

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

LARISSA MAYARA ALVES DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS
PARA SUPLEMENTOS DIETÉTICOS E DETERMINAÇÃO DE
SELÊNIO TOTAL**

Porto Alegre, junho de 2024

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

LARISSA MAYARA ALVES DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS
PARA SUPLEMENTOS DIETÉTICOS E DETERMINAÇÃO DE
SELÊNIO TOTAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof.^a Dr.^a Juliana Severo Fagundes Pereira
Orientadora

Porto Alegre, junho de 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Larissa Mayara Alves de
Investigação de métodos de preparo de amostras para
suplementos dietéticos e determinação de selênio total
/ Larissa Mayara Alves de Oliveira. -- 2024.
92 f.
Orientadora: Juliana Severo Fagundes Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Suplemento dietético. 2. Decomposição de
amostras. 3. Selênio. 4. GFAAS. I. Pereira, Juliana
Severo Fagundes, orient. II. Título.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 01/2022 e 06/2024, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Prof.^a Dr.^a Juliana Severo Fagundes Pereira. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ FREDERICO RODRIGUES**
Data: 11/06/2024 15:01:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Frederico Rodrigues

Documento assinado digitalmente
 **DIRCE POZEBON**
Data: 11/06/2024 13:43:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Dirce Pozebon

Documento assinado digitalmente
 **EMILENE MENDES BECKER**
Data: 11/06/2024 14:41:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Emilene Mendes
Becker

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA SEVERO FAGUNDES PEREIRA**
Data: 11/06/2024 15:06:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Juliana Severo
Fagundes Pereira

Documento assinado digitalmente
 **LARISSA MAYARA ALVES DE OLIVEIRA**
Data: 11/06/2024 20:22:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Larissa Mayara Alves de Oliveira

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À professora Juliana Severo, minha mais profunda gratidão por cada ensinamento durante a pesquisa de mestrado. Sua orientação, paciência e acolhimento foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao professor Diogo Pompéu, agradeço pela disponibilidade e por compartilhar seu conhecimento, que enriqueceram este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Luiz Frederico Rodrigues, Prof.^a Dr.^a Dirce Pozebon e Prof.^a Dr.^a Emilene Mendes Becker, meu muito obrigada pela participação e pelas contribuições valiosas.

À Marinara e ao Luan, amigos que a UFRGS me trouxe, agradeço por cada momento de convivência e amizade durante os meses de atividades do projeto.

Aos técnicos do instituto de Química pelos ensaios disponibilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas amigas, Ana Paula, Josélia e Darlene, agradeço a amizade permanente, mesmo diante da distância que nos separa.

À minha família, meus pais, Marcilene Alves e Luís Oliveira, e meus irmãos, Otávio (*in memoriam*), Layane e Laís, dedico todo o meu amor e gratidão. Vocês foram o apoio essencial em cada etapa deste caminho, e sou muito grata pelo incentivo constante.

Ao Igor, minha gratidão por todo o amor, apoio e por ser meu porto seguro. Sua presença e dedicação tornaram essa jornada mais especial.

Por fim, à Deus pela força, ânimo e coragem que me concedeu para superar os desafios da vida.

RESUMO

Neste estudo, foram otimizados três métodos de preparo de amostras em sistema fechado para a decomposição de suplementos dietéticos visando a subsequente quantificação de selênio por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). As amostras de suplementos investigados incluíam formulações multiminerais, multivitamínicas, probiótico e levedura enriquecida com selênio. Diferentes condições da solução de decomposição com ácido nítrico diluído foram avaliadas nos métodos de decomposição. Na decomposição por via úmida com aquecimento condutivo (bloco digestor), a condição selecionada foi 250 mg de amostra em ácido nítrico 5 mol L⁻¹ e 2 mL de H₂O₂ 30% (m/m). Na decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MWAD), a condição selecionada foi de 450 mg de amostra em ácido nítrico 2,5 mol L⁻¹ e 3 mL de H₂O₂ 30% (m/m). Na combustão iniciada por micro-ondas (MIC), foi estabelecido o uso de 200 mg de amostra com 300 mg de celulose microcristalina e ácido nítrico 0,25 mol L⁻¹ como solução absorvedora. Na GFAAS foi utilizado um modificador químico de 5 µg de Pd. As temperaturas de pirólise e atomização foram de 1200 °C e 2000 °C, respectivamente. O modificador químico empregado foi 5 µg de Pd. Os limites de detecção (LOD) para o selênio foram de 1,71 e 0,65 µg g⁻¹ para decomposição em bloco digestor e MWAD, respectivamente. Para a MIC, o LOD foi de 0,08 µg g⁻¹. A exatidão foi avaliada analisando-se o material de referência certificado de levedura selenizada SELM-1 em todos os métodos de decomposição empregados, sendo obtidos a concordância de 96,7%, 98,0% e 99,5% para o bloco digestor, MWAD e MIC, respectivamente. Com exceção de uma amostra, os resultados da quantificação de selênio obtidos pelos métodos de decomposição por via úmida e a MIC foram concordantes em um nível de confiança de 95% (teste *t-Student*).

Palavras-chave: suplemento dietético, decomposição de amostras, Se, GFAAS.

ABSTRACT

In this study, three sample preparation methods in closed system were optimized for the decomposition of dietary supplements for subsequent selenium quantification by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The supplement samples investigated included multimineral, multivitamin, probiotic and selenium-enriched yeast. Different conditions of the decomposition solution with diluted nitric acid were tested in the sample decomposition methods. In the heating block, the best conditions for wet digestion were 250 mg of sample in 5 mol L⁻¹ nitric acid and 2 mL of 30% (w/w) H₂O₂. In microwave-assisted wet digestion (MWAD), the selected condition was 450 mg of sample in 2.5 mol L⁻¹ nitric acid and 3 mL of 30% (w/w) H₂O₂. For microwave-induced combustion (MIC), the use of 200 mg of sample and 300 mg of microcrystalline cellulose and 0.25 mol L⁻¹ nitric acid as the absorbing solution was established. In GFAAS, a chemical modifier of 5 µg of Pd was used. The pyrolysis and atomization temperatures were 1200 °C and 2000 °C, respectively. The limits of detection (LOD) for selenium were 1.71 and 0.65 µg g⁻¹ after digestion by heating block and MWAD, respectively. For MIC, the LOD was 0.08 µg g⁻¹. The accuracy was assessed using the selenium-enriched yeast certified reference material SELM-1 across all employed decomposition methods, resulting in agreement ranging from 96.7%, 98.0%, and 99.5% for the heating block, MWAD, and MIC, respectively. Except for one sample, the selenium quantification results obtained by wet digestion methods and MIC were consistent at a 95% confidence level (*Student's t-test*).

Keywords: dietary supplement, sample decomposition, Se, GFAAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das reações de regeneração do HNO_3 promovidas pelo O_2 no interior do frasco reacional. Adaptado de Bizzi e colaboradores. ⁴⁸	26
Figura 2. Frasco de quartzo e suporte empregados no procedimento de combustão iniciada por micro-ondas. Adaptado de Flores e colaboradores. ⁵²	29
Figura 3. Diagrama conceitual de um tubo de grafite aquecido transversalmente submetido nas etapas de secagem, pirólise e atomização. Durante a atomização em alta temperatura, o analito é vaporizado e atomizado, permitindo o registro do sinal de absorbância. Adaptado de Borges e Holcombe. ⁶⁰	32
Figura 4. Amostras de suplementos dietéticos no qual foi realizada a determinação de selênio por GFAAS. Da esquerda para direita são as amostras A, B, C, D e E, respectivamente.....	40
Figura 5. Métodos de decomposição de amostras avaliados.....	41
Figura 6. Suporte de quartzo (modelo não comercial) utilizado para colocação das pastilhas das amostras.....	44
Figura 7. Comparação dos digeridos resultantes da decomposição da amostra A com aquecimento condutivo, após a adição de HNO_3 7 mol L^{-1} (à esquerda) e HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 (à direita), obtidos pelo programa de aquecimento com 140 °C e 60 min de permanência.....	48
Figura 8. Comparação dos digeridos resultantes da decomposição da amostra A com aquecimento condutivo em dois programas de temperatura no bloco digestor, sendo: HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 , obtidas pelo programa de temperatura com 140 °C e 60 min de permanência (à esquerda) e HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 , obtidas pelo programa de temperatura com 160 °C e 120 min de permanência (à direita).....	49
Figura 9. Avaliação da decomposição de 250 mg da amostra A em diferentes concentrações de HNO_3 , com adição de 2 mL de H_2O_2 , utilizando aquecimento condutivo em bloco digestor. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para $n = 2$	51

Figura 10. Avaliação da decomposição de 350 mg da amostra A em diferentes concentrações de HNO ₃ com 2 mL de H ₂ O ₂ , utilizando o método MWAD. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.....	52
Figura 11. Avaliação de HNO ₃ 2,5 mol L ⁻¹ e adição de diferentes volumes de H ₂ O ₂ na eficiência de decomposição de 350 mg da amostra A, utilizando o método MWAD. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.	54
Figura 12. Avaliação da decomposição de diferentes massas de amostra A com HNO ₃ 2,5 mol L ⁻¹ e 3 mL de H ₂ O ₂ , utilizando o método MWAD. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.....	55
Figura 13. Perfil da pressão interna dos frascos obtidos da decomposição de 350, 450 e 550 mg de amostra A com HNO ₃ 2,5 mol L ⁻¹ e 3 mL de H ₂ O ₂ , utilizando o método MWAD.	56
Figura 14. Avaliação de massas de celulose microcristalina na decomposição por MIC da amostra A (200 mg), utilizando 20 bar de O ₂ e HNO ₃ 2,5 mol L ⁻¹ como solução absorvedora. Determinação de Se foi feita por GFAAS. As barras e a linha representam a massa de celulose e a pressão máxima atingida na combustão, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.	58
Figura 15. Avaliação das diferentes concentrações de HNO ₃ e somente água como solução absorvedora na MIC. A determinação de Se foi feita por GFAAS. As barras representam a quantidade de selênio na amostra A após a MIC. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.	60
Figura 16. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Se em solução padrão contendo 50 µg L ⁻¹ de Se e solução obtida após decomposição da amostra A por MWAD, usando a mistura de Pd-Mg e apenas Pd como modificadores químicos. As barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).	70
Figura 17. Comparação dos perfis de absorbância do analito (—) e fundo (---) para os modificadores de Pd e Pd-Mg, da esquerda para a direita,	

respectivamente. A temperatura de pirólise foi fixada em 1200 °C e de atomização em 2000 °C.	72
Figura 18. Efeito da matriz na sensibilidade das curvas de calibração externa (●) e adição padrão (●).....	74
Figura 19. Perfis de sinal de absorvância analito (—) e fundo (---) nos digeridos da amostra A após decomposição por: bloco digestor, MWAD e MIC, de cima para baixo, respectivamente. Temperatura de pirólise em 1200 °C e atomização em 2000 °C.	76
Figura 20. Pastilha da amostra E antes e após a MIC, da esquerda para a direita.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos suplementos dietéticos analisados e teor de selênio informado nos respectivos rótulos.....	39
Tabela 2. Programa de temperatura utilizado na decomposição com ácido nítrico diluído em sistema fechado com aquecimento condutivo.....	42
Tabela 3. Programa de temperatura para a decomposição das amostras de suplementos por MWAD.	43
Tabela 4. Programa de temperatura para a decomposição das amostras de suplementos por MIC.	44
Tabela 5. Programa de temperatura para a determinação de Se por GFAAS.	46
Tabela 6. Parâmetros de mérito dos métodos de decomposição com ácido diluído para preparo de amostras de suplementos dietéticos e posterior quantificação de Se por GFAAS.....	62
Tabela 7. Quantificação de Se em digerido da amostra A. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para o bloco digestor e MWAD em triplicata (n = 3) e a MIC, em quadruplicata (n = 4).	64
Tabela 8. Concentração de Se determinada por GFAAS em CRM SELM-1 em digerido da amostra A após diferentes métodos de decomposição. Os resultados são a média e o desvio padrão para os métodos via úmida em triplicata (n = 3) e a MIC, em quadruplicata (n = 4).	65
Tabela 9. Estimativa de tempo, em minutos, para execução das etapas de preparo da amostra A para os procedimentos de decomposição empregados.	66
Tabela 10. Comparação dos métodos otimizados para decomposição da amostra A. Os resultados estão expressos em média.	68
Tabela 11. Concentração de Se em suplementos dietéticos após emprego de diferentes métodos de decomposição. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para o bloco digestor e MWAD em triplicata (n = 3) e a MIC, em quadruplicata (n = 4).	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

ANOVA – Análise de variância, do inglês, *analysis of variance*

CRM – Material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*

EFSA – Autoridade europeia para a segurança dos alimentos, do inglês, *european food safety authority*

IDR – Ingestão diária recomendada

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DSC – Compêndio de suplementos alimentares da USP, do inglês, *USP dietary supplement compendium*

DSHEA – Lei de Saúde e Educação de Suplementos Dietéticos, do inglês, *dietary supplement health and education act*

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, *flame atomic absorption spectrometry*

FDA – Administração federal de medicamentos, do inglês, *federal drug administration*

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HG AAS – Geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica, do inglês, *hydride generation coupled atomic absorption spectrometry*

HR-CS GFAAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, do inglês, *high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HG-ICP OES – Geração de hidretos acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *hydride generation coupled inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

IC-DC – Cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta, do inglês *ion chromatography with direct conductivity detection*

ICP MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ISE – Eletrodo de íon seletivo, do inglês, *ion-selective electrode*

LC-ICP MS – Cromatografia líquida e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry*

LOD – Limite de detecção, do inglês, *limit of detection*

LOQ – Limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*

m_0 – Massa característica

MWAD – Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted wet digestion*

MIC – Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, *microwave-initiated combustion*

NAM – Academia Nacional de Medicina dos Estados Unidos do inglês, National Academy of Medicine

PPB – Partes por bilhão

PTFE – Politetrafluoretileno

RA – Acidez residual, do inglês, *residual acidity*

RCC – Carbono orgânico residual, do inglês, *residual carbon content*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês, *solid phase micro-extraction*

STPF – Forno com plataforma de temperatura estabilizada, do inglês, *stabilized temperature platform furnace*

THGA – tubo de grafite com aquecimento transversal, do inglês, *transversely heated graphite atomizer*

UL – Limite superior tolerável de ingestão, do inglês, *tolerable upper intake level*

WHO – Organização mundial da saúde, do inglês, *world health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 SELÊNIO	18
2.2 SUPLEMENTAÇÃO DE SELÊNIO E EFEITOS NA SAÚDE HUMANA	19
2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	21
2.4.1 <i>Decomposição por via úmida com aquecimento condutivo</i>	22
2.4.2 <i>Decomposição por via úmida assistido por radiação micro-ondas (MWAD)</i>	24
2.4.3 <i>Emprego de ácidos diluídos e radiação micro-ondas em sistema fechado</i>	25
2.4.4 <i>Decomposição por combustão</i>	27
2.4.5 <i>Combustão iniciada por radiação micro-ondas</i>	28
2.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE (GFAAS)	30
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	36
4.2 MATERIAIS E REAGENTES	37
4.3 AMOSTRAS E MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO	38
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	40
4.5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DECOMPOSIÇÃO PELOS MÉTODOS EMPREGADOS	45
4.6 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR GFAAS	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1 Decomposição com ácido nítrico em sistema fechado com aquecimento condutivo	48
5.2 Decomposição com ácido diluído assistida por radiação micro-ondas	52
5.2.1 <i>Avaliação da concentração do ácido nítrico diluído</i>	52
5.2.2 <i>Avaliação do volume de peróxido de hidrogênio</i>	53
5.2.3 <i>Avaliação da massa de amostra</i>	55

5.3 Decomposição com ácido diluído em combustão iniciada por radiação micro-ondas.....	57
5.3.1 <i>Avaliação da massa de celulose.....</i>	57
5.3.2 <i>Avaliação da concentração de ácido nítrico diluído como solução absorvedora.....</i>	59
5.4 PARÂMETROS DE MÉRITO.....	61
5.4.1 <i>Limites de detecção e quantificação.....</i>	61
5.4.2 <i>Avaliação da exatidão.....</i>	63
5.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO.....	65
5.6 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE.....	69
5.6.1 <i>Estudo dos modificadores químicos e programa de temperatura ...</i>	69
5.6.2 <i>Avaliação de interferência provocada por efeito de matriz</i>	73
5.6.3 <i>Avaliação da massa característica.....</i>	75
5.6.4 <i>Avaliação dos perfis de absorbância do Se nos digeridos.....</i>	75
5.7 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM OUTRAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS	78
6 CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O selênio é um micronutriente essencial na dieta humana, pois atua em diversos processos metabólicos, tais como a reprodução, síntese de DNA, defesa antioxidante, metabolismo do hormônio tireoidiano e proteção contra danos oxidativos e infecções.^{1,2} Fontes primárias de selênio incluem alimentos de origem animal e vegetal,³ no entanto, a variação na concentração do mineral nos alimentos é influenciada pelas características do solo, práticas agrícolas e o clima.⁴ Em casos de deficiência dietética, a ingestão de suplementos alimentares torna-se uma alternativa.

