ar no sistema após o reator, como descrito no Item 5.2.9.

Na Tabela XV, são apresentadas as recuperações de Se obtidas na fração gasosa gerada pela PVG e nas diferentes alíquotas coletadas no sistema de PVG, com adição de Ar antes e após o reator, estimadas ou quantificadas pela HG. As recuperações foram calculadas pela razão entre a massa de Se recuperada em cada uma das quatro frações e a massa de Se total inserida no reator (Tabela XV). O balanço de massa foi calculado através da soma da massa de Se convertida à espécie volátil pela PVG e a massa de Se contida na solução residual da PVG.

Tabela XV. Recuperação de Se (10 ng) em alíquotas submetidas à PVG, com introdução de Ar antes e após o reator, seguida de quantificação por HG*

Etapa da coleta da alíquota	Fração do analito / %	
	Ar antes reator	Ar após reator
Fase gasosa	69 ± 1	13 ± 1
Solução da saída do reator	16 ± 2	38 ± 2
Solução residual	16 ± 2	32 ± 3
Solução residual após sonicação	4,7 ± 2,5	38 ± 3
Soma Se recuperado	85 ± 2	45 ± 4

*Fração do analito expressa como média ± desvio padrão (n = 3) na fração da fase gasosa; demais frações como média ± desvio padrão combinado (n = 9)

Pela Tabela XV, é notória a diferença existente entre a fração do analito recuperada na fase gasosa pelos dois sistemas de suprimento de Ar, corroborando a hipótese de que a inserção do Ar antes do reator auxiliou na geração e/ou na remoção das espécies de Se voláteis, geradas pela PVG, da fase líquida. É possível que as diferenças no rendimento das espécies gasosas sejam devidas às diferenças de reatividade, proporcionada pela inserção de Ar antes e depois do reator, como discutido no Item 5.2.3.4.

Campanella *et al.*⁷² sugeriram que a reação do (CH₃)₂Se (produto resultante da PVG em ácido acético) em água, com radicais [•]OH oriundos da fotólise da H₂O, poderia formar espécies de Se oxidadas ou iônicas, as quais são menos ou não-voláteis e permanecem em solução. Os autores concluíram que, durante a PVG, as espécies de Se voláteis geradas podem ser fotodegradadas à espécies menos ou mesmo não voláteis.

Além disso, devido à intensa absorção da radiação pelo ácido fórmico nos comprimentos de onda 185 e 254 nm, a profundidade que a radiação penetra na solução é curta, o que poderia comprometer a eficiência da geração das espécies voláteis⁴⁷. Contudo, isto exerceria maior influência sobre o sistema com inserção de Ar após o reator, pois isto poderia ser compensado pela maior turbulência e maior área exposta à radiação com a introdução do Ar antes do reator.

Destaca-se, ainda, da Tabela XV que na solução residual coletada no GLS (após a sonicação), foi removida uma fração correspondente a 11% de espécies voláteis do analito no sistema com introdução de Ar antes do reator. Este resultado sugere que o GLS empregado não foi totalmente eficiente em separar as espécies voláteis na solução. No sistema com inserção de Ar após reator, a fração de analito após a sonicação foi praticamente a mesma do que na solução não submetida a tal procedimento. A fração

recuperada nas três alíquotas coletadas (solução da saída do reator, solução residual e submetida à sonicação) foi semelhante, indicando que o GLS teria sido eficiente em separar as espécies de Se voláteis da solução aquosa, no sistema com introdução de Ar após o reator.

A fração de Se não-recuperado, cerca de 15% e 55%, nos sistemas com Ar antes e após o reator, respectivamente, possivelmente foi devido à adsorção das espécies de Se nos tubos e capilares ou perdido durante a coleta das alíquotas.

Rybínová *et al.*⁹⁸ recuperaram $\geq 96,6\%$ do total de radiotraço de ^{75}Se introduzido em quatro tipos de reatores avaliados. Com este experimento, o ^{75}Se aderido nas paredes do sistema (incluindo tubos, percurso analítico e GLS) correspondeu a uma fração $< 10\%$. A fração do analito recuperada no resíduo líquido variou de 42 a 77,5% nos diferentes reatores. As concentrações do radiotraçador foram determinadas por um sistema de contagem de raios gama.

Um segundo experimento de balanço de massa semelhante ao anterior foi realizado utilizando 75 ng Se e o sistema com introdução de Ar após o reator, com o objetivo de quantificar o Se na solução residual coletado no GLS por amostragem líquida por GF AAS. A amostragem líquida foi selecionada para a quantificação, pois esta técnica não faz distinção entre as espécies de Se, desde que um modificador adequado seja usado, diferentemente da HG. A escolha da massa de 75 ng Se utilizada neste experimento foi baseada na fração de Se recuperada na fase aquosa (cerca de 40%, Tabela XV), na diluição da solução residual coletada (4 vezes) e no LQ (0,15 ng, Tabela XII) da GF AAS com amostragem líquida, resultando em uma massa final de 0,45 ng após a injeção de 60 μL no tubo de grafite. Este segundo balanço de massa foi realizado com o intuito de elucidar se o Se na solução residual do GLS, após PVG, encontrava-se em uma forma não passível de ser convertida a SeH_2 pela HG, por exemplo Se^0 , produto da PVG em ácido fórmico. Na Tabela XVI, observa-se que a fração do analito presente na solução residual, quantificado pelas duas técnicas de introdução de amostra (líquida e HG), foram semelhantes e concordantes com a recuperação encontrada anteriormente pela HG (Tabela XV). Portanto, a baixa recuperação de Se pelo sistema com introdução de Ar após o reator provavelmente decorreu dos fatores descritos anteriormente.