Suplementos dietéticos, também chamados de suplementos nutricionais ou alimentares, são produtos isentos de prescrição médica formulados para suplementação da dieta habitual, oferecendo quantidades adequadas de compostos bioativos.⁵ Os suplementos alimentares que contêm selênio são comercializados em formulações vitamínicas e minerais, aminoácidos como a selenometionina, probiótico como *Lactobacillus acidophilus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com selênio.^{6,7} A dosagem adequada de selênio em suplementos alimentares é importante para garantir benefícios à saúde e evitar riscos. Isso porque o selênio apresenta uma estreita margem entre nível essencial e potencialmente tóxico,⁸ exigindo cuidado na ingestão e verificação da quantidade de micronutriente fornecido pelo produto.

Com a crescente popularidade dos suplementos dietéticos de selênio, surgem preocupações relacionadas à segurança e qualidade desses produtos. Dada a falta de regulamentação rigorosa para suplementos dietéticos, as preocupações se estendem à qualidade, condições de armazenamento e o teor de selênio nos suplementos.⁹

Para determinar a concentração de Se, previamente à etapa de quantificação, é necessário aplicar um método de preparo de amostra adequado. Tendo em vista menor risco de contaminação e perdas de analito, a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MWAD) tem sido amplamente empregado em espectrometria atômica.¹⁰ Outros métodos de decomposição em sistema fechado também podem ser utilizados, a depender da disponibilidade de equipamentos e recursos do laboratório. Na quantificação monoelementar, a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de

grafite (GFAAS) é preferida devido à sua alta sensibilidade e alcance de baixos limites de detecção.¹¹

Neste estudo, foram otimizados dois métodos de decomposição por via úmida e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para amostras de suplementos dietéticos visando à posterior quantificação do analito por GFAAS. Na decomposição por via úmida por aquecimento condutivo (bloco digestor) foi avaliada a adição de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações de ácido nítrico. Na MWAD, além da condição anterior, também foi investigado o volume de peróxido de hidrogênio e a massa da amostra. Na MIC, foram avaliadas diferentes concentrações de ácido nítrico como solução absorvedora e a massa de celulose microcristalina como auxiliar de combustão. No método de quantificação de selênio por GFAAS foram avaliados o uso de modificadores químicos de Pd e Pd-Mg, efeito de interferência da matriz e o perfil do sinal do analito e do fundo das soluções resultantes das diferentes decomposições. Os programas de temperaturas de pirólise e atomização também foram investigados. A exatidão dos métodos de decomposição foi avaliada analisando o material de referência certificado de levedura enriquecida com selênio, SELM-1, e pela comparação dos resultados da decomposição por via úmida com a MIC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SELÊNIO

O selênio é um elemento não-metal, localizado no grupo 16 da tabela periódica, pertencente à família dos calcogênios. Possui número atômico 34, massa atômica $78,96 \text{ g mol}^{-1}$ e estados de oxidação variando de -2 a +6. As formas inorgânicas predominantes do selênio em alimentos são o selenito (SeO_3^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}) e seleneto (Se^{2-}), enquanto as espécies orgânicas incluem a selenocisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$), selenometilcisteína ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{Se}$) e selenometionina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$), aminoácidos onde o átomo de enxofre da cisteína e da metionina é substituído por selênio.^{12,13}

No organismo humano, as atividades biológicas do selênio são realizadas pelas selenoproteínas, grupo de proteínas que possuem a selenocisteína em seu sítio ativo, entre elas, enzimas como a glutathione peroxidase (GPx), iodotironina deiodinase (DIOs) e tioredoxina redutase (TrxR).² As selenoproteínas atuam na reprodução, síntese de DNA, metabolismo do hormônio tireoidiano e proteção contra danos oxidativos e infecções.^{1,2}

Apesar de ser um micronutriente essencial para a saúde humana, o selênio encontra-se num intervalo estreito entre o nível de concentração essencial e potencialmente tóxico.^{4,8} A deficiência de selênio está associada à doença de Keshan, uma cardiomiopatia (aumento e enfraquecimento do músculo cardíaco) que afeta predominantemente crianças e mulheres. A denominação da doença foi atribuída em referência a uma província da China, onde a doença foi endêmica devido ao solo pobre em Se.^{1,8} Já o excesso, pode favorecer o desenvolvimento de selenose, condição caracterizada pela ocorrência de perda de cabelo, unhas quebradiças, distúrbios gastrointestinais e hormonais, erupções cutâneas, entre outros sintomas.¹⁴

As fontes primárias de selênio na dieta são alimentos de origem animal e vegetal.³ No entanto, o teor desse micronutriente presente nos alimentos varia significativamente dependendo do local de cultivo das plantas e da criação dos animais, pois fatores como a geologia do solo, pH, práticas agrícolas e o clima influenciam na quantidade do mineral absorvido pelas plantas e por animais.^{15,4} Por conta disso, em casos de insuficiência do micronutriente na dieta, torna-se

necessário recorrer à suplementação. As principais estratégias de suplementação incluem o uso de fertilizantes enriquecidos com selênio no solo, a suplementação de animais de produção com selênio e a ingestão humana de suplementos dietéticos contendo selênio.^{16,3} No entanto, entre essas opções, o uso de suplementos dietéticos é a única forma em que pode ser prescrito ou autoadministrado.

2.2 SUPLEMENTAÇÃO DE SELÊNIO E EFEITOS NA SAÚDE HUMANA

Suplementos dietéticos, também chamados de suplementos nutricionais ou alimentares, são produtos isentos de prescrição médica e formulados para suplementar a dieta habitual, oferecendo quantidades concentradas de compostos bioativos, vitaminas e/ou minerais, extratos botânicos ou ervas, aminoácidos e probióticos, isolados ou combinados.⁵ As formas farmacêuticas em que os suplementos podem ser comercializados são de administração oral, como: comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, pós, barras, gomas e líquidos.^{5,17}

Em suplementos alimentares que contém selênio, os ingredientes comuns que fornecem o micronutriente são os sais de selenito ou selenato, presentes em formulações vitamínicas e minerais, aminoácidos como a selenometionina (SeMet), probiótico como *Lactobacillus acidophilus* e a levedura enriquecida com selênio, obtida a partir do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em meio enriquecido com selenito.^{6,7} A biodisponibilidade e atividade biológica do selênio são dependentes de fatores como a quantidade total ingerida, espécie química, solubilidade, digestibilidade, presença de outros componentes dietéticos e do estado fisiológico do organismo.¹⁸ Em relação à nutrição humana, os compostos orgânicos têm maior biodisponibilidade, sendo absorvidos em faixas que variam de 85% a 95%, enquanto que a absorção do selênio inorgânico é mais limitada, situando-se em torno de 50%.¹⁹

Devido às suas propriedades antioxidantes e à possibilidade de auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, os suplementos dietéticos de selênio ganharam popularidade.¹⁹ Ao longo dos anos, diversos ensaios clínicos randomizados foram conduzidos em seres humanos com o objetivo de avaliar a eficácia do selênio na redução do risco de câncer. No entanto, controvérsias persistem em relação aos resultados obtidos.

Um estudo realizado em 1996 liderado por Clark e colaboradores,²⁰ revelou que a suplementação diária de 200 µg de selênio em forma de levedura selenizada reduziu os riscos de câncer de cólon, próstata e pulmão. O ensaio também indicou uma significativa diminuição na taxa de mortalidade por câncer ao longo de 10 anos. Em 2017, Hsueh e colaboradores²¹ relataram que níveis baixos de selênio no plasma sanguíneo estavam associados a um risco de câncer de próstata 5 vezes maior, conforme evidenciado em um estudo caso-controle com 318 pacientes. Entretanto, esse resultado contrasta com as conclusões anteriormente publicadas por Lippman e colaboradores²² em 2009, no qual evidenciaram que selênio ou a vitamina E, isoladamente ou em combinação nas formulações, não preveniram o cancro da próstata em uma população de homens relativamente saudáveis. Estes resultados divergentes podem ser explicados por circunstâncias como efeitos das selenoproteínas em diferentes tecidos ou órgão específico, metabolismo da espécie química de selênio e aos níveis plasmáticos iniciais de selênio nos participantes dos ensaios.

A ingestão diária recomendada (IDR) é a quantidade de nutriente suficiente para atender à necessidade de indivíduos saudáveis, e varia de acordo com a idade, sexo e estágio da vida. Estima-se que a ingestão diária individual de selênio varia de 7 µg a 5 mg por dia.^{23,24} Isso porque a ingestão de selênio está vinculada à presença desse elemento na cadeia alimentar, o que resulta em variações na ingestão do micronutriente, e conseqüentemente, distintas orientações sobre a IDR de selênio entre os países.

Nos Estados Unidos, a Federal Drug Administration (FDA) determinou a ingestão de 55 µg para adultos.²⁵ O limite superior tolerável de ingestão (UL), ou seja, a quantidade máxima de um nutriente que pode ser consumida diariamente sem risco de efeitos adversos à saúde, é de 400 µg.¹⁴ Nos países da Europa, no qual a média de ingestão diária de selênio fica abaixo de 50 µg¹, foi estabelecido pela European Food Safety Authority (EFSA), a IDR de 70 µg para homens e mulheres adultos, e o limite tolerável de 255 µg por dia.^{26,27} No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a ingestão diária de 34 µg de selênio para adultos²⁸ e o limite máximo de 319 µg.²⁹

Diante disso, é importante assegurar a correta dosagem de selênio em suplementos alimentares para promover a saúde e evitar riscos para os consumidores. Em alguns casos, intoxicações agudas foram registradas devido

a produtos mal formulados. Conforme relatado por Clark e colaboradores,³⁰ um suplemento que continha uma quantidade excessiva de selênio orgânico, resultou em sintomas como irritabilidade, neuropatia periférica e fadiga em várias pessoas. Em 2008, a FDA emitiu um alerta aos consumidores, desaconselhando a ingestão de uma marca específica de suplemento nutricional devido a um teor de selênio que era 200 vezes superior ao indicado no rótulo. Após duas semanas, os indivíduos que ingeriram esse produto manifestaram sintomas característicos de selenose.³¹

Devido à estreita margem de segurança na suplementação de selênio, pequenos aumentos em relação às concentrações recomendadas podem acarretar efeitos adversos. Além disso, diante da falta de regulamentação rigorosa para suplementos dietéticos em comparação com produtos farmacêuticos,^{9,32} surgem preocupações quanto à qualidade, condições de armazenamento, estabilidade e o teor de selênio nesses produtos.

Dada à variabilidade na composição dos suplementos dietéticos, que podem incluir ingredientes como ervas, plantas, gelatina, proteínas, gorduras e outros componentes, a preparação de amostras para análise torna-se fundamental para obter soluções com menos interferentes e, conseqüentemente, resultados mais precisos na determinação de metais e não-metais nestes suplementos.¹⁰

Uma vez que o selênio é um elemento volátil e pode ser perdido durante a etapa de preparo da amostra, os métodos de decomposição em sistemas fechados são, preferencialmente, empregados. Dentre as opções, a MWAD é a mais recomendada, porém outros métodos de decomposição também podem ser utilizados.

2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

No preparo de amostras são utilizados uma série de procedimentos que vão desde o pré-tratamento da amostra, como secagem, moagem e seleção do tamanho de partícula, até os métodos de decomposição para degradação da matéria orgânica e mineralização dos analitos.³³ Por envolver um conjunto de etapas que consomem a maior parte do tempo na análise química, o preparo da amostra pode resultar em erros sistemáticos, como perda do analito devido à

volatilização, contaminação por diversas fontes, adsorção no material do recipiente, decomposição ou dissolução incompleta da amostra, entre outros.³⁴ Portanto, quaisquer aprimoramentos nessas etapas terão um impacto significativo na redução do tempo de análise, na precisão e exatidão dos resultados, bem como na diminuição dos custos da análise.

No processo de decomposição de amostras de suplementos dietéticos e posterior quantificação de analitos por técnicas espectrométricas, é comum empregar o ácido nítrico. Devido à sua natureza como ácido forte e agente oxidante eficaz, o ácido nítrico (HNO_3) é utilizado para destruir compostos orgânicos, convertendo-os em CO_2 e H_2O . Além disso, o ácido nítrico forma sais solúveis em água com a maioria dos elementos químicos e não causa interferências nas determinações. Para melhorar o desempenho da decomposição, o ácido nítrico pode ser utilizado em combinação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2).¹⁰

Na presente seção serão apresentados os métodos de decomposição de amostras utilizados neste trabalho, bem como os estudos publicados na literatura que tratam da aplicação desses métodos em matrizes de suplementos ou produtos similares visando a posterior determinação de metais e não-metais.

2.4.1 Decomposição por via úmida com aquecimento condutivo

A decomposição por via úmida é um método utilizado para converter os analitos em espécies solúveis e reduzir as interferências associadas à composição da matriz.^{33,34} Esse processo ocorre sob o uso de ácidos ou uma combinação de ácidos, a depender da natureza da matriz e do analito a ser quantificado, mediante uma fonte de aquecimento. Os ácidos oxidantes mais utilizados para decomposição de matrizes orgânicas são o nítrico, o sulfúrico (H_2SO_4) e o perclórico (HClO_4). Esses ácidos podem ser usados individualmente (exceto HClO_4) ou combinados entre si ou com H_2O_2 . O ácido clorídrico e o ácido fluorídrico, ambos não oxidantes, também são utilizados para decomposição de amostras inorgânicas. Contudo, o ácido clorídrico (HCl) pode causar interferências em algumas análises devido à formação de espécies voláteis com alguns analitos, enquanto o HF é mais empregado como agente complexante na dissolução de silicatos.^{33,34}

A decomposição por via úmida pode ser conduzida em sistemas abertos ou fechados sob aquecimento condutivo ou aquecimento por radiação micro-ondas. Por aquecimento condutivo, a transferência de calor ocorre por condução e é realizada por meio de superfícies eletricamente aquecidas, como um bloco digestor metálico ou de grafite revestido com teflon, equipado com um termopar embutido para controle da temperatura. Esses dispositivos são relativamente simples e frequentemente as amostras são aquecidas em frascos de vidro borossilicato, de quartzo, ou de materiais poliméricos com limite de temperatura que depende do ácido utilizado e do material que compõe os frascos.^{34,35}

Em sistemas abertos com aquecimento condutivo, o ácido nítrico muitas vezes não atua como agente oxidante suficientemente forte para promover a decomposição completa de matrizes orgânicas.³⁵ Essa limitação ocorre devido à restrição da mistura azeotrópica com água a 67% (m/m), cujo ponto de ebulição se situa em aproximadamente 121 °C à pressão atmosférica. Apesar das vantagens proporcionadas pela análise de uma maior massa de amostra e pela redução de custos operacionais, esse método é propenso à perda total ou parcial de elementos como halogênios, antimônio, arsênio, boro, mercúrio e selênio, resultante do processo de volatilização.³⁵

Nos sistemas com aquecimento condutivo, nos quais os frascos contendo o ácido e a amostra são fechados hermeticamente, a amostra sob decomposição atinge temperaturas em torno de 180 °C e pressão máxima de 20 bar.³⁴ Esse incremento de temperatura é fundamental para intensificar o poder oxidativo do ácido nítrico e a taxa de reação, estabelecendo, assim, uma correlação direta entre a eficiência da decomposição e a temperatura do ácido sob pressão.^{35,36}

Comparado ao sistema aberto, esse método reduz os riscos de contaminação, perda de analitos por volatilização e permite uma decomposição mais eficiente, com menos carbono orgânico residual (RCC). No entanto, suas desvantagens principais incluem o tempo considerável necessário para o pré-aquecimento e resfriamento de soluções e frascos, bem como o uso de menores massas de amostra e volume de ácido. Além disso, não é possível o monitoramento da pressão e temperatura das soluções durante o processo de decomposição.^{34,35}

Apesar das restrições, esses procedimentos são comumente conduzidos em laboratórios, podendo apresentar desempenhos satisfatórios na

determinação de metais em suplementos, conforme já relatado. Latif ³⁷ empregou um planejamento fatorial para aprimorar o processo de preparo de amostras de suplementos polivitamínicos e minerais. As variáveis otimizadas foram: volume de HNO₃, volume de H₂O₂ e tempo de decomposição. A decomposição foi executada em frascos fechados e aquecimento em bloco digestor a 180 °C por 120 min, usando 250 mg de amostra. A determinação de macro e micronutrientes foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para o Se, o limite de detecção (LOD) foi de 0,005 µg g⁻¹ e o limite de quantificação (LOQ) foi de 0,01 µg g⁻¹.

2.4.2 Decomposição por via úmida assistido por radiação micro-ondas (MWAD)

A radiação micro-ondas compreende uma faixa do espectro eletromagnético de comprimento de onda de 0,1 a 100 cm e possui frequência de 300 MHz a 300 GHz. Os fornos comerciais, para uso doméstico ou de laboratório, empregam micro-ondas com frequência de 2450 MHz e a potência pode variar de 600 a 1500 W.³⁸

Em decomposição por via úmida sob aquecimento por radiação micro-ondas, a energia é absorvida diretamente pela solução e materiais transparentes à radiação micro-ondas. O aquecimento é desencadeado pelos fenômenos de migração iônica e rotação de dipolos. Esses dois processos resultam em um movimento das espécies no material e, conseqüentemente, a dissipação da energia micro-ondas na forma de calor e o aumento da temperatura do meio.^{39,40}

Em sistema aberto, o forno de micro-ondas de uso doméstico foi inicialmente empregado para a decomposição de material biológico com uma mistura ácida.⁴¹ Apesar da observação do aquecimento rápido do meio reacional, somente com o advento de dispositivos dedicados aos sistemas fechados, a radiação micro-ondas passou a ser amplamente adotada na área da química analítica.^{40,42,43}

Nos sistemas fechados atuais, a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas ocorre sob pressão, de até 100 bar e temperatura de trabalho de 200 a 300 °C, o que requer o emprego de recipientes fabricados com polímeros de alta resistência, quartzo ou cerâmica. Além disso, os sistemas são equipados com sensores de pressão e de temperatura que permitem o

monitoramento das condições reacionais e garantem segurança ao operador.^{34,40,42,43} Em geral, esse método proporciona decomposições mais eficientes e seguras em comparação com o aquecimento condutivo.

No que diz respeito ao preparo de amostras, a MWAD é o método mais utilizado para amostras de suplementos alimentares.

Tumir *et. al*⁴⁴ avaliaram os níveis de contaminação por metais potencialmente tóxicos em suplementos alimentares. Amostras contendo vitaminas, minerais, ervas medicinais, à base de mel ou de origem animal foram decompostas em forno micro-ondas usando 5 mL de HNO₃ 65% (m/m) e 1 mL de H₂O₂ 30% (m/m). O tempo de aquecimento foi de 20 min, sendo o *i*) tempo de rampa de 10 min até atingir 1400 W e *ii*) tempo de permanência por 10 min. A determinação de Pb, Cd, Cr e Ni foi realizada por GFAAS, As por geração de hidretos, Hg por vapor frio e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Os limites de detecção foram 0,34, 0,034, 0,086, 0,017, 0,69, 0,34 e 1,7 µg g⁻¹ para Pb, Cd, As, Hg, Ni, Cr e Zn, respectivamente.

Santos Junior⁴⁵ e colaboradores investigaram a composição de plantas medicinais e fitomedicamentos. As amostras foram submetidas a três métodos de decomposição, sendo: via seca, via úmida por aquecimento condutivo e MWAD. Na MWAD, foram utilizados 300 mg de amostra, 7 mL de HNO₃ 65% (m/m) e 1 mL de H₂O₂ 30% (m/m). O programa de aquecimento foi executado em quatro etapas sucessivas até atingirem 1000 W de potência e temperatura de 180 °C, sendo o tempo total de aquecimento de 33 min. Entre os métodos de decomposição avaliados, a MWAD proporcionou digeridos mais límpidos, menor acidez residual (RA) e menor tempo necessário para decomposição.

2.4.3 Emprego de ácidos diluídos e radiação micro-ondas em sistema fechado

Com os avanços tecnológicos na instrumentação para decomposição de amostras e a garantia de segurança em condições extremas de temperatura e pressão, as soluções diluídas de ácido nítrico têm sido amplamente empregadas, mesmo com menor poder oxidante, sem comprometer a eficiência na decomposição de diversas matrizes.⁴⁰ Além disso, o uso de ácidos diluídos contribui para o menor consumo de reagentes, redução dos volumes de resíduo

ácido, ambos alinhados aos princípios da química verde, e a diminuição dos custos analíticos.^{46,47}

O uso de ácido nítrico diluído depende de uma série de reações que ocorrem durante a oxidação da matéria orgânica, resultando na regeneração *in situ* do ácido. A eficiência da decomposição é afetada por fatores como a presença de oxigênio na atmosfera interna no frasco de reação e o gradiente de temperatura entre a fase gasosa e líquida ao longo do frasco no início do programa de temperatura.⁴⁰ As reações químicas envolvidas são ilustradas na Figura 1.

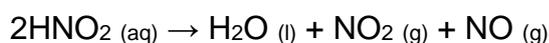
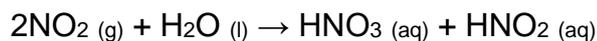
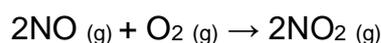
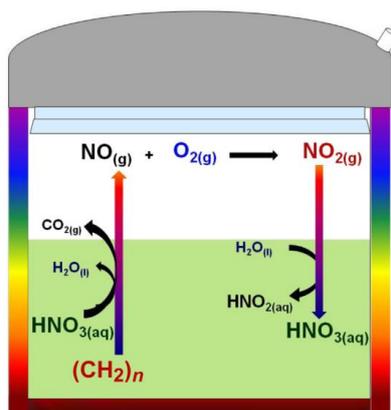


Figura 1. Representação das reações de regeneração do HNO_3 promovidas pelo O_2 no interior do frasco reacional. Adaptado de Bizzi e colaboradores.⁴⁸

Após a oxidação da matéria orgânica, um novo ciclo reacional é promovido pela regeneração do HNO_3 e permanece efetivo quando: *i*) há material orgânico passível de oxidação, produzindo $\text{NO} (\text{g})$; e *ii*) há presença de $\text{O}_2 (\text{g})$ para promover a oxidação do $\text{NO} (\text{g})$ a $\text{NO}_2 (\text{g})$. O $\text{NO}_2 (\text{g})$ gerado é absorvido na solução, desproporcionando-se para formar NO_3^- e NO_2^- . O HNO_2 se decompõe, enquanto o HNO_3 reiniciará o ciclo de oxidação da matéria orgânica. A regeneração do HNO_3 é intensificada na presença suficiente de O_2 , desde que haja material orgânico a ser oxidado.^{40,48}

Ao considerar o mecanismo de regeneração do HNO_3 , a introdução de maiores quantidades de oxigênio no frasco de decomposição pode favorecer as reações de reciclagem do ácido nítrico, potencializando a ação oxidante das soluções diluídas dele. A pressurização dos frascos com O_2 e a utilização de H_2O_2 como reagente auxiliar são as principais estratégias de adição deste gás no sistema reacional.^{40,48}

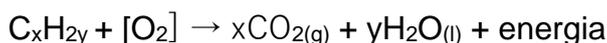
Na ausência da pressurização dos frascos, devido à indisponibilidade de um sistema de decomposição que permita a pressurização, o uso de H_2O_2 representa uma fonte alternativa de oxigênio. Suas principais vantagens incluem:^{40,48} a facilidade de manipulação e a possibilidade de execução em qualquer sistema de decomposição; disponibilidade com alto grau de pureza; uso comum em combinação com ácido nítrico; poder oxidante em meio ácido para melhorar a eficiência de decomposição; capacidade de oxidar HNO_2 a HNO_3 na fase líquida, permitindo o uso de soluções mais diluídas de ácido nítrico; e os produtos da decomposição do H_2O_2 , como água e oxigênio, não interferem na quantificação do analito.

Pereira et. al⁴⁹ propuseram uma decomposição assistida por micro-ondas com ácido diluído sob pressão de oxigênio na decomposição de amostras de suplementos esportivos e posterior determinação multielementar por ICP OES. Neste método, 1,3 g de suplemento foram digeridos em forno de micro-ondas com HNO_3 , 5 mol L^{-1} sob pressão de oxigênio de 5 bar durante 15 min. No programa de temperatura, *i*) o tempo de rampa foi 5 min para atingir 1000 W, *ii*) 1000 W por 10 min e *iii*) 0 W por 20 min para resfriamento.

2.4.4 Decomposição por combustão

Os métodos de combustão têm origem nos estudos de Lavoisier e consistem na reação entre substâncias combustíveis e oxidantes, resultando na produção de calor e na conversão de carbono e hidrogênio em dióxido de carbono e água. O material orgânico funciona como combustível, enquanto o ar atmosférico ou oxigênio atua como oxidante. Devido à exotermicidade, as reações de combustão alcançam elevadas temperaturas, possibilitando a completa eliminação da matriz orgânica da amostra. Isso resulta em digeridos límpidos, compatíveis com a maioria das técnicas de determinação de metais e

não metais.^{50,51} A equação geral de reações de combustão pode ser descrita como:⁵⁰



A combustão em sistemas abertos inclui métodos como: o forno tipo mufla, no qual a amostra é queimada em temperaturas entre 450 e 550 °C para a obtenção de um resíduo inorgânico não volátil solúvel em ácido diluído; o tubo de combustão, que envolve a volatilização quantitativa de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e halogênios, seguida pela recuperação dos produtos voláteis da fase gasosa; e a decomposição à baixa temperatura, que utiliza um plasma de oxigênio para combustão da amostra em temperaturas de até 150 °C, prevenindo a perda de alguns analitos por volatilização.^{51,52}

Já em sistemas fechados, os principais métodos de combustão são: o frasco de combustão com oxigênio (ou frasco de combustão de Schöniger), que utiliza a amostra confinada em um invólucro suspenso em um frasco erlenmeyer com atmosfera de oxigênio; a bomba de combustão, no qual uma pastilha da amostra é decomposta em um frasco de aço inoxidável na presença de excesso de oxigênio; e a combustão iniciada por radiação micro-ondas (MIC), que consiste na decomposição de amostras em frascos fechados pressurizados com oxigênio, onde a etapa de ignição é feita através da radiação micro-ondas. Em todos os métodos, os produtos gasosos gerados durante a combustão são absorvidos em uma solução absorvedora adequada.^{50,52}

2.4.5 Combustão iniciada por radiação micro-ondas

Dentre os métodos de decomposição mencionados, a MIC combina em um único sistema algumas das características da combustão, como frasco de combustão de Schöniger e bomba de combustão, e da decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas. No procedimento da MIC, um suporte de quartzo é inserido em um frasco também de quartzo, com a finalidade de alocar a amostra e proteger a tampa de PTFE contra as chamas produzidas durante a combustão.^{52,53} Os detalhes do frasco de decomposição e do suporte de quartzo para a amostra são ilustrados na Figura 2.

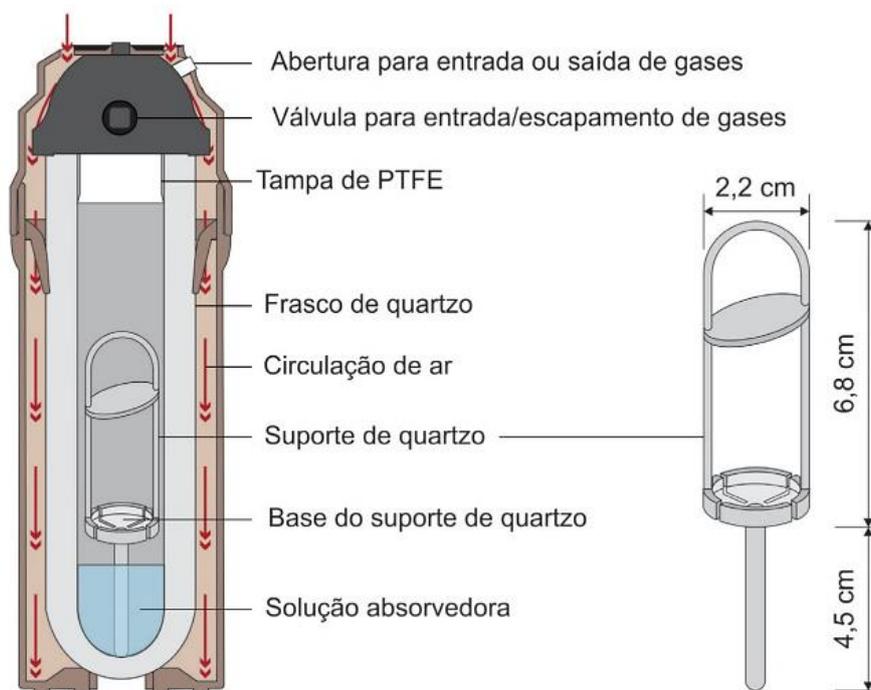


Figura 2. Frasco de quartzo e suporte empregados no procedimento de combustão iniciada por micro-ondas. Adaptado de Flores e colaboradores.⁵²

A massa de amostra, em forma de pastilha ou envolvida em um invólucro de papel, ocupa a parte inferior do suporte de quartzo contendo um disco de papel filtro umedecido com solução de nitrato de amônio. Na sequência, o suporte com a amostra é posicionado dentro dos frascos contendo um volume adequado de solução absorvedora. Após o fechamento dos frascos, estes são pressurizados com oxigênio, por cerca de 20 a 60 s, e posicionados na cavidade do forno de micro-ondas. A ignição é iniciada pela radiação micro-ondas, desencadeando uma reação exotérmica entre o papel filtro e o nitrato de amônio.^{50,52,54}

A MIC possui vantagens como:^{51,52} a combustão de até 1000 mg de amostra; uso de água, soluções ácidas ou alcalinas diluídas para retenção de analitos; baixa contaminação; eficiente decomposição de matrizes orgânicas e inorgânicas⁵⁵⁻⁵⁷ (sendo possível utilizar um auxiliar de combustão); viabilidade de realizar uma etapa de refluxo após a combustão para assegurar a eficiente remoção de analitos aderidos às paredes internas do frasco; decomposição mais rápida em comparação com a via úmida; e a obtenção de soluções compatíveis com diversos métodos de quantificação e mínimo consumo de reagentes.

Na determinação de metais em amostras de leite em pó para nutrição adulta e infantil, Pereira e colaboradores⁵⁸ avaliaram três métodos de decomposição utilizando radiação micro-ondas e ácido nítrico diluído, sendo eles: combustão focalizada induzida por micro-ondas (FMIC), MAWD e MIC, respectivamente. Os metais Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, V e Zn foram quantificados por ICP OES. Na MIC, foi utilizado 500 mg de amostra, HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora e 20 bar de O₂ na etapa de combustão. Neste método, o carbono residual nos digeridos foi inferior a 1%.

Por conta da possibilidade de utilizar ácidos diluídos e obter digeridos com baixo teor de acidez residual, Pereira⁵⁹ utilizou a MIC no preparo de amostras de suplementos dietéticos para posterior determinação de metais por cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta (IC-DC). Na decomposição foi utilizada 1000 mg de amostra, mistura de HNO₃ 1 mol L⁻¹ e HCl 1 mol L⁻¹ como solução absorvedora e 25 bar de O₂ na etapa de combustão. Apesar de ter sido observado um resíduo da combustão do suplemento no suporte dos frascos, uma etapa de refluxo de 10 min utilizando o resíduo em contato com a solução absorvedora foi suficiente para recuperação quantitativa dos analitos.