Tabela XVI. Recuperação de Se (75 ng) em alíquotas submetidas à PVG seguida de quantificação por HG e por análise direta GF AAS

Coleta da alíquota	Fração de analito / %	
	HG	Análise direta
Fase gasosa	14 ± 1	11 ± 1
Solução residual	42 ± 1	40 ± 1
Soma Se recuperado	56 ± 1	51 ± 1

*Fração do analito expressa como média ± desvio padrão (n = 3) na fração da fase gasosa; demais frações como média ± desvio padrão combinado (n = 9)

5.2.3.9 Pré-redução do Se (VI)

Assim como na HG, o Se (VI) não gera uma espécie volátil, sendo necessária uma etapa de pré-redução *on line* ou *off line* a Se (IV) na PVG.

Conforme descrito no Item 4.4.3, uma segunda espiral de quartzo, recoberta com um filme fino de TiO₂, foi empregada na pré-redução *on line* do Se (VI). Após o recobrimento, a espiral foi introduzida no reator antes da espiral não recoberta. Até a conclusão do trabalho, a espiral foi recoberta uma única vez, e aproximadamente 500 medidas foram feitas sem perda de sensibilidade. Na ausência do TiO₂, a recuperação do Se (VI) foi cerca de 1%, e após a redução *on line* a Se (IV), a recuperação foi de aproximadamente 100% (Figura 37).

Com adoção deste procedimento, as seguintes vantagens foram proporcionadas em relação à mesma etapa pela HG: (i) menor tempo de análise, (ii) redução do risco de contaminação, pois reduz o número de etapas e (iii) dispensa o uso de HCl.

Quando o TiO₂ é exposto a radiação UV, as seguintes etapas fotocatalíticas ocorrem: (1) a absorção de fótons de energia maior ou igual ao *band gap* do semicondutor promove um elétron da banda de valência (h^+) para a banda de condução (e^-) de maior energia, deixando uma vacância carregada positivamente na banda de valência; (2) os elétrons e as vacâncias fotogeradas são aprisionados no interior ou na superfície do TiO₂; (3) reações de oxi-redução induzidas pelos elétrons e as vacâncias com as espécies adsorvidas na superfície do TiO₂ e (4) dessorção dos produtos e reconstituição da superfície do TiO₂. Neste trabalho as espécies reduzidas e oxidadas na superfície do TiO₂ na etapa 3 são Se (IV) e (VI) e o ácido fórmico, respectivamente⁹⁹.

Compostos orgânicos, como o ácido fórmico, são adicionados como *hole scavengers* para reduzir a combinação dos elétrons e vacâncias⁹⁹. Uma representação das

reações de oxi-redução que ocorrem na superfície do TiO_2 é exemplificado pela Figura 38.

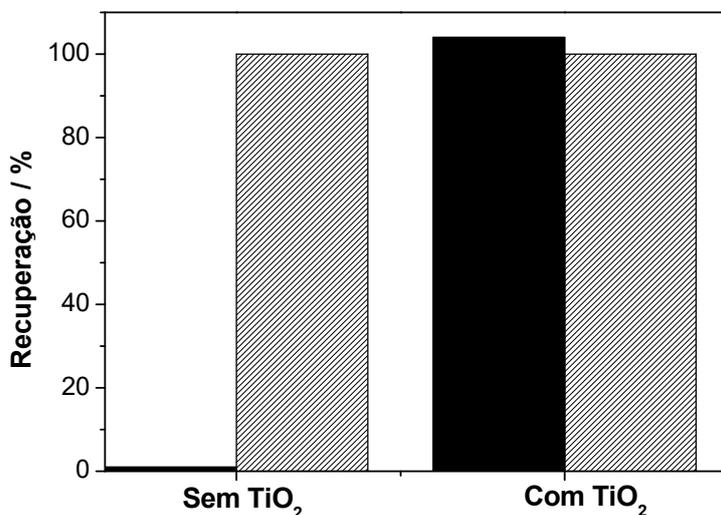


Figura 37. Efeito do óxido de titânio na pré-redução *on line* de uma solução padrão de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se (VI) (■) em relação ao Se (IV) (▨). Condições experimentais: vazão da solução $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão de Ar 115 mL min^{-1} ; $T_{\text{col}} 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{at}} 2100 \text{ }^\circ\text{C}$; modificador permanente $120 \mu\text{g Ir}$.

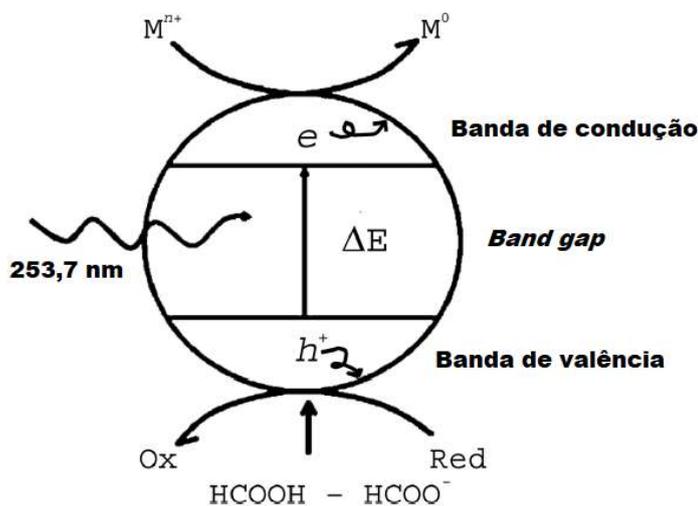


Figura 38. Representação esquemática das reações de oxi-redução fotocatalíticas que ocorrem na superfície do TiO_2 . Adaptada de Sturgeon e Grinberg.⁴⁷.

5.2.3.10 Efeito do HCl

O efeito do HCl sobre a PVG do Se foi avaliado após a inserção da espiral recoberta com TiO₂ no reator. Pode-se observar, na Figura 39, que a adição de HCl produziu um efeito positivo sobre a PVG em uma faixa de concentração de 5 a 3000 mmol L⁻¹. Diferente do HNO₃ e do H₂O₂ (Figura 30 e 32), a faixa de concentração possível de ser utilizada antes do decréscimo do sinal analítico foi mais ampla. Uma maior tolerância ao HCl já havia sido relatada em outros trabalhos, porém o sinal analítico era suprimido em concentrações menores do que as avaliadas no presente trabalho^{64,72}. A faixa de concentração entre 80 e 3000 mmol L⁻¹ de HCl poderia ser utilizada para aumentar a sensibilidade da PVG do Se.

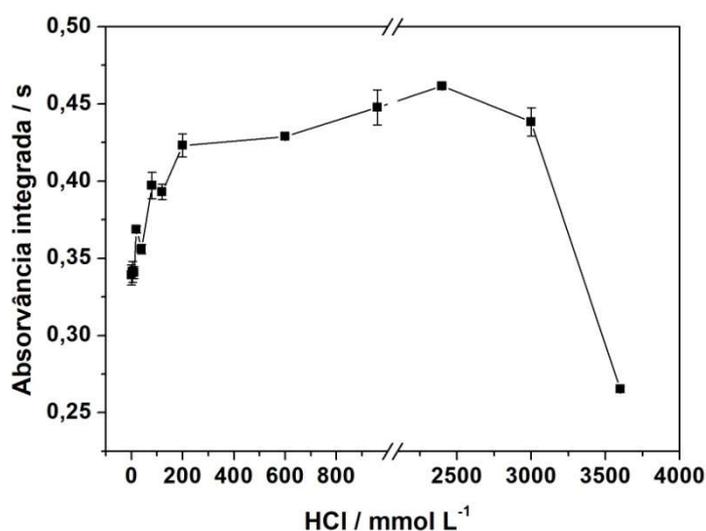


Figura 39. Efeito da concentração de HCl na absorvância integrada de Se (IV) (5 µg L⁻¹ em 0,44 mol L⁻¹ ácido fórmico). Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: vazão da solução 1,5 mL min⁻¹; vazão de Ar 115 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

5.2.3.11 Preparo de amostra

De acordo com Campanella *et al.*⁷², o principal problema que ainda limita a aplicação da PVG é a interferência causada por espécies aniônicas, como NO₃⁻ e Cl⁻, empregadas geralmente na conversão de compostos de Se orgânico em espécies inorgânicas.

As espécies inorgânicas Se (IV) e Se (VI), solúveis em água, foram determinadas em amostras de suplemento alimentar por meio de uma simples dissolução em H₂O ou

com HNO_3 5 mmol L^{-1} , ou com HCl 50 mmol L^{-1} , por PVG-QTA AAS e utilizando curva de adição de padrão⁶⁴. Porém, quando matrizes mais complexas são visadas, como é o caso de amostras de peixe, e a digestão por via úmida é requerida (com uso de agentes oxidantes, como HNO_3 e H_2O_2), uma etapa de evaporação até próximo da secura e diluição são necessários para remover o excesso de reagentes oxidantes que permanecem após a digestão, os quais são interferentes na PVG do Se⁹⁷. Entretanto, é importante considerar que este procedimento pode acarretar em perdas do analito.

No presente trabalho, considerando os problemas relacionados à presença de interferentes, foram priorizados procedimentos de preparo de amostra que evitassem o uso de reagentes concentrados. Na Tabela XVII, são apresentados, resumidamente, os preparos de amostra investigados para uma amostra de água de coco.

Tabela XVII. Preparo de amostras para determinação de Se em amostras de água de coco. As amostras foram fortificadas com uma solução de padrão de SeMet para resultar em $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Se. Experimentos realizados em duplicata.