2.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE (GFAAS)

A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) é baseada no princípio da absorção atômica, no qual os átomos em seu estado fundamental e gasoso interagem com radiação eletromagnética, sendo levados ao estado excitado pela absorção de energia. A quantidade de luz absorvida é medida e a concentração do elemento na amostra pode ser calculada. A GFAAS é uma técnica analítica monoelementar de alta sensibilidade e que atinge limites de detecção na faixa de partes por bilhão (ppb) para vários elementos.^{11,60}

Na década de 70, o pioneiro equipamento comercial de GFAAS enfrentou desafios significativos. O principal obstáculo estava associado ao aquecimento longitudinal, proposto por Massmann, que não proporcionava condições isotérmicas adequadas ao atomizador, resultando em interferências espectrais, efeitos de matriz e variações de sensibilidade. Somente a partir de 1980, com uma melhor compreensão dos processos no forno, observou-se um

aprimoramento no desempenho da técnica. A introdução do aquecimento transversal⁶¹ e a utilização de uma plataforma no interior do tubo (conhecida como plataforma de L'Vov⁶²), levaram à implementação do conceito de forno com plataforma de temperatura estabilizada (STPF⁶³), contribuindo expressivamente para a exatidão e precisão da GFAAS.

O conceito de STPF consiste em diversas recomendações reunidas por Slavin e colaboradores,⁶³⁻⁶⁷ abrangendo as seguintes condições: *i*) inserção da plataforma de L'Vov no tubo de grafite, assegurando a isothermicidade no tempo e no espaço na etapa de atomização; *ii*) revestimento do tubo com grafite pirolítico, reduzindo a tendência de formação de carbetos; *iii*) taxa de aquecimento rápida durante a atomização, garantindo maior densidade de átomos no estado vapor; *iv*) uso de modificadores químicos para aumentar a volatilidade da matriz e a estabilidade térmica do analito; *v*) medições dos sinais em absorbância integrada em vez de medições de altura de pico; *vi*) desligamento do fluxo de gás durante a etapa de atomização para reduzir a difusão dos analitos, prolongando o tempo de residência da nuvem atômica no interior do tubo de grafite; *vii*) circuitos eletrônicos rápidos para evitar distorcer o sinal de absorbância; e *viii*) o uso de sistema eficiente de correção de fundo, como o corretor por efeito Zeeman. Devido à implementação dessas condições, os efeitos de interferência diminuíram consideravelmente.

Na GFAAS, uma alíquota da amostra, na ordem de μL , é inserida em um tubo de grafite pirolítico que passa por um ciclo de aquecimento para vaporizar e atomizar o analito. O aquecimento do tubo ocorre de maneira gradual em quatro etapas distintas: secagem, pirólise, atomização e limpeza. Na secagem, o tubo é aquecido para promover a evaporação do solvente conforme seu ponto de ebulição. Na etapa de pirólise, ocorre a decomposição da matriz orgânica da amostra e de alguns sais inorgânicos. Durante a atomização, o analito vaporizado é convertido em átomos livres no estado gasoso para absorção da radiação emitida por uma fonte. Por fim, a etapa de limpeza remove quaisquer resíduos remanescentes do tubo de grafite para a próxima análise. O sinal

analítico é dado pela absorvância integrada no tempo durante a atomização, ^{60,68} conforme exibido na Figura 3.

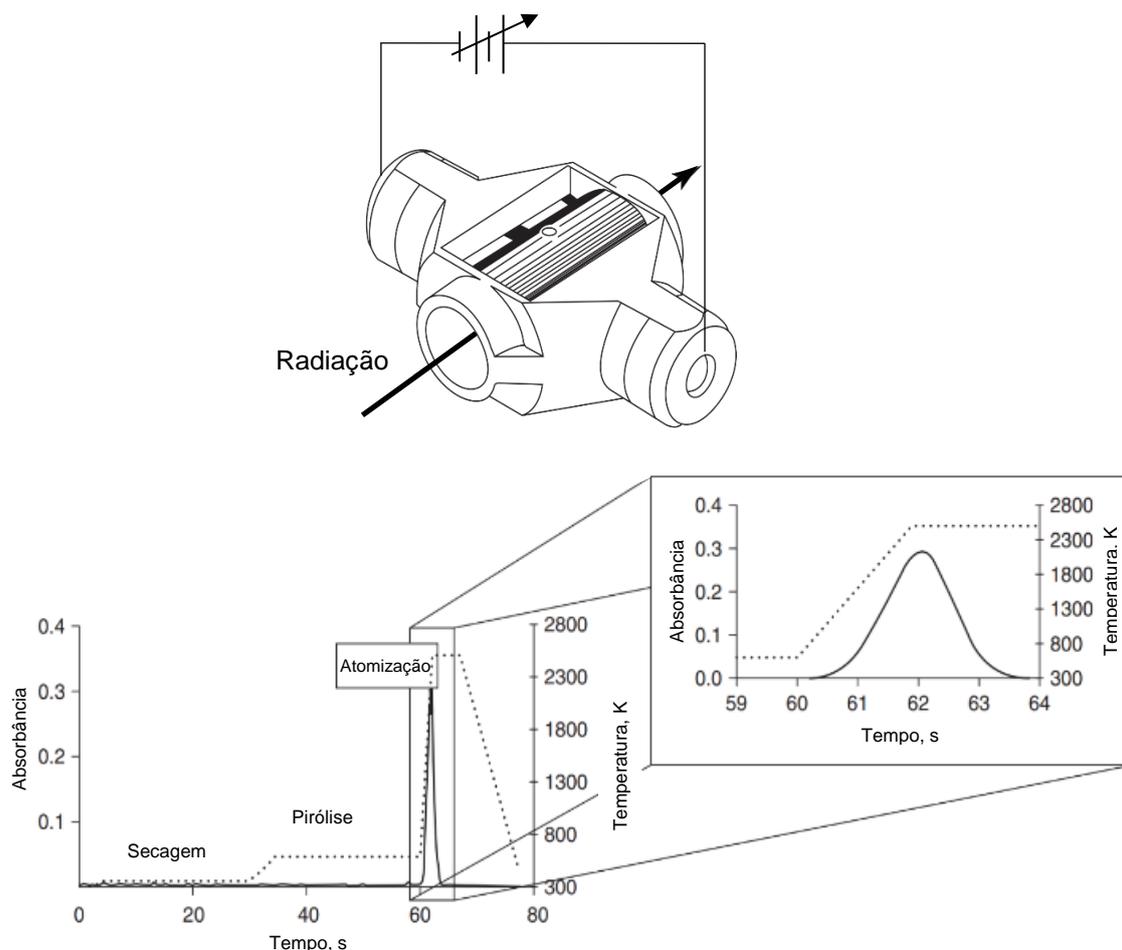


Figura 3. Diagrama conceitual de um tubo de grafite aquecido transversalmente submetido nas etapas de secagem, pirólise e atomização. Durante a atomização em alta temperatura, o analito é vaporizado e atomizado, permitindo o registro do sinal de absorvância. Adaptado de Borges e Holcombe.⁶⁰

Durante o ciclo de temperatura, é crucial evitar a perda do analito nas etapas de pirólise e atomização. Para determinar as condições ideais de temperatura, são elaboradas curvas de temperatura de pirólise e atomização mediante a variação de temperatura. Isso envolve a realização de uma série de queimas da amostra, onde a temperatura do pré-tratamento térmico é ajustada em cerca de 100°C, mantendo fixa a temperatura da pirólise enquanto a da atomização é variada, ou vice-versa. O resultado é uma curva que indica o aumento e a atenuação do sinal analítico em função da temperatura. A condição

a ser selecionada deve considerar a máxima sensibilidade e o perfil do sinal analítico.⁶⁰

Com a introdução das condições STPF, o uso de modificadores químicos tornou-se uma parte essencial no emprego da técnica GFAAS. A modificação do analito e da matriz permite temperaturas de pirólise suficientemente altas para remover a maior parte da matriz durante o pré-tratamento térmico da amostra sem perdas do analito antes da etapa de atomização.⁶⁹ Além disso, reduz significativamente uma série de interferências espectrais devido à absorção da radiação da fonte por espécies moleculares ou atômicas de concomitantes e dispersão da radiação da fonte por partículas não volatilizadas oriundas da amostra.⁷⁰

Na determinação de selênio, as interferências espectrais podem ser causadas predominantemente pela presença de elevados teores de espécies de ferro e fósforo.^{64,71,72} As linhas de absorção desses constituintes existem próximas às linhas de ressonância de selênio em 196,0 nm. Como resultado dos espectros de fundo estruturados, pode ocorrer uma correção excessiva do sinal de selênio.^{73,74} A magnitude do erro está diretamente relacionada ao sistema de correção de fundo utilizado, à natureza espectral dos sinais de fundo e à quantidade de interferência.⁷⁵ Para contornar este problema, é recomendado um sistema baseado na correção de fundo por efeito Zeeman.^{64,76}

O selênio é relativamente volátil, o que requer uma estabilização térmica preliminar do elemento para evitar perdas durante a pirólise. Apesar da utilização de diversos metais, como níquel,⁷⁷ molibdênio,⁷⁸ cobre,⁷⁹ e prata,⁸⁰ o paládio isolado ou combinado com magnésio é o modificador químico mais eficaz e comumente empregado para o selênio.^{64,81}

Larsen e Ekelund⁸² descreveram um método para determinação de selênio total em suplementos nutricionais e leveduras selenizadas por GFAAS. Antes das análises, as amostras foram submetidas à digestão com ácido nítrico concentrado em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador. A mistura de paládio e magnésio foi utilizada como modificador químico. As temperaturas de pirólise e atomização foram de 1100 °C e 2300 °C, respectivamente. Mesmo na presença de ferro e fosfato nas matrizes das amostras selecionadas, os autores não identificaram interferências espectrais

nem 196,0 nm ao utilizar o corretor de fundo baseado no efeito Zeeman. O limite de detecção foi $1,5 \text{ ng g}^{-1}$ e a massa característica (m_0) foi 25 pg.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras empregando ácido diluído para a decomposição de suplementos dietéticos e posterior quantificação de selênio por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

Os objetivos específicos foram:

- i. Desenvolver métodos de preparo de amostras mediante utilização de ácido nítrico diluído em sistema fechado com aquecimento condutivo, aquecimento por radiação micro-ondas e combustão iniciada por micro-ondas.
- ii. Avaliar a eficiência dos métodos de decomposição através da determinação do teor de carbono residual e acidez residual nas soluções obtidas;
- iii. Estabelecer os programas de temperatura e tempo da construção das curvas de temperaturas de pirólise e atomização para quantificação de Se, bem como avaliar o modificador químico mais adequado;
- iv. Avaliar a exatidão e figuras de mérito em relação aos métodos de decomposição;
- v. Aplicar os métodos de decomposição na determinação de selênio em amostras de suplemento dietético por GFAAS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A decomposição das amostras por via úmida em sistema fechado com aquecimento condutivo foi realizada em bloco digestor modelo TE-007D (Tecnal), equipado com 12 frascos de PTFE com tampa rosca, com capacidade para 50 mL. Para a MWAD foi utilizado um forno de micro-ondas modelo Speed Wave Four (Berghof) com rotor para 12 frascos, condições máximas de operação de temperatura, pressão e potência de 220 °C, 80 bar e 1400 W, respectivamente, equipado com seis frascos de PTFE modificados (modelo DAP 30+) com capacidade para 60 mL. Para a MIC foi utilizado um forno de micro-ondas modelo Multiwave PRO com rotor 8NXQ80 (Anton Paar), condições máximas de operação de temperatura, pressão e potência de 280 °C, 80 bar e 1400 W, respectivamente. Este sistema é equipado com sensor de temperatura e pressão, oito frascos de quartzo com capacidade para 80 mL e tampa com vedação de PTFE, sendo quatro disponíveis exclusivamente para a MIC, e sistema para pressurização de frascos.

O teor de carbono orgânico total nas amostras de suplemento foi determinado por meio de um analisador elementar modelo PE 2400 Series II CHNS/O (PerkinElmer). Para determinar o teor de carbono residual nos digeridos foi utilizado um analisador Multi N/C modelo 2100S (AnalytikJena) com detector de infravermelho modelo Focus Radiation NDIR Detector, equipado com auto-amostrador AS60.

A acidez residual das soluções finais obtidas a partir da decomposição com ácido diluído foi determinada através de um titulador automático modelo Titrand 905 (Metrohm), equipado com uma bureta de 20 mL (Dosino 800), agitador automático (801 Stirrer) e eletrodo de vidro (LL Unitrode).

Para determinação de Se foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) modelo PinAAcle 900T (Perkin Elmer), equipado com sistema de correção de fundo baseado no Efeito Zeeman e tubo end-cap de grafite pirolítico com aquecimento transversal (THGA). As soluções foram introduzidas no tubo de grafite através de um auto-amostrador modelo AS 900, com volume total pré-definido em 20 µL. A lâmpada de descarga sem

eletrodos (EDL) foi operada com corrente 15 mA para Se. A linha atômica selecionada foi 196,03 nm, com uma largura de fenda espectral mantida em 2,0 nm e o tempo de integração do sinal de absorvância em 5 s. Todas as medições foram feitas em absorvância integrada.

Outros equipamentos também foram utilizados: balança digital modelo AUY 200 (Shimadzu), com resolução de 0,0001 g e capacidade para 220 g, estufa convencional com circulação de ar modelo 400-2ND e temperatura máxima 200 °C (Ethik Technology), banho ultrassom modelo Elmasonic P (Elma) e prensa hidráulica modelo SSP-10A (Shimadzu), com capacidade de até 100 kN.

O programa Excel 2016, Microsoft 365 MSO foi empregado nas análises estatísticas e construção dos gráficos apresentados neste trabalho.

4.2 MATERIAIS E REAGENTES

Para o preparo de todas as soluções e amostras foi utilizada água purificada em sistema Milli-Q (Elix, Merck Millipore) com resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C. O ácido nítrico 65% (m/m) (Sigma Aldrich) foi destilado abaixo de seu ponto de ebulição em sistema de sub-ebulição modelo Distillacid BSB-939-IR (Berghof). O peróxido de hidrogênio 30% (m/m) (Merck) foi utilizado como reagente oxidante nos métodos de decomposição por via úmida.

Para a MIC, foram utilizados discos planos de papel filtro (Schleicher & Schuell GmbH) com aproximadamente 20 mm de diâmetro. Estes discos foram anteriormente descontaminados por imersão em HNO₃ 10% (v/v) em banho de ultrassom por 20 minutos, e depois lavados com água e secos à temperatura ambiente. As pastilhas das amostras foram preparadas mediante um pastilhador modelo 13 mm (Perkin Elmer) e uma prensa hidráulica. A solução de nitrato de amônio 6 mol L⁻¹ (Merck) em água foi utilizada como iniciador de combustão, a celulose microcristalina em pó (Sigma Aldrich) como auxiliar de combustão e oxigênio com 99,9% de pureza (Air liquide) foi usado para pressurização dos frascos.

Biftalato de potássio (Synth) foi utilizado para preparar as soluções de calibração de carbono na faixa de 5 a 500 mg L⁻¹ de C em água. As condições adotadas para determinação do carbono orgânico total foram: temperatura do

forno em 800 °C, purga de O₂ durante 60 s para remoção do oxigênio inorgânico dissolvido, injeção de 500 µL de amostra e 8 min de integração do sinal. Para a determinação da acidez residual, a titulação foi realizada com uma solução de hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹ (Vetec), previamente padronizada com biftalato de potássio (Synth).

Na determinação de Se foram utilizados dois modificadores químicos: Pd(NO₃)₂ 10000 mg L⁻¹ (Merck) e Mg(NO₃)₂ 10000 mg L⁻¹ (Merck), ambos em HNO₃ 15% (v/v). A limpeza do pipetador automático do equipamento de GFAAS foi feita com uma solução aquosa contendo HNO₃ 1% (v/v) e Triton X-100 0,01% (v/v). As soluções padrão de Se foram preparadas a partir da solução estoque de concentração 1000 µg mL⁻¹ em HNO₃ 2% (Absolute Standard). O gás argônio, com pureza de 99,996% (Air liquide), foi utilizado como gás de arraste e proteção do forno de grafite.