Preparo de amostra	Recuperação / %	
	$5 \mu\text{g L}^{-1}$ SeMet	Amostra fortificada ^c
1) Diluição (1:4) com ácido fórmico $0,44 \text{ mol L}^{-1}$	33 ± 5	12 ± 1
2) Exposição à radiação UV (reator 1) ^a + $145 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$	95 ± 4	10 ± 3
3) Exposição à radiação UV (reator 2) ^b + $145 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$	82 ± 1	14 ± 1
4) Chapa de aquecimento (80°C) + $145 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$	73 ± 2	6 ± 1
5) Digestão em forno micro-ondas com H_2O_2 e evaporação até próximo da secura	55 ± 4	20 ± 3
6) Adição de $1,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ + $145 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$, aquecimento a 80°C por 2h (30 min de sonicação);	98 ± 2	25 ± 1
7) Adição de ácido fórmico $0,9 \text{ mol L}^{-1}$, aquecimento a 80°C por 2h (30 min de sonicação);	24 ± 1	17 ± 1
8) Adição de ácido fórmico $2,2 \text{ mol L}^{-1}$, aquecimento a 80°C por 2h (30 min de sonicação);	22 ± 1	17 ± 3

^a Reator 1: unidade de reação fotoquímica Beam Boost; ^bReator 2: lâmpada de UV germicida;

^cAmostra 1 foi empregada nos experimentos

A recuperação do analito adicionado às amostras (fortificadas) foi calculada pela Equação 15, na qual C_1 , representa a concentração de Se (adicionado como SeMet) na amostra fortificada; C_2 , a concentração de Se na amostra não fortificada; C_3 , concentração de Se (IV):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

Dentre os preparos de amostra avaliados, dois deles (procedimentos 2 e 6) apresentaram recuperações próximas de 100% para a solução padrão. No procedimento 2, foi utilizado um reator de foto-oxidação (reator 1, descrito no Item 4.1), no qual 5,0 mL da solução padrão ou amostra, fortificada com uma solução padrão de SeMet para resultar em uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, mais 145 mmol L^{-1} de H_2O_2 foram introduzidos no reator, com uma vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ (tempo de irradiação para cada solução de cerca de 17 min). No final, a solução foi avolumada para 10 mL com ácido fórmico $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ e introduzida no sistema de PVG. No procedimento 6, à solução padrão ou à amostra, fortificada com SeMet (concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$), foram adicionados $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ HNO_3 e 145 mmol L^{-1} H_2O_2 , mantidas a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho ultrassônico por 2 h, com 30 min de sonicação. Apesar das boas recuperações obtidas para as soluções padrão contendo SeMet, no caso das amostras, as recuperações apresentaram baixos valores nos dois procedimentos. Para identificar se os baixos valores de recuperação eram devido ao efeito de matriz, após a execução dos procedimentos descritos acima, foram realizadas adições de padrão nos extratos das amostras resultantes. Os valores de recuperação permaneceram inalterados com este procedimento, indicando que a matriz era a responsável por suprimir a PVG.

A partir das recuperações obtidas para as amostras, é evidente que apesar de a água de coco, *in natura* ou envasada, ser constituída majoritariamente de água (95%), os demais constituintes, como carboidratos, proteínas, lipídeos, minerais (K, Ca, Na, Mg, P, Mn, Cl), acidulantes, conservantes e antioxidantes, exerceram forte interferência na PVG do Se.

A digestão em forno de micro-ondas utilizada na HG (Item 4.4.2) foi realizada, seguida de uma etapa de evaporação até próximo à secura, e de diluição. Para esta avaliação, metade das amostras foi fortificada antes da digestão e a outra metade após a digestão. Em todas elas, a concentração final de Se (IV) foi $5 \mu\text{g L}^{-1}$. A recuperação obtida nas amostras fortificadas antes e após da digestão foi de $44 \pm 4\%$ e $46 \pm 1\%$, respectivamente, indicando que o meio inibia a PVG.

Outro procedimento foi investigado utilizando um digestor de UV *labmade* (reator 3, descrito no Item 4.1). As variáveis tempo de irradiação e tipo de ácido inorgânico (HNO₃ e HCl) adicionado foram otimizadas. Conforme apresentado na Figura 40, as recuperações do analito aumentaram com o tempo de digestão quando HNO₃ (14 mmol L⁻¹) foi adicionado,

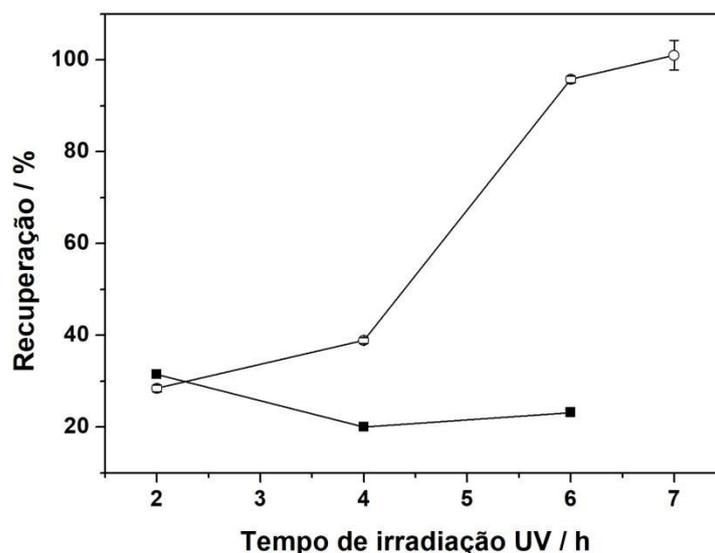


Figura 40. Recuperação de SeMet na amostra de água de coco 1 fortificada com 15 ng de Se submetida à digestão UV com 0,2 mol L⁻¹ de HCl (■) e com 0,014 mol L⁻¹ de HNO₃ (○) e H₂O₂ por PVG-GF AAS. Condições experimentais: vazão da solução 1,5 mL min⁻¹; vazão de Ar 115 mL min⁻¹; T_{col} 300 °C; T_{at} 2100 °C; modificador permanente 120 µg Ir.

enquanto que o mesmo não foi observado com HCl (200 mmol L⁻¹). Com a adição de HCl, observou-se aglomeração de matéria orgânica e turbidez da solução, enquanto que com HNO₃ a solução tornava-se amarelada com o passar do tempo, porém límpida, e após transcorridas 6 h, a solução tornava-se incolor. As concentrações de HNO₃ e HCl empregadas estão na faixa de concentração previamente estudadas (Figuras 30 e 39). Na Figura 41a, destaca-se que embora os frascos de quartzo ficassem igualmente dispostos ao redor da lâmpada UV, antes de completar 5 h as amostras apresentavam diferenças de coloração em decorrência da posição no reator.

A partir destas otimizações, foram realizados testes de recuperação empregando alíquotas de 1,0 mL de solução padrão ou amostra, fortificada com soluções padrão de Se (IV), Se (VI) ou SeMet para resultar em 3,0 µg L⁻¹, HNO₃ 14 mmol L⁻¹ e, a cada 60 min de

digestão, 50 μL de H_2O_2 era adicionado durante um tempo total de 6 h (814 mmol L^{-1} de H_2O_2) (Figura 41b). Resultados apresentados no Item 5.2.3.12.

5.2.3.12 Resultados analíticos

As amostras analisadas anteriormente por HG foram preparadas como descrito no Item 5.2.3.11. Simultaneamente a análise das amostras foram realizados testes de recuperação das espécies de Se (IV), Se (VI) e SeMet. Os resultados são apresentados na Tabela XVIII.

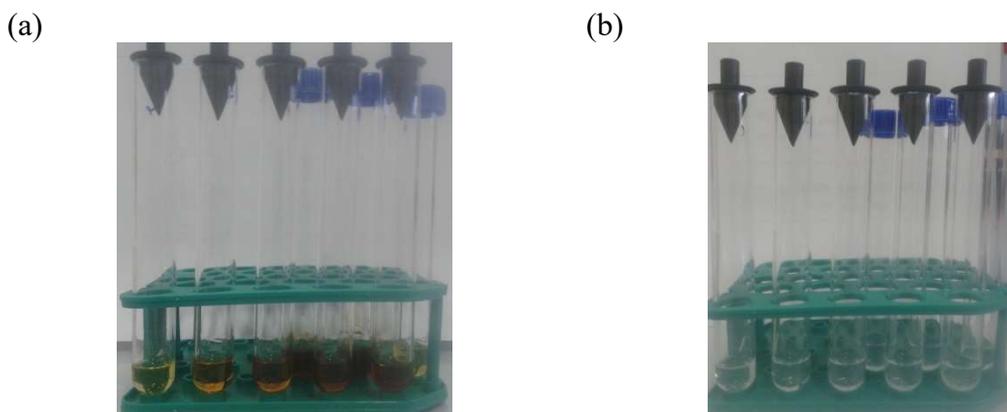


Figura 41. Fotos ilustrativas do processo de digestão com irradiação UV após (a) 1 e (b) 6 horas de digestão.

Tabela XVIII. Concentração de Se em amostras de água de coco obtidas por PVG-GF AAS e testes de recuperação. Média \pm desvio padrão (n=2)

Amostra	Concentração de Se encontrada / $\mu\text{g L}^{-1}$		Recuperação / %		
	PVG	HG	Se (IV)	Se (VI)	SeMet
1	< LD	< LD	96 ± 2	81 ± 2	102 ± 2
2	$3,15 \pm 0,43$	$4,00 \pm 0,58$	80 ± 2	88 ± 3	90 ± 3
3	< LD	< LD	92 ± 2	103 ± 1	85 ± 3

A conversão do Se presente como SeMet e Se (VI), pelas etapas de preparo de amostra e pré-redução, a Se (IV) foi comprovada pelos resultados obtidos pelo teste de recuperação para as três espécies de Se avaliadas. Os valores obtidos de recuperação (81-103%) e RSD (1-14%) são considerados aceitáveis para a faixa de concentração de analito encontrada de acordo com AOCA⁹³.

A concentração de Se encontrada na amostra 2 pela PVG foi inferior ao valor encontrado pela HG. É possível que o menor valor encontrado pela PVG se deva ao menor número de replicatas ($n=2$) realizadas com este digestor. O tempo transcorrido desde a determinação por HG pode ter exercido influência no resultado. A amostra 4 não pode ser analisada, pois não havia volume suficiente.

6. CONCLUSÕES

Para cada um dos analitos foi montado um sistema de geração fotoquímico e acoplado ao espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite.

O método de geração fotoquímica de vapor com o uso de *n*-propanol para promover a formação de espécies voláteis de Hg, combinado com a pré-concentração em tubo de grafite recoberto com Au, permitiu a determinação simples, exata e precisa de Hg em peixe. Isto foi possível com a solubilização em TMAH ou também com o auxílio de H₂O₂. O limite de quantificação obtido é compatível com a legislação brasileira para Hg em peixe. Além disso, a PVG apresentou eficiência similar àquela obtida por CV-GF AAS.