Os frascos de polipropileno, vidrarias e outros materiais em geral, utilizados neste trabalho, passaram por uma etapa prévia de descontaminação com uma solução de HNO₃ 10% (v/v), durante um período mínimo de 48 horas. Em seguida, foram enxaguados com água purificada e secos à temperatura ambiente.

4.3 AMOSTRAS E MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

As amostras de suplementos dietéticos contendo selênio foram adquiridas em farmácias locais na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Na Tabela 1 são listadas as amostras, a quantidade de selênio informada no rótulo do produto, massa de um comprimido ou cápsula, o fabricante e os principais ingredientes dos suplementos.

Para a avaliação da exatidão dos métodos de decomposição empregados neste trabalho foi utilizado o material de referência certificado de levedura enriquecida com selênio, SELM-1 (National Research Council Canada). A exatidão também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos para a decomposição por via úmida com os obtidos para a combustão iniciada por micro-ondas.

Tabela 1. Composição dos suplementos dietéticos analisados e teor de selênio informado nos respectivos rótulos.

Amostra	Teor de Se, μg	Comprimido/cápsula, mg	Origem	Principais ingredientes
A	30	1050	Estados Unidos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , vitamina A, vitamina B6, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, niacina, ácido pantotênico, biotina, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, manganês, selênio, iodo, açúcares, corantes e dióxido de silício.
B	34	640	Brasil	Vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, ácido fólico, ferro, manganês, magnésio, selênio, zinco, açúcares, corantes e dióxido de silício e dióxido de titânio.
C	132	1300	Brasil	Beta-glucana de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , vitamina C, vitamina D e selênio.
D	200	300	Estados Unidos	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> selenizada, celulose vegetal, ácido esteárico vegetal, sílica, estearato de magnésio vegetal.
E	10	500	Brasil	Vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina H, vitamina K, cálcio, cobre, cromo, ferro, fósforo, iodo, magnésio, manganês, molibdênio, potássio, selênio, zinco, corantes e dióxido de titânio.

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras A, B, C e D, que estavam na forma de comprimidos, foram cominuídas em um almofariz de ágata. Já a amostra E, que estava na forma de pó encapsulado, teve seu conteúdo retirado das cápsulas. Todas as amostras passaram por uma peneira de 250 μm e foram submetidas à secagem em estufa a 80°C até atingirem massa constante. Em seguida, foram armazenadas em frascos de polipropileno dentro de um dessecador até o momento da decomposição por via úmida ou preparação das pastilhas no caso da MIC. As formas das amostras A, B, C, D e E estão mostradas na Figura 4.



Figura 4. Amostras de suplementos dietéticos no qual foi realizada a determinação de selênio por GFAAS. Da esquerda para direita são as amostras A, B, C, D e E, respectivamente.

Para o preparo das pastilhas para decomposição por MIC foram pesadas massas aproximadas de amostra e a celulose microcristalina. Em seguida, foram colocadas em um pastilhador e comprimidas a uma pressão de 3 toneladas por 60 s em uma prensa hidráulica.

A amostra A foi selecionada para avaliação dos métodos de decomposição. Os procedimentos foram realizados com amostras em duplicata e uma prova em branco para os métodos de decomposição por via úmida, e duas amostras e duas provas em brancos para a MIC. O resumo dos métodos de decomposição estudados pode ser visualizado na Figura 5.

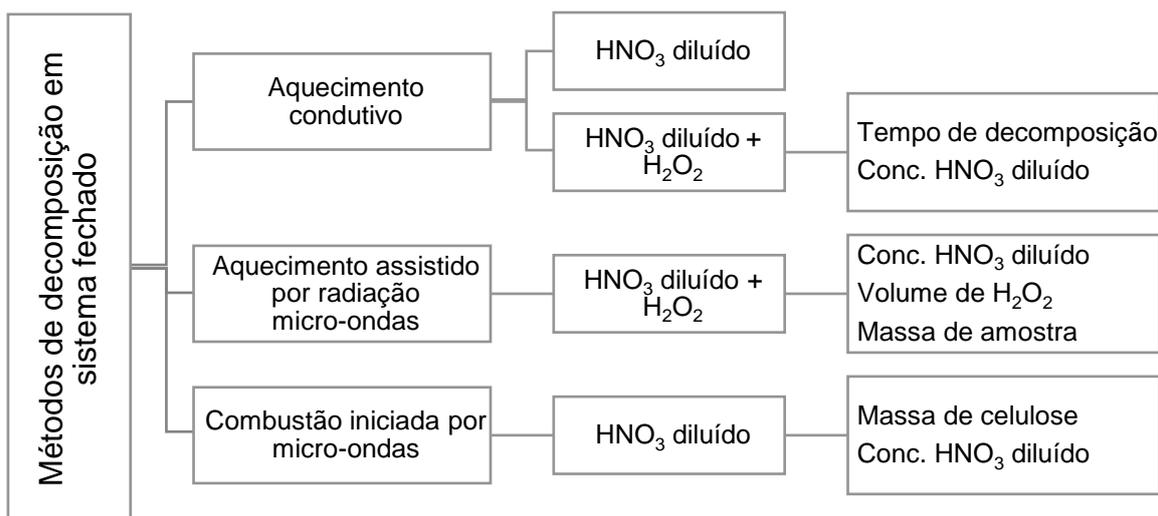


Figura 5. Métodos de decomposição de amostras avaliados.

4.4.1 Decomposição com ácido nítrico em sistema fechado com aquecimento condutivo

Para a decomposição das amostras por via úmida com aquecimento condutivo, aproximadamente 250 mg da amostra A foram pesados e adicionados nos frascos de PTFE que acompanham o bloco digestor. Inicialmente foram avaliados o uso de HNO_3 7 mol L^{-1} com e sem adição de 2 mL de H_2O_2 30% (m/m). Para reduzir a acidez residual dos digeridos, foi avaliado o uso de HNO_3 6, 5, 4 e 3 mol L^{-1} mais 2 mL de H_2O_2 30% (m/m). Em todos os ensaios, foi definido o volume de 5 mL de solução nos frascos de PTFE. O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de temperatura utilizado na decomposição com ácido nítrico diluído em sistema fechado com aquecimento condutivo.

Etapa	Temperatura, °C	Tempo, Min
1	60	30
2	100	30
3	140	120
4	160	120

Após o término do programa de temperatura e resfriamento dos frascos, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno graduado e o volume foi aferido com água para 25 mL. Em seguida, os frascos de PTFE foram lavados com água e descontaminados com 5 mL de HNO₃ 50% (v/v) a 160 °C por 90 min.

4.4.2 Decomposição com ácido nítrico diluído por radiação micro-ondas (MWAD)

Para a decomposição das amostras por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas, foram pesadas alíquotas de aproximadamente 350 mg de amostra e adicionados aos frascos de PTFE. Em seguida, foi avaliado o uso de HNO₃ 7, 5, 3,5, 3 e 2,5 mol L⁻¹ e adição de 2 mL de H₂O₂ 30% (m/m). A partir da constatação da menor concentração de HNO₃ necessária para decomposição completa, estabelecida anteriormente, foi realizado um estudo contemplando a adição de 1, 2, 3 e 4 mL de H₂O₂ 30% (m/m). Após definir a concentração de HNO₃ e o volume de H₂O₂, e com base no teor de carbono residual e acidez residual presente nas soluções finais, foi avaliada a massa máxima de amostra passível de ser decomposta. Para todos os ensaios, foi mantido o volume de 8 mL de solução nos frascos de PTFE.

O programa de temperatura do forno micro-ondas foi baseado no método recomendado pelo fabricante do equipamento, para decomposição de suplementos multivitamínicos e multiminerais.⁸³ Na Tabela 3 está descrito o programa de temperatura utilizado. Os digeridos das amostras foram transferidos para frascos de polipropileno e o volume aferido a 25 mL com água.

Tabela 3. Programa de temperatura para a decomposição das amostras de suplementos por MWAD.

Etapa	Temperatura, °C	Pressão, bar	Rampa, min	Tempo, min	Potência ^a , %
1	160	50	3	10	80
2	180	50	2	25	80
3	50	50	5	15	0

^a Neste equipamento a potência é estabelecida em função da porcentagem da potência máxima de 1450 W (100% da potência).

A descontaminação dos frascos foi executada com a adição de 8 mL de HNO₃ 65% (m/m) e aquecidos conforme o seguinte programa: *i*) temperatura e pressão fixados em 170 °C e 30 bar, respectivamente, e 90% da potência máxima por 5 min de rampa e 5 min de permanência, *ii*) temperatura e pressão fixados em 200 °C e 30 bar, respectivamente, e 90% da potência máxima por 5 min de rampa e 5 min de permanência, *iii*) temperatura e pressão fixados em 50 °C e 25 bar, respectivamente, e 0% da potência máxima por 5 min de rampa e 15 min de permanência, para resfriamento dos frascos.

4.4.3 Decomposição com ácido diluído por combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

Para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi utilizado o suporte de quartzo modificado (modelo não comercial, ver Figura 6) disponível no laboratório. Dentro deste suporte, pastilhas da mistura de amostra e celulose microcristalina foram posicionadas sobre o disco de papel de filtro previamente umedecido com 50 µL de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹. Esta solução atua como iniciador de combustão conforme já publicado.⁵⁰ Em seguida, com auxílio de uma haste, o suporte foi alocado no frasco de quartzo com 6 mL de solução absorvedora (HNO₃ 2,5 mol L⁻¹). O volume de 6 mL de solução nos frascos foi mantido em todos os ensaios, conforme recomendação do fabricante do equipamento.

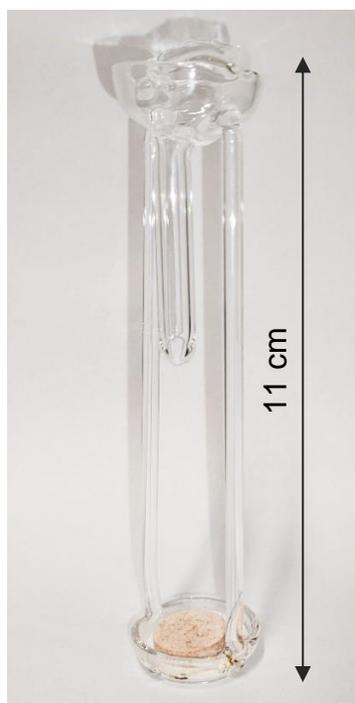


Figura 6. Suporte de quartzo (modelo não comercial) utilizado para colocação das pastilhas das amostras.

Após fechar e tampar o rotor, os frascos foram pressurizados com oxigênio a 20 bar por 30 s com auxílio de uma ponteira de PTFE, e o conjunto colocados dentro da cavidade do forno de micro-ondas. O programa de temperatura utilizado está apresentado na Tabela 4, sendo a etapa 1 para ignição da amostra e posterior refluxo e a etapa 2 para o resfriamento dos frascos até 55 °C. Durante a combustão, os limites máximos de pressão, taxa de aumento de pressão e temperatura foram fixados em 80 bar, 0,5 bar s⁻¹ e 280 °C, respectivamente.

Tabela 4. Programa de temperatura para a decomposição das amostras de suplementos por MIC.

Etapa	Potência, W	Tempo, min	Exaustão, m ³ h ⁻¹
1	900	5	60
2	0	15	120

Após o resfriamento, a pressão dos frascos foi aliviada e os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno graduados e aferido o volume

para 25 mL com água. A descontaminação dos frascos foi feita com 6 mL de HNO₃ 50% (v/v), sem pressurização e aquecimento conforme o seguinte programa: *i*) 900 W por 5 min de rampa e 10 minutos de permanência e *ii*) 0 W por 20 min para resfriamento dos frascos.

Como a composição das amostras de suplementos dietéticos é majoritariamente inorgânica, foi avaliado a massa de celulose requerida para completa volatilização do Se da amostra. Para isso foram testadas pastilhas de amostra sem celulose e com 100, 300 e 500 mg de celulose microcristalina. Em todos os ensaios foi monitorado a pressão máxima atingida durante a combustão para garantir que a pressão não ultrapassasse 80 bar. Após a otimização da massa de celulose, foi avaliada a solução absorvedora em concentrações de HNO₃ 2,5, 1,25, 0,5 e 0,25 mol L⁻¹ e em somente água.

4.5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DECOMPOSIÇÃO PELOS MÉTODOS EMPREGADOS

Com exceção dos digeridos que apresentaram visualmente uma decomposição parcial, a eficiência de decomposição foi avaliada pelo percentual de carbono residual (% RCC) e acidez residual (% RA). O RCC foi determinado pelo teor total de carbono orgânico presente na solução final, após a decomposição, em relação ao carbono orgânico total originalmente presente na amostra, expresso em % C. A RA foi determinada por titulação de neutralização dos digeridos com solução padronizada de KOH 0,1 mol L⁻¹, expressa em % de HNO₃.

Apesar do carbono não ser um fator tão crítico para quantificação de elementos por GFAAS, em decorrência da etapa pirólise destinada à remoção da matriz orgânica das amostras, há situações em que os materiais orgânicos não são completamente removidos, de modo que muitas vezes uma espessa camada de carbono permanece no tubo de grafite, conforme já relatado na literatura.⁶⁴ Já a acidez residual é mais relevante, pois determina o fator de diluição das amostras que serão inseridas no tubo de grafite, uma vez que a introdução amostras contendo elevado teor de acidez promove o desgaste do tubo de grafite, reduzindo expressivamente seu tempo de vida útil.⁸⁴

4.6 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR GFAAS

Para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização foram inicialmente avaliadas duas condições para os modificadores químicos: *i)* 5 µg de Pd e 3 µg de Mg e *ii)* somente 5 µg de Pd, ambos em solução resultante da amostra A após a decomposição por MWAD e em solução padrão de Se.

A calibração do equipamento foi realizada com as soluções padrão de Se na faixa de 0 a 120 µg L⁻¹ (0 a 1,8 ng). O volume de amostra e modificador químico introduzido no tubo de grafite através do auto-amostrador foi de 15 µL e 5 µL, respectivamente. O programa de temperatura e tempo estabelecido é detalhado na Tabela 5.

Tabela 5. Programa de temperatura para a determinação de Se em suplementos dietético por GFAAS.

Etapa	Rampa, S	Temperatura, °C	Tempo, s	Fluxo ar, mL min ⁻¹
Secagem	1	110	30	250
Secagem	15	130	30	250
Pirólise	10	1200	20	250
Atomização	0	2000	5	0
Limpeza	1	2300	3	250

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Da primeira à terceira seção, serão discutidos os resultados obtidos para os três métodos de decomposição de amostras avaliados, otimizados de maneira univariada, mediante análise da amostra A.

Na quarta seção, serão apresentados os parâmetros de mérito obtidos para os digeridos da amostra A. Na quinta seção será abordada a comparação dos métodos, como a concentração de HNO_3 , a massa máxima de amostra, o tempo de decomposição, a acidez dos digeridos e outras considerações relevantes relacionadas ao preparo das amostras.

Na sexta seção, o estudo do programa de aquecimento e modificador químico na técnica de GFAAS serão apresentados mostrando o comportamento térmico do selênio e condições estabelecidas para a quantificação do analito por GFAAS, minimizando perdas ou interferências da matriz.

Por fim, serão discutidos os resultados acerca da concentração de selênio encontrada nas amostras analisadas.

5.1 Decomposição com ácido nítrico em sistema fechado com aquecimento condutivo

Para a decomposição das amostras por via úmida com aquecimento condutivo foi utilizado 250 mg de amostra A em HNO_3 7 mol L^{-1} ou HNO_3 7 mol L^{-1} combinado com 2 mL de H_2O_2 30% (m/m). A escolha dessa concentração de ácido nítrico foi feita considerando a necessidade de uma diluição mínima do digerido para melhorar o LOD e prolongar a vida útil do tubo de grafite.

Acerca do programa de temperatura, inicialmente foi selecionada a temperatura máxima de 140 °C por 60 min. Porém, foi observado que nesta condição, a temperatura e o tempo de permanência não foram suficientes para a degradação completa da amostra de suplemento. A solução resultante era amarelada e com material particulado, porém com a adição de H_2O_2 , o digerido tinha menos coloração e sólidos, indicando uma decomposição ligeiramente superior à condição anterior (ver Figura 7).



Figura 7. Comparação dos digeridos resultantes da decomposição da amostra A com aquecimento condutivo, após a adição de HNO_3 7 mol L^{-1} (à esquerda) e HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 (à direita), obtidos com aquecimento a 140 °C e 60 min de permanência nesta temperatura.

Por ser oxidante, o H_2O_2 quando combinado com o HNO_3 , forma espécies reativas promovendo a regeneração do ácido nítrico em frasco fechado e aumentando significativamente a eficiência da decomposição. Além disso, o H_2O_2 é considerado um reagente ambientalmente adequado, uma vez que O_2 e H_2O são os principais produtos de sua decomposição.³⁵ O volume de 2 mL de H_2O_2 juntamente com ácido nítrico diluído já foi empregado para decomposição de diversas matrizes, conforme relatado.^{35,85–88}

No intuito de obter uma decomposição mais eficiente, novas alíquotas da amostra foram submetidas à decomposição, desta vez com HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 30%, porém com outro programa de aquecimento (ver Tabela 2), com temperatura mais elevada (160 °C ao invés de 140 °C) e maior tempo de permanência (120 min ao invés de 60 min). Nessa condição, foi verificado que o digerido era uma solução incolor, evidenciando a completa decomposição da matriz orgânica da amostra, conforme ilustrado na Figura 8.



Figura 8. Comparação dos digeridos resultantes da decomposição da amostra A com aquecimento condutivo em bloco digestor adicionados: *i)* HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 , aquecimento a 140 °C e 60 min de permanência (digerido à esquerda) e *ii)* HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 , com aquecimento a 160 °C e 120 min de permanência (digerido à direita).

Em sistemas fechados, inclusive aqueles que operam sob pressão atmosférica, o aumento da temperatura está diretamente relacionado ao aumento da pressão, contribuindo também na eficiência da decomposição. Isso

ocorre devido ao aumento do ponto de ebulição do ácido dentro de sistemas fechados, decorrente do aumento da pressão interna dos frascos, resultando em temperaturas mais elevadas e facilitando a decomposição de matrizes mais complexas.³⁴ Porém, como a decomposição por aquecimento condutivo não é homogênea em função da distribuição de calor por correntes convectivas, ou seja, a solução mais próxima à parede do frasco aquece primeiro que a região do centro, há necessidade de utilizar um tempo maior para haver decomposições mais eficientes.³⁵

Visando obter um digerido com menor acidez residual, foi avaliado também o uso de HNO_3 nas concentrações de 6, 5, 4 e 3 mol L^{-1} juntamente com 2 mL de H_2O_2 , com o segundo o programa apresentado na Tabela 2. Para HNO_3 6 e 5 mol L^{-1} foi visualizado um digerido com pouca quantidade de material particulado, enquanto nas demais condições, uma coloração amarelada e presença de resíduos sólidos, indicaram uma oxidação incompleta do material orgânico. O teor de carbono e a acidez residual dos digeridos obtidos a partir do uso de HNO_3 7, 6 e 5 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 estão apresentados na Figura 9.

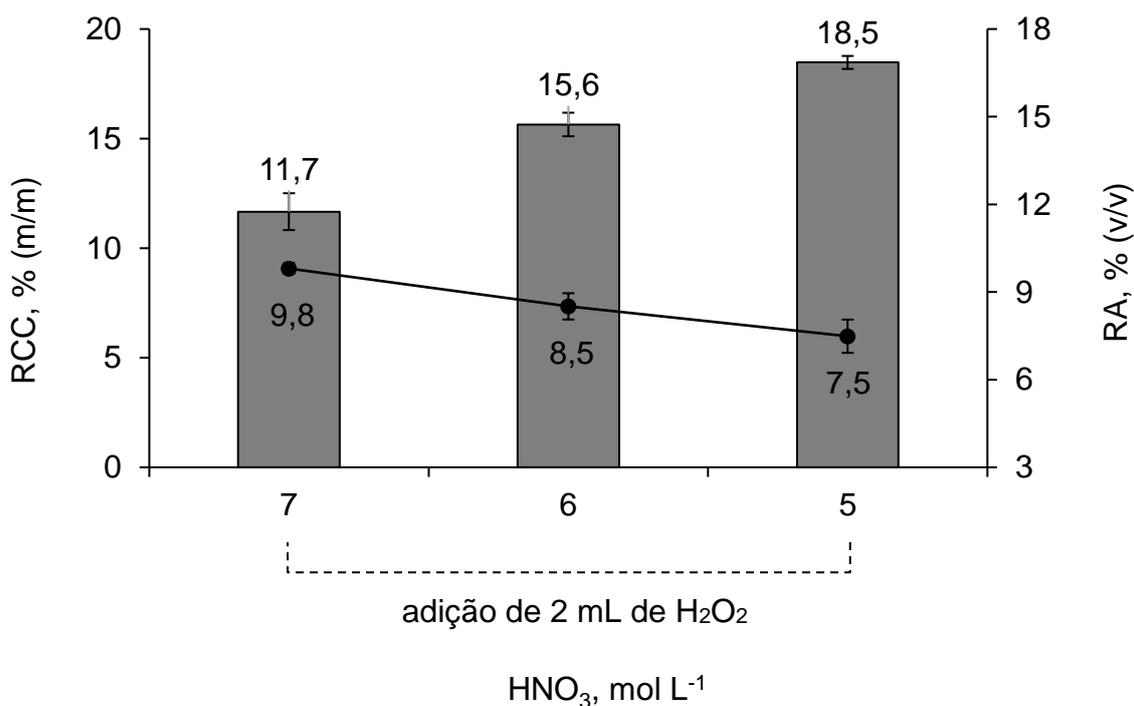


Figura 9. Avaliação da decomposição de 250 mg da amostra A em diferentes concentrações de HNO₃, com adição de 2 mL de H₂O₂, utilizando aquecimento condutivo em bloco digestor. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.

A Figura 9, conforme esperado, revela uma relação inversamente proporcional entre a concentração de HNO₃ e o teor de carbono residual. Quando utilizado o HNO₃ 7 mol L⁻¹ foi obtido um digerido com 11,7% de RCC, enquanto para concentrações mais baixas de HNO₃, o RCC foi superior a 15%. Por outro lado, foi observado uma redução de 23,6% da RA para 7,5% na concentração mais baixa de ácido nítrico. Diante disso, foi estabelecido a condição de HNO₃ 5 mol L⁻¹ juntamente com 2 mL de H₂O₂, devido a menor RA. O método otimizado foi aplicado em triplicata para todas as amostras.

5.2 Decomposição com ácido diluído assistida por radiação micro-ondas

5.2.1 Avaliação da concentração do ácido nítrico diluído

No intuito de aumentar a massa de amostra e reduzir a acidez residual dos digeridos e o tempo para decomposição das amostras, foi avaliado a utilização da MWAD. Com base nas condições recomendadas pelo fabricante do equipamento para decomposição de suplementos multivitamínicos e multiminerais, o aquecimento foi em duas etapas em 160 e 180°C, rampas de 3 e 2 minutos, permanência de 10 e 25 minutos e potência de 80% (1160 W) em ambas, respectivamente. Inicialmente foram utilizados 350 mg de amostra para avaliação de HNO_3 7, 5, 3,5, 3 e 2,5 mol L^{-1} , juntamente com 2 mL de H_2O_2 30% (m/m). Em todas as condições foram observados digeridos sem a presença de sólidos remanescentes. O teor de carbono residual e acidez residual são apresentados no Figura 10.

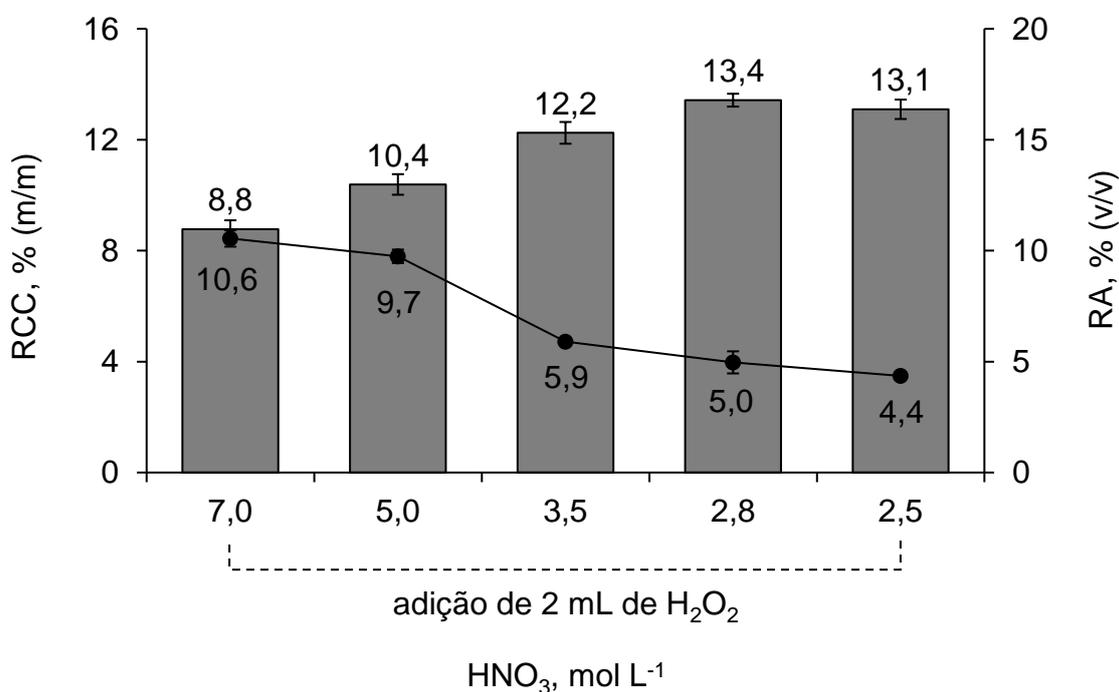


Figura 10. Avaliação da decomposição de 350 mg da amostra A em diferentes concentrações de HNO_3 juntamente com 2 mL de H_2O_2 , utilizando o método MWAD. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para $n = 2$.

Para as decomposições com HNO_3 7 e 5 mol L^{-1} , foram obtidos os menores teores de carbono residual, sendo 8,8 e 10,4%, respectivamente, e teores de acidez residual superiores a 9%. Quando a concentração de HNO_3 foi reduzida, a eficiência de decomposição dos digeridos se manteve, porém com teores de carbono um pouco mais elevados, sendo 12,2, 13,4 e 13,1% para HNO_3 3,5 e 2,8 e 2,5 mol L^{-1} , respectivamente. Porém, os valores de acidez diminuíram para 5,9, 4,9 e 4,3%, respectivamente. Como não foi observado diferença significativa entre os valores de RCC para HNO_3 3,5 e 2,8 e 2,5 mol L^{-1} (nível de confiança de 95%, ANOVA), optou-se pelo HNO_3 2,5 mol L^{-1} para os ensaios subsequentes, em razão do menor percentual de acidez residual nos digeridos.

5.2.2 Avaliação do volume de peróxido de hidrogênio

Conforme mencionado anteriormente, o H_2O_2 é frequentemente empregado na decomposição por via úmida devido ao seu elevado poder oxidante e por seus produtos de decomposição em solução serem H_2O e O_2 . Com o objetivo de avaliar a eficiência da decomposição utilizando a solução de ácido nítrico de 2,5 mol L^{-1} , foram avaliados diferentes volumes de H_2O_2 adicionados à amostra. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

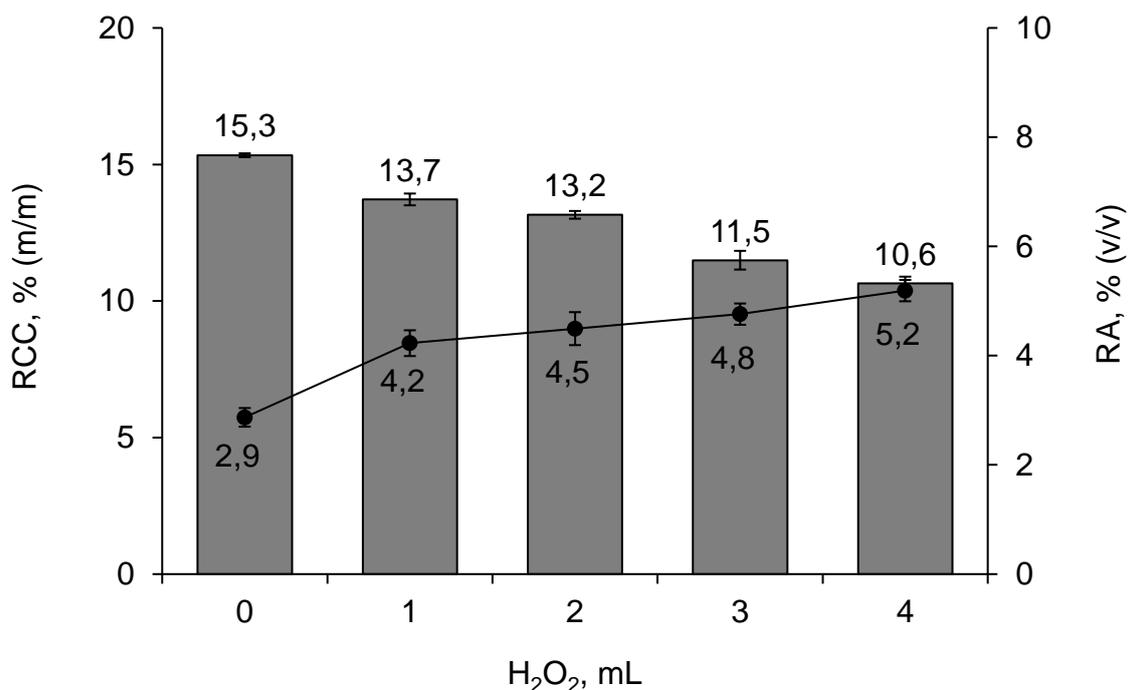


Figura 11. Avaliação de HNO₃ 2,5 mol L⁻¹ e adição de diferentes volumes de H₂O₂ na eficiência de decomposição de 350 mg da amostra A por MWAD. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.

A decomposição assistida por radiação micro-ondas realizada sem a adição de H₂O₂, ou seja, apenas com a adição de HNO₃ 2,5 mol L⁻¹, proporcionou a menor eficiência de decomposição, com carbono residual de 15,3%. Quando 1 a 4 mL de H₂O₂ foram adicionados, os resultados para o teor de carbono residual foram inferiores a 14% e a acidez residual variou de 4,2 a 5,2%, o que evidencia a regeneração do ácido nítrico em sistema fechado e o aumento eficiência de decomposição. Entre essas condições, a adição de 3 e 4 mL de H₂O₂ proporcionaram menores teores de carbono residual, sendo 11,5 e 10,6%, respectivamente, e acidez residual, 4,8% e 5,2%, respectivamente. Ambos sem diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste *t-Student*). Portanto, optou-se por escolher a condição de menor acidez residual, adição de 3 mL de H₂O₂, para os demais ensaios.

5.2.3 Avaliação da massa de amostra

Com o objetivo de investigar a maior massa de amostra que poderia ser decomposta com HNO_3 $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 3 mL de H_2O_2 , foi realizada a decomposição de 400 a 550 mg de amostra. Os resultados de RCC e RA para decomposição de todas as alíquotas de massas avaliadas são apresentados na Figura 12.