O método desenvolvido por HG-GF AAS permitiu a determinação exata e precisa de Se em amostras de água de coco. Os testes de recuperação apresentaram valores (89-111%) para Se (IV), Se (VI) e selenometionina.

A determinação exata e precisa de Se em água de coco foi possível pelo método desenvolvido por PVG-GF AAS, que representa uma alternativa à técnica de geração de hidretos. Um procedimento simples de pré-redução *on line* do Se (VI) a Se (IV) foi obtido com o recobrimento do percurso analítico com um filme fino de TiO₂, enquanto que a geração de vapor Se (IV) foi promovida com uma solução de ácido fórmico diluído. Os limites de detecção e quantificação foram semelhantes aos obtidos com a técnica de HG, no entanto a eficiência de geração de vapor pela PVG foi inferior àquela da HG. O método de preparo de amostra com uso de um digestor UV, embora moroso, é livre de interferência causada pelo HNO₃ e H₂O₂, pois possibilitou utilizar concentrações baixas destes reagentes e resultou em recuperações satisfatórias (80-1103%) para Se (IV), Se (VI) e selenometionina pelo teste de recuperação de padrão.

A análise direta por GF AAS com fonte de linha, como um método comparativo para avaliar a exatidão dos métodos desenvolvidos para determinação de Se em água de coco revelou a existência de uma interferência espectral. Por meio da técnica HR-CS AAS, empregada neste trabalho como uma ferramenta de diagnóstico, foi possível a confirmação da ocorrência de um fundo estruturado que foi identificado como molécula de NO.

As técnicas de geração de vapor PVG e HG representam uma alternativa eficiente à análise direta por GF AAS ao evitarem a interferência espectral resultante da matriz de água de coco e permitirem melhores limites de detecção do método.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/Metals/UCM537120.pdf>. Página acessada em 06/08/2017
- [2]Nordberg, G.F.; Fowler, B.A.; Nordberg, M. (Eds.). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press. 2014
- [3]<http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf>. UNEP, Global Mercury Assessment, 2013 Página acessada em 03/08/2017.
- [4]Pacyna, E.G.; Pacyna, J.M.; Sundseth, K.; Munthe, J.; Kindbom, K.; Wilson, S.; Steenhuisen, F.; Maxson, P.; *Atmos. Environ.* **2010**, 44, 2487.
- [5]Kim, K-H.; Kabir, E.; Jahan, S.; *J. Hazard. Mater.* **2016**, 306, 376.
- [6]Burger, J.; Gochfeld, M.; *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 1418.
- [7]Dabeka, R.; McKenzie, A.D.; Forsyth, D.S.; Conacher, H.B.; *Food Addit. Contam.* **2004**, 21, 434.
- [8]García-Sevillano, M.A.; Rodríguez-Moro, G.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gómez-Ariza, J.L.; *Chem. Biol. Interact.* **2015**, 229, 82.
- [9]Syversen, T.; Kaur, P.; *J Trace Elem Med Bio.* **2012**, 26, 215.
- [10]Holmes, P.; James, K.A.F.; Levy, L.S.; *Sci. Total Environ.* **2009**, 408, 171
- [11]Kryukov, G.V.; Castellano, S.; Novoselov, S.V.; Lobanov, A.V.; Zehtab, O.; Guigó, R.; Gladyshev, V. N.; *Science* **2003**, 300, 1439.
- [12]Papp, L.V.; Lu, J.; Holmgren, A.; Khanna, K.K.; *Antioxid. Redox. Sign.* **2007**, 9, 775.
- [13]Kipp, A.P.; Strohm, D.; Brigelius-Flohé, R.; Schomburg, L.; Bechthold, A.; Leschik-Bonnet, E.; Hesecker, H.; German Nutrition Society (DGE). *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, 32, 195.
- [14]<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225483/>. Institute of medicine (us) panel on dietary antioxidants and related compounds. Dietary reference intakes for vitamin c, vitamin e, selenium, and carotenoids. Página acessada em 21/11/17
- [15]Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, Carmen.; *Sci. of Total Env.* **2008**, 400, 115.
- [16]Lemire, M.; Fillion, M.; Frenette, B.; Passos, C.J.S.; Guimarães, J.R.D.; Barbosa, F.; Mergler, D.; *Neurotoxicology.* **2011**, 32, 944.
- [17]García-Sevillano, M.A.; Rodríguez-Moro, G.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gómez-Ariza, J.L.; *Chem. Biol. Interact.* **2015**, 229, 82.