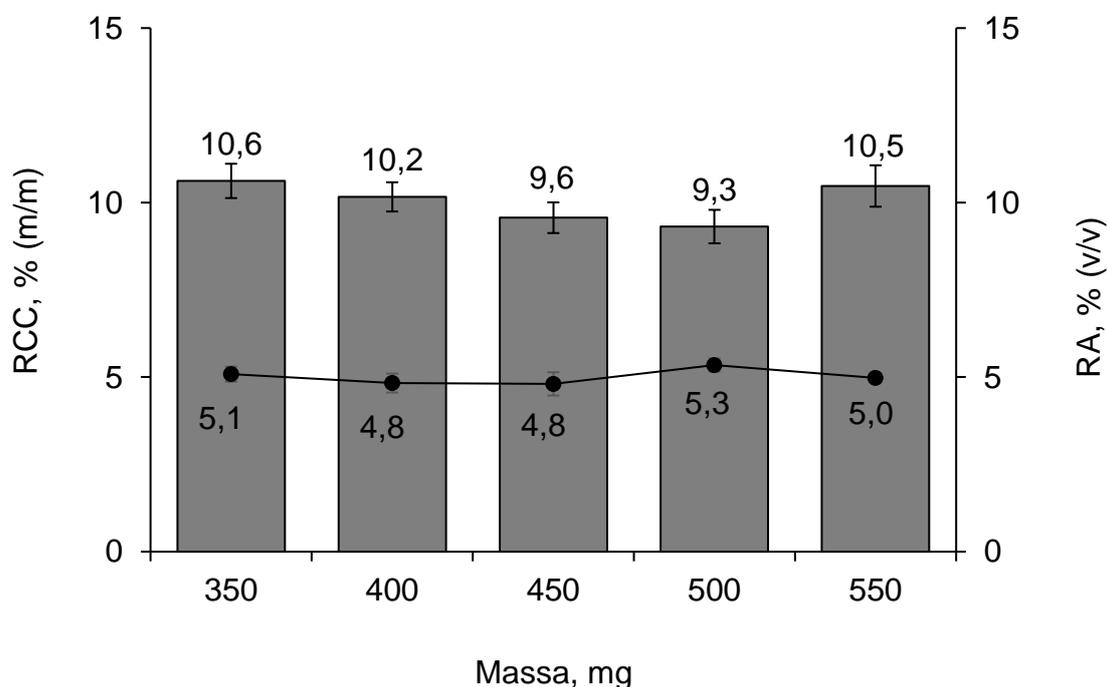


Figura 12. Avaliação da decomposição de diferentes alíquotas de massa da amostra A com HNO_3 $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 3 mL de H_2O_2 , mediante a MWAD. As barras e a linha representam o RCC e a RA, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para $n = 2$.

Conforme exibido na Figura 12, os resultados obtidos para os digeridos contendo massas de 350 a 550 mg foram similares, variando de 4,8 a 5,3% de acidez residual. Em relação ao teor de carbono residual, foi observado que o incremento de massas auxiliou na elevação da pressão interna dos frascos, e conseqüentemente aumentou a decomposição, reduzindo sutilmente o RCC nas massas de 350 a 500 mg de amostra, respectivamente. A pressão máxima atingida no sistema foi de 18, 22 e 24 bar para 350, 450 e 550 mg de amostra, respectivamente, conforme exibido na Figura 13.

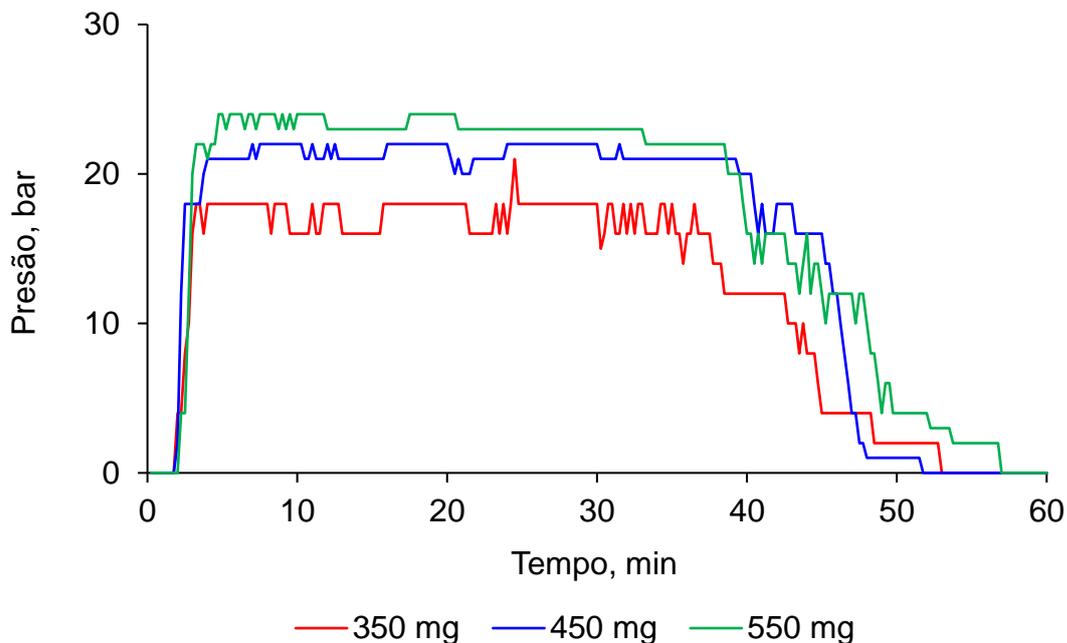


Figura 13. Perfil da pressão interna nos frascos na decomposição de 350, 450 e 550 mg de amostra A com HNO_3 2,5 mol L^{-1} e 3 mL de H_2O_2 , mediante a MWAD.

Para todas as alíquotas de massas avaliadas, a acidez e o carbono residual não foram estatisticamente diferentes (nível de confiança de 95%, teste ANOVA), e os digeridos resultantes eram soluções límpidas e sem material sólido remanescente. Visando ter massa de amostra suficiente para os ensaios da MIC, foi estabelecido a massa intermediária de 450 mg de amostra A, sendo o RCC 9,6% e RA 4,8%, para a repetição do método em triplicata. No entanto, com o objetivo de somente quantificar o analito nas demais amostras foi utilizado a massa de 350 mg, sendo a análise em triplicata.

É importante mencionar que nos digeridos obtidos da amostra A mediante decomposição por via úmida foi observada uma pequena quantidade de um material esbranquiçado decantado. Possivelmente, esse material era proveniente do silício ou do titânio, ambos presentes na amostra A, assim como em outras amostras conforme informado na Tabela 1. Esses elementos não são solúveis em ácido nítrico, que foi utilizado na decomposição das amostras analisadas. Portanto, o sobrenadante do digerido foi separado para evitar possíveis problemas na determinação do Se, seja por espalhamento da radiação

da fonte ou entupimento do capilar do amostrador automático do equipamento da GFAAS.

5.3 Decomposição com ácido diluído em combustão iniciada por radiação micro-ondas

5.3.1 Avaliação da massa de celulose

O método de combustão iniciada por radiação micro-ondas foi utilizado seguindo os parâmetros previamente estabelecidos e publicados, tais como: pressão inicial de oxigênio de 20 bar; 6 mL de solução absorvedora, volume mínimo recomendado pelo fabricante do equipamento; 50 µL de solução de nitrato de amônio como iniciador de combustão; tempo de irradiação de 5 min e; uso de discos de papel filtro para o posicionamento das pastilhas de amostra no suporte de quartzo.^{50,51,54,89}

Devido à composição predominantemente inorgânica dos suplementos dietéticos analisados neste estudo, em torno de 60-70%, foi avaliado o uso de celulose microcristalina como auxiliar de combustão. Em trabalhos anteriores, a celulose foi citada como um auxiliar na volatilização de metais na decomposição de matrizes inorgânicas, resultando no aumento da temperatura dentro do frasco de decomposição e, conseqüentemente, facilitando a volatilização dos analitos presentes na fração não orgânica.^{50,56}

Nesse contexto, foram confeccionadas pastilhas contendo 200 mg de amostra A sem e com adição de celulose microcristalina. A concentração de ácido nítrico estabelecida anteriormente nos ensaios envolvendo MWAD, HNO_3 2,5 mol L⁻¹, foi utilizada como solução absorvedora neste ensaio preliminar da MIC. Além disso, a cada acréscimo na massa de celulose, foi monitorada a variação de pressão no sistema ao longo da combustão, ou seja, a pressão inicial e a pressão máxima observada durante a combustão (após aproximadamente 30 s do início do programa de temperatura). Este acompanhamento foi efetuado após os 30 s por conta de uma limitação do equipamento que não registra a taxa de pressão nos primeiros 30 s.

A pressão durante a reação de combustão é um parâmetro crítico da MIC. Isso porque as reações que ultrapassam 50 bar de pressão após a ignição da

amostra, podem atingir o limite máximo de 80 bar ou temperaturas muito elevadas que excedem a capacidade dos frascos, e conseqüentemente podem comprometer a integridade do equipamento e a segurança do operador.⁵⁰

Após a decomposição por MIC, as soluções absorvedoras para todas as quantidades de celulose microcristalina avaliadas tinham um aspecto límpido. Porém, em todos os ensaios, foi verificado no suporte de quartzo um resíduo sólido correspondente à fração inorgânica da amostra no suporte de quartzo. Esse material era esperado e não teve correlação com o desempenho do método.

Para determinar a massa adequada de celulose microcristalina na decomposição de 200 mg da amostra A por MIC, foi investigada a concentração de Se nas soluções finais obtidas após a decomposição, sem adição de celulose e com adição de 100, 200 e 300 mg de celulose, conforme exibido na Figura 14.

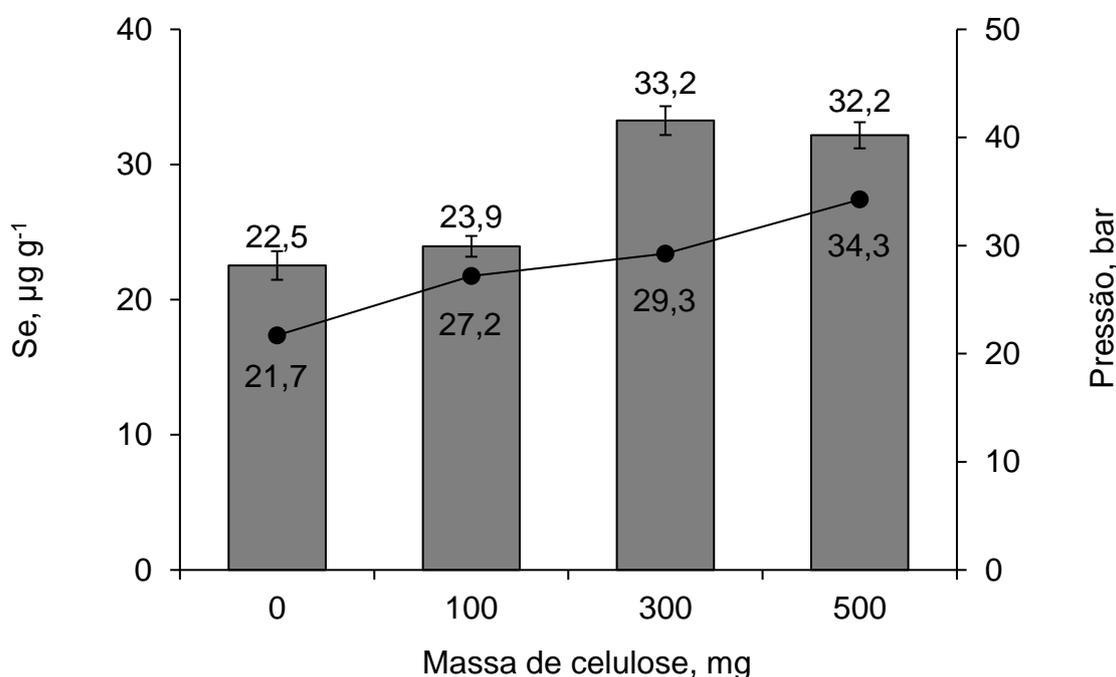


Figura 14. Influência da massa de celulose microcristalina na decomposição por MIC da amostra A (200 mg) por MIC, utilizando 20 bar de O₂ de pressão e HNO₃ 2,5 mol L⁻¹ como solução absorvedora. As barras e a linha representam a massa de celulose e a pressão máxima atingida na combustão, respectivamente. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.

Conforme observado na Figura 14, a pressão alcançada durante a combustão foi inferior a 35 bar. Notou-se que, para a amostra sem adição de

celulose ou na presença de 100 mg de celulose, a concentração de selênio nos digeridos foi inferior a $25 \mu\text{g g}^{-1}$, com pressões atingindo 21,7 e 27,2 bar, respectivamente. Considerando a concentração de Se indicada no rótulo da amostra A, $30 \mu\text{g g}^{-1}$, os valores de concentração de Se encontrados nessas duas condições iniciais foram cerca de 17% inferiores ao esperado. Isso pode ser explicado pela remoção parcial do elemento na fração inorgânica da amostra e/ou pela pressão alcançada durante a combustão da amostra e/ou pelo papel de filtro não ter sido suficiente para a volatilização dos analitos.⁵²

Para 300 mg e 500 mg de celulose, a pressão atingida foi de 29,2 bar e 34,2 bar, respectivamente, a concentração de selênio nos digeridos foi $33,2 \mu\text{g g}^{-1}$ e $32,2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Ambos os resultados foram condizentes com os obtidos nos métodos de decomposição por via úmida (nível de confiança de 95%, teste ANOVA), sendo $33,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para o bloco digestor e $32,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para a MWAD.

Como a amostra A possui material inorgânico, a mistura com a celulose induziu à combustão da fração orgânica da amostra e da celulose, resultando no aumento da temperatura durante a combustão e, conseqüentemente, favorecendo a volatilização do analito. Não houve diferença estatisticamente entre os valores de concentração encontrados para 300 mg e 500 mg de celulose (nível de confiança de 95%, teste *t-Student*). Portanto, a condição escolhida para os testes posteriores foi 200 mg de amostra e 300 mg de celulose microcristalina. Massas maiores de amostra não foram avaliadas devido à possibilidade da proporção de 2:3 entre amostra e celulose exceder as condições de segurança do equipamento e do operador.

5.3.2 Avaliação da concentração de ácido nítrico diluído como solução absorvedora

Com o objetivo de reduzir a concentração de HNO_3 como solução absorvedora, visando obter digeridos com acidez residual ainda menores que nos métodos de decomposição por via úmida, foi realizado um estudo com concentrações inferiores a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 . Para isso, foi investigado o HNO_3 1,25, 0,50 e 0,25 mol L^{-1} ou somente água, conforme exibido na Figura 15. Essas condições foram avaliadas com 200 mg de amostra e 300 mg de

celulose microcristalina, estabelecidas anteriormente. A escolha mais adequada foi baseada na concentração de selênio na amostra A, conforme exibido na Figura 15.