-
- [18]Welz, B.; Vale, M.G.R; Atomic absorption spectrometry and related techniques. In: Jack Cazes. (Org.). *Analytical Instrumentation Handbook*. 3ed. New York: Marcel Dekker, 2004
- [19]Amos, M.D.; Flame and vapor generation atomic absorption spectrometry in Atomic Spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2010, 2–21.
- [20]Borges, D.L.; Holcombe, J.A.; Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2010, p 1.
- [21]Slavin, W. Graphite furnace AAS for biological materials. *Science of the Total Environment*. 1988, 71, 17.
- [22]Tsalev, D.L.; Slaveykova, V.I.; Lampugnani, L.; D'Ulivo, A.; Georgieva, R.; *Spectrochim. Acta Part B* **2000**, 55, 473.
- [23]Vassileva, E.; Baeten, H.; Hoenig, M.; *Fresenius J Anal Chem.* **2001**, 369, 491.
- [24]Dědina, J.; Tsalev, D.L.; *Hydride Generation Atomic Spectrometry*, John Wiley, Chichester, 1995.
- [25]Laborda, F.; Bolea, E.; Castillo, J.R.; *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 388, 743.
- [26]Guo, X.; Sturgeon, R.E.; Mester Z.; Gardner, G.J.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2092.
- [27]Yin, Y.; Liu, J.; Jiang, G.; *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 1672.
- [28]Matoušek, T.; *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 388, 763.
- [29]Dědina, J.; Flow methods in gas-liquid separations. *Analytical Spectroscopy Library*, 9, 1999, 237-273.
- [30]Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*; Wiley-VCH, Weinheim, 3^a ed., 1999
- [31]Pereira, R.; Sanz-Medel, A.; Flow Injection Analysis Techniques in Atomic Spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2010, 2–21.
- [32]Dědina, J.; *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, 62, 846.
- [33]Matusiewicz, H.; Sturgeon, R.E.; *Spectrochim. Acta B* **1996**, 51, 377.
- 34Torres, D.P.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, 20, 289.
- 35Kaercher, L.E.; Goldschmidt, F.; Paniz, J.N.G.; Flores, E.M.F.; Dressler, V.L.; *Spectrochim, Acta, Part B* **2005**, 60, 705.
- [36]Flores, E.M.M.; Welz, B.; Curtius A.J.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2001**, 56, 1605
- [37]Torres.; D.P.; Dittert, I.M.; Höhn, H.; Frescura, V.L.A.; Curtius A.J.; *Microchem. J.* **2010**, 96, 32.

-
- [38]Tsalev, D.L.; Lampugnani, L.; D'Ulivo, A.; Petrov Jr, I.I.; Georgieva, R.; Marcucci, K.; Zamboni, R.; *Microchem. J.* **2001**, 70, 103.
- [39]Schneider, M.; Pereira, E.R.; Castilho, I.N.B.; Carasek, E.; Welz, B.; Martens, I.B. G.; *Microchem. J.* **2016**, 125, 50.
- [40]Tyson, J.F.; Sundin, N.G.; Hanna, C.P.; McIntosh, S.A.; *Spectrochim. Acta, Part B* **1997**, 52, 1773.
- [41]Dočekal, B.; Dědina, J.; Krivan, V.; *Spectrochim. Acta Part B* **1997**, 52, 787.
- [42]Bendicho, C.; Pena, F.; Costas, M.; Gil, S.; Lavilla, I.; *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 681.
- [43]Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J.; Sturgeon, R.E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 837.
- [44]He, Y.; Hou, X.; Zheng, C.; Sturgeon, R.E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 769.
- [45]Zheng, C.; Wu, L.; Ma, Q.; Lv, Y.; Hou, X.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 514.
- [46]Garcia, M.; Figueroa, R.; Lavilla, I.; Bendicho, C.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, 21, 582.
- [47]Sturgeon, R.E.; Grinberg, P.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, 27, 222.
- [48]Takatani, T.; Fitzgerald, N.; Galbraith, J.M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 859.
- [49]Qin, D.; Gao, F.; Zhang, Z.; Zhao, L.; Liu, J.; Ye, J.; Li, J.; Zheng, F.; *Spectrochim. Acta B* **2013**, 88, 10.
- [50]Sturgeon, R.E.; *Anal. Chem.* **2015**, 87, 3072.
- [51]Li, Y.; Zheng, C.; Ma, Q.; Wu, L.; Hu, C.; Hou, X.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, 21, 82.
- [52]de Jesus, A.; Zmozinski, A.V.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; da Silva, M.M.; *Microchem. J.* **2013**, 110, 227.
- [53]López-Rouco, A.; Stanisz, E.; Matusiewicz, H.; Lavilla, I.; Bendicho, C.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 1026.
- [54]Lisboa, M.T.; Clasen, C.D.; Oreste, E.Q.; Schwingel, R.A.; Vieira, M.A.; *Energy & Fuels* **2015**, 29, 1635.
- [55]Zheng, C.; Li, Y.; He, Y.; Ma, Q.; Hou, X.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, 20, 746.
- [56]Chen, G.; Lai, B.; Mei, N.; Liu, J.; Mao, X.; *Spectrochim. Acta B* **2017**, 137, 1.
- [57]Liu, R.; Xu, M.; Shi, Z.; Zhang, J.; Gao, Y.; Yang, L.; *Talanta* **2013**, 117, 371.
- [58]Gao, Y.; Shi, Z.; Zong, Q.; Wu, P.; Su, J.; Liu, R.; *Anal. Chim. Acta* **2014**, 812, 6.
- [59]Francisco, B.B.A.; Rocha, A.A.; Grinberg, P.; Sturgeon, R.E.; Cassella, R.J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, 31, 751.
- [60]de Jesus, A.; Sturgeon, R.E.; Liu, J.; da Silva, M.M.; *Microchem. J.* **2014**, 117, 100.