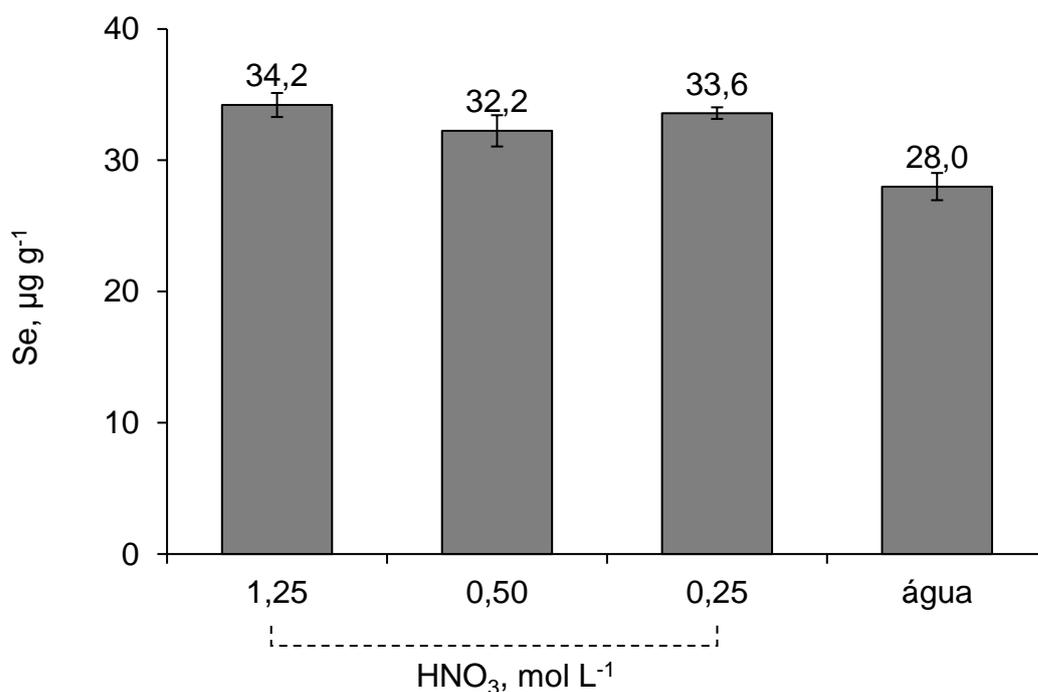


Figura 15. Avaliação da concentração de HNO₃ como solução absorvedora na MIC. As barras representam a quantidade de selênio na amostra A após a MIC. Os resultados são expressos em média e desvio padrão para n = 2.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15, utilizando água como solução absorvedora, a concentração de selênio foi de 28 μg g⁻¹, valor inferior em comparação aos valores obtidos quando foram utilizadas soluções diluídas de HNO₃. A concentração de Se na amostra A informada no rótulo, de 30 μg g⁻¹, foi condizente com os resultados obtidos para HNO₃ 1,25, 0,50 e 0,25 mol L⁻¹, que foram 34,2, 32,2 e 33,6 μg g⁻¹, respectivamente. Além disso, esses resultados não tinham diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste ANOVA) em relação às concentrações determinadas pelos métodos de decomposição por via úmida investigados no presente estudo. Por conta disso, foi selecionado a menor concentração de HNO₃, 0,25 mol L⁻¹, como solução absorvedora na decomposição das amostras em quadruplicata. Nessa condição, no digerido da amostra o RA era 0,5% e RCC, 0,1%.

5.4 PARÂMETROS DE MÉRITO

5.4.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram obtidos a partir de dez leituras consecutivas do branco. Conforme a recomendação da IUPAC,⁹⁰ o LOQ e LOD foram calculados através das equações: $LOD = 3*s + m$ e $LOQ = 10*s + m$, sendo s e m , o desvio padrão e média das leituras de absorbância do branco, respectivamente. O branco analítico foi a solução de decomposição utilizada em cada método de decomposição de amostra, sendo: HNO_3 5 mol L⁻¹ com adição de 2 mL de H_2O_2 30% (m/m) para o aquecimento em bloco digestor, HNO_3 2,5 mol L⁻¹ com adição de 3 mL de H_2O_2 30% (m/m) para a MWAD e HNO_3 0,25 mol L⁻¹ e 300 mg de celulose microcristalina para a MIC.

Em relação as massas utilizadas, foram considerados os 250 mg para o bloco digestor e 450 mg para a MWAD. Na MIC, a massa utilizada foi de 200 mg. Na GFAAS, o auto-amostrador injetou o volume de 15 µL de amostra e 5 µL da solução de Pd como modificador químico no tubo de grafite. Na Tabela 6, estão resumidos os parâmetros de mérito do método proposto neste estudo.

Tabela 6. Parâmetros de mérito dos métodos de análise de amostras de suplementos dietéticos e posterior quantificação de Se por GFAAS.

Parâmetros	Bloco digestor	MWAD	MIC
LOD, $\mu\text{g g}^{-1}$	1,7	0,65	0,08
LOQ, $\mu\text{g g}^{-1}$	5,7	1,8	0,21
Fator de diluição	7,4	5	1 ^a
Faixa linear	0 a 120 $\mu\text{g L}^{-1}$		
Coeficiente de correlação	0,999		

^a O digerido da MIC foi diluído por exceder a faixa de concentração da curva de calibração e não devido à acidez da amostra. Portanto, essa diluição não foi incluída nos cálculos do LOD e LOQ.

Conforme observado na Tabela 6, o limite de quantificação para a MIC é aproximadamente duas ordens de grandeza inferior em comparação ao observado no bloco digestor. Embora em ambos os casos a massa fosse inferior a 300 mg, a diluição de 7,4 vezes do digerido obtido do bloco digestor acarretou a diferença expressiva dos valores de LOD e LOQ entre os métodos. Para a MWAD, apesar da decomposição de 450 mg de amostra, foi necessária uma diluição de aproximadamente 5 vezes, o que também prejudicou a obtenção de valores mais baixos de LOD e LOQ.

Em uma análise comparativa de duas técnicas empregadas na determinação de selênio total em suplementos minerais e leveduras enriquecidas com Se, preparadas por MWAD com HNO_3 e H_2O_2 , Valiente e colaboradores relataram LODs de $0,18 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ para GFAAS e HGAAS, respectivamente. No presente estudo, o LOD para a MIC foi de $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$, demonstrando um desempenho duas vezes superior ao da GFAAS e na mesma ordem de grandeza da HGAAS.⁹¹ Além disso, na decomposição por MIC, foi utilizada uma solução de HNO_3 50 vezes mais diluída do que a empregada pelos autores.

Em relação às técnicas analíticas hifenizadas, contemplando a geração química de vapor, um estudo realizado por Chirita *et. al.*⁹² para determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica de forno de quartzo com fonte contínua de alta resolução e geração de hidreto (HG-HR-CS-QFAAS) em alimentos e suplementos dietéticos, após a MWAD e posterior pré-redução de

Se, alcançou o LOD de $0,062 \text{ mg kg}^{-1}$ e LOQ de $0,18 \text{ mg kg}^{-1}$, resultados muito similares aos obtidos para a MIC neste trabalho. Em outro estudo conduzido por Tyburska e Jankowski⁹³ para a determinação de selênio em suplemento multivitamínico por HG-ICP-OES, após preparo da amostra por microextração em fase sólida (SPME), foi obtido o LOD de $1,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Esse limite de detecção é até quatro vezes superior ao encontrado no presente estudo para os métodos de decomposição por via úmida e cerca de 70 vezes maior em comparação ao encontrado na MIC.

Assim, pode-se concluir que os métodos de preparo de amostras otimizados para a decomposição de suplemento dietético possibilitam a quantificação de selênio em baixos níveis de concentração do elemento, especialmente por meio da MWAD e MIC. A combustão iniciada por micro-ondas se destaca ao proporcionar uma melhor eficiência de decomposição, além de menor consumo de ácidos e geração de resíduos químicos. Além disso, a frequência analítica é maior e os limites de detecção e quantificação são menores. Vale ressaltar a importância deste método por obter digeridos com baixo teor de C e acidez, o que é de grande relevância para técnicas como ICP-MS, ISE, IC, voltametria e outras.⁵²

Em técnicas que permitem análise de soluções com até 5% de HNO_3 , como o ICP MS, por exemplo, a opção pela MWAD é vantajosa. Isso porque o método possibilita a decomposição de maior massa de amostra e análise direta do digerido, eliminando a necessidade de uma etapa adicional de diluição. Tal abordagem pode resultar em uma redução significativa nos limites de detecção e quantificação.

Quanto à decomposição em bloco digestor, cujas limitações incluem tempo prolongado de decomposição, utilização de ácidos mais concentrados e eficiência de decomposição menos satisfatória, recomenda-se sua aplicação em situações em que não se dispõe de equipamentos mais sofisticados ou para análise de amostras com matrizes menos complexas.

5.4.2 Avaliação da exatidão

A exatidão dos resultados foi avaliada pela comparação entre os métodos de MWAD e MIC e através da análise do CRM. Os resultados da avaliação da

exatidão do método de quantificação de Se na amostra A são exibidos na Tabela 7.

Tabela 7. Quantificação de Se na amostra A. Os resultados são expressos em média e intervalo de confiança para o bloco digestor e a MWAD. A análise foi em triplicata ($n = 3$) para o bloco digestor e em quadruplicata ($n = 4$) para a MIC.

Método de decomposição	Se $\mu\text{g g}^{-1}$
Bloco digestor	$33,5 \pm 4,0$
MWAD	$32,1 \pm 1,4$
MIC	$31,5 \pm 1,1$

Em relação à concentração selênio nos digeridos obtidos a partir dos três métodos de decomposição, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações (nível de confiança de 95%, teste ANOVA). A quantidade de selênio informada na embalagem da amostra A era $30 \mu\text{g g}^{-1}$, e conforme evidenciado na Tabela 7, as concentrações encontradas para os métodos de decomposição são condizentes com a concentração de Se informada na embalagem da amostra, sendo a média $33,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para o bloco digestor, $32,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para o MWAD e $31,7 \mu\text{g g}^{-1}$ para a MIC.

Outra forma de avaliar a exatidão foi a análise do CRM SELM-1 nos métodos de decomposição avaliados. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de Se determinada por GFAAS no CRM SELM-1 submetido a diferentes métodos de decomposição. Os resultados são a média e o desvio padrão de três replicatas para os métodos por via úmida (n = 3) e quatro replicatas para a MIC (n = 4).

Método de decomposição	Se, mg kg ⁻¹	
	Valor encontrado	Valor certificado
Bloco digestor	1963 ± 28	
MWAD	1992 ± 65	2031 ± 70
MIC	2021 ± 75	

Os valores das concentrações de Se encontrados na análise do CRM, conforme apresentados na Tabela 8, não tinham diferença estatisticamente (nível de confiança de 95%, teste *t-Student*) em comparação ao valor certificado. A concordância em relação ao CRM variou de 96,7% a 99,5% para os três métodos empregados. Esses resultados confirmam a exatidão dos métodos desenvolvidos e sugerem que a decomposição por via úmida e combustão iniciada por micro-ondas, ambos usando ácido nítrico diluído, são apropriados para a amostra A e a subsequente determinação de Se por GFAAS.

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO

Uma vez que as condições para as decomposições mediante o bloco digestor, MWAD e MIC foram estabelecidas, a frequência analítica foi avaliada. O tempo foi estimado para a decomposição de duas amostras e uma prova em branco, nas decomposições por via úmida, e duas amostras e duas provas em branco, na combustão iniciada por micro-ondas, conforme as condições otimizadas e estabelecidas dos métodos. Os resultados são detalhados na Tabela 9.

Tabela 9. Estimativa de tempo para execução das etapas dos procedimentos de decomposição empregados.

Etapa	Estimativa de tempo, minuto		
	Bloco digestor	MWAD	MIC
Pesagem	5	5	10
Formação das pastilhas	-	-	15
Adição de reagentes	5	5	10
Pré-decomposição ^a	10	10	-
Fechamento dos frascos	5	10	15
Pressurização	-	-	5
Aquecimento	300	40	5
Resfriamento	90 ^b	40 ^c	15 ^d
Recolhimento das soluções	10	15	20
Descontaminação	90	60	35
Total	510	185	130

^a Para liberação dos gases da reação do HNO₃ e H₂O₂ com a amostra antes de submetê-la à decomposição; ^b Resfriamento dos frascos em temperatura ambiente, fora do equipamento; ^c Resfriamento dos frascos por circulação de ar no rotor por 20 minutos seguidos de 20 minutos em temperatura ambiente; ^d Resfriamento dos frascos usando o sistema integrado por ar forçado no equipamento até temperatura de 55°C;

Conforme evidenciado na Tabela 9, a decomposição em bloco digestor é requer o maior tempo para sua execução. Com este método, o tempo estimado para uma decomposição da duplicata de amostra e uma prova em branco foi 510 minutos (8,5 horas). Entretanto, havia a possibilidade de realizar a decomposição de até 15 amostras, pois o bloco comporta 15 frascos.

No que diz respeito à MWAD, o tempo necessário para realizar todos os procedimentos da decomposição de duas amostras e uma prova em branco foi de 185 minutos (aproximadamente 3 horas). Utilizando um compartimento para 12 frascos do equipamento, seria possível realizar a decomposição de 12 amostras simultaneamente, sendo 90 min para o aquecimento e resfriamento dos fracos.

Quanto à MIC, a execução da decomposição de duas amostras e duas provas em branco demandou 130 minutos (cerca de 2,1 horas). No entanto, a MIC envolve outras etapas, como a pesagem da amostra e da celulose microcristalina, a confecção das pastilhas, a adição da solução absorvedora e do iniciador de combustão, o posicionamento da amostra no suporte de quartzo, a pressurização dos frascos e, por fim, a despressurização para a remoção do suporte e coleta do digerido. Essas etapas necessitam de mais atenção para evitar contaminações e aumentam o tempo de execução dos procedimentos para a decomposição de mais amostras. Ao considerarmos um rotor que comporta até 8 frascos, as etapas de aquecimento e resfriamento para 8 amostras levariam apenas 20 min.

É válido destacar que, ao realizar a decomposição de mais amostras, haverá um aumento no tempo de execução das etapas referentes a adição da amostra e reagentes, fechamento dos frascos e coleta dos digeridos. No caso da MIC, haverá um tempo adicional para formação de pastilhas, pressurização e despressurização dos frascos. Portanto, a escolha do método de decomposição dependerá dos fatores que o operador considerar mais relevante, bem como a disponibilidade de tempo, materiais e equipamentos no laboratório.

Com o objetivo de comparar algumas vantagens e desvantagens dos métodos de decomposição, foram comparados a concentração de ácido nítrico utilizada na decomposição, massa máxima de amostra a ser decomposta, teor de carbono residual e a acidez residual. Os resultados estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação dos métodos otimizados para decomposição de suplementos dietéticos.

Procedimento	Bloco digestor	MWAD	MIC
HNO ₃ , mol L ⁻¹	5,0	2,5	0,25
Massa máxima de amostra, mg	250	550	200
Teor de carbono residual, %	18	9,6	0,10
Teor de acidez residual, %	7,4	4,8	0,50
LOD, µg g ⁻¹	1,7	0,65	0,08

De acordo com a Tabela 10, ao utilizar a MIC, houve uma redução de 95% na concentração de HNO₃ necessária para a decomposição da amostra. Como resultado, houve uma drástica diminuição da acidez residual nos digeridos. Devido à recomendação da GFAAS de que a solução da amostra não contenha mais do que 1% (v/v) de HNO₃, a fim de preservar a vida útil do tubo de grafite, os digeridos obtidos mediante a MIC poderiam ser diretamente introduzidos no tubo de grafite, eliminando a necessidade de diluir mais e contribuindo para um menor limite de detecção do método. Por outro lado, nos métodos de decomposição por via úmida foi necessário ajustar a acidez das soluções a um nível adequado para introdução delas no tubo de grafite. A diluição de 7,4 vezes para os digeridos obtidos mediante o aquecimento por bloco digestor e 5 vezes para a MWAD ofereceu maior vida útil ao tubo de grafite, porém afetou expressivamente o LOD desses métodos. Após a diluição, foi obtida a acidez residual de 0,99 e 0,95% para a solução do digerido obtido em bloco digestor e MWAD, respectivamente.

Em relação à massa de amostra, na MWAD foi possível a decomposição de até 550 mg, resultando em um digerido com a maior concentração do analito, o que permitiu obter o menor limite de quantificação. Apesar da massa intermediária de 450 mg ter sido estabelecida para decomposição da amostra A, este método permite a decomposição de 350 a 550 mg sem diferença significativa para RCC e RA.

Já no bloco digestor e a MIC foi utilizada massa inferior a 300 mg, o que reduziu a quantidade de analito nos digeridos. Apesar de todos os digeridos

serem soluções límpidas, a eficiência da MIC foi significativamente superior à decomposição em bloco digestor e por MWAD, sendo obtidos respectivamente 18% e 9,6% de carbono residual, e apenas 0,10% de carbono residual para a MIC.

Mesmo incluindo as etapas adicionais da MIC, há vários benefícios em seu uso, tais como a menor geração de resíduos, a possibilidade de obter valores reduzidos de brancos analíticos e, conseqüentemente, menores LODs e LOQs, além de menos interferências durante a etapa de quantificação devido à completa separação do analito da matriz.⁵² Porém, a MIC é um método comumente empregado para amostras orgânicas, e no caso de amostras de composição inorgânica predominante, como os suplementos multiminerais, pode-se obter resultados inconclusivos devido à variabilidade da eficiência da decomposição em função da quantidade de carbono em cada amostra. Para contornar este problema, pode-se adicionar um auxiliar de combustão como a celulose microcristalina, conforme realizado neste trabalho.

5.6 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

5.6.1 Estudo dos