-
- [61]Silva, C.S.; Oreste, E.Q.; Nunes, A.M.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, 27, 689.
- [62]Santos, E.J.; Herrmann, A.B.; dos Santos, A.B.; Baika, L.M.; Sato, C.S.; Tormen, L.; Curtius, A.J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, 25, 1627.
- [63]He, H.; Zhu, Z.; Zheng, H.; Xiao, Q.; Jin, L.; Hu, S.; *Microchem. J.* **2012**, 104, 7.
- [64]Rybínová, M.; Červený, V.; Rychlovský, P.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, 30, 1752.
- [65]Rybínová, M.; Červený, V.; Hraníček, J.; Rychlovský, P.; *Microchem. J.* **2016**, 124, 584.
- [66]D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E.; Wang, Q.; Welz, B.; *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83, 1283.
- [67]Shaltout, A.A.; Castilho, I.N.B.; Welz, B.; Carasek, E.; Martens, I.B.G.; Martens, A.; Cozzolino, S.M.F.; *Talanta* **2011**, 85, 1350.
- [68]Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; *Food Chem.* **2014**, 159, 414.
- [69]Bohrer, D.; Becker, E.; Nascimento, P.C.; Dessuy, M.B.; Carvalho, L.M.; *Food Chem.* **2007**, 104, 868.
- [70]Lavilla, I.; González-Costas, J. M.; Bendicho, C.; *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 591, 225.
- [71]Hou, X.; Ai, X.; Jiang, X.; Deng, P.; Zheng, C.; Lv, Y.; *Analys* **2012**, 137, 686.
- [72]Campanella, B.; Menciassi, A.; Onor, M.; Ferrari, C.; Bramanti, E.; D'Ulivo, A.; *Spectrochim. Acta Part B* **2016**, 126, 11.
- [73]Lopes, G.S.; Sturgeon, R.E.; Grinberg, P.; Pagliano, E.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2017**. No prelo. Advance Article. DOI 10.1039/C7JA00311K
- [74]Nováková, E.; Linhart, O.; Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; *Spectrochim. Acta Part B* **2017**, 134, 98.
- [75]Suzuki, T.; Sturgeon, R.E.; Zheng, C.; Hioki, A.; Nakazato, T.; Tao, H.; *Anal. Sci.* **2012**, 28, 807.
- [76]de Jesus, H.C.; Grinberg, P.; Sturgeon, R.E.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, 31, 1590.
- [77]Matoušek, T.; Johansson, M.; Dědina, J.; Frech, W.; *Spectrochim. Acta Part B* **1999**, 54, 631.
- [78]Compendium of Chemical Terminology - Gold Book, disponível em <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>. - Página acessada em 11/07/17
- [79]Madden, J.T.; Fitzgerald, N.; *Spectrochim. Acta Part B* **2009**, 64, 925.
- [80]He, C.; Cheng, G.; Zheng, C.; Wu, L.; Lee, Y-III.; Hou, X.; *Anal. Methods* **2015**, 7, 3015.
- [81]PNCRC - Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal (2011). Instrução Normativa, Nº 24.

-
- [82]Gao, Y.; Yang, W.; Zheng, C.; Hou, X.; Wu, L.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, 26, 126.
- [83]Chelegão,R.; Carioni,V.M.O.; Naozuka,J.; Nomura,C.S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 27, 712.
- [84]Zmozinski, A.V. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
- [85]Kumar, A.R.; Riyazuddin, P.; *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 166.
- [86]Shaltout, A.A.; Castilho, I.N.; Welz, B.; Carasek, E.; Martens, I.B.G.; Martens, A.; Cozzolino, S.M.; *Talanta* **2011**, 85, 1350.
- [87]Ieggli, C.V.S.; Bohrer, D.; Noremberg, S.; Nascimento, P.C.; Carvalho, L.M.; Vieira, S.L.; Reis, R.N.; *Spectrochim. Acta Part B* **2009**, 64, 605.
- [88]Oliveira, A.P.; Neto, J.A.G.; Nóbrega, J.A.; Correia, P.R.M.; Oliveira, P.V.; *Food Chem.* **2005**, 93, 355.
- [89]Aleixo, P.C.; Nóbrega, J.A.; Júnior, D.S.; Muller, R.C.; *Quím. Nova* **2000**, 23, 310.
- [90]Virgilio, A.; Schiavo, D.; Nóbrega, J.A.; Donati, G.L.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, 31, 1216.
- [91]Sousa, R.A.D.; Borges Neto, W.; Poppi, R.J.; Baccan, N.; Cadore, S.; *Quím. Nova* **2006**, 29, 654.
- [92]Stafiński, M.; Wieczorek, M.; Kościelniak, P.; *Talanta* **2013**, 117, 64.
- [93]AOAC International., Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf - Página acessada em 05/09/2017.
- [94]Pearse, R.W.B.; Gaydon, A.G. *The Identification of Molecular Spectra*, 4a ed., Chapman & Hall: Londres, 1976.
- [95]Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, 137.
- [96]Yang, W.; Gao, Y.; Wu, L.; Hou, X.; Zheng, C.; Zhu, X.; *Microchim. Acta* **2014**, 181, 197.
- [97]Zheng, C.; Yang, L.; Sturgeon, R.E.; Hou, X.; *Anal. Chem.* **2010**, 82, 3899.
- [98]Rybínová, M.; Musil, S.; Červený, V.; Vobecký, M.; Rychlovský, P.; *Spectrochim. Acta Part B* **2016**, 123, 134.
- [99]Tan, T.T.; Beydoun, D.; Amal, R.; *J. Mol. Catal. A Chem.* **2003**, 202, 73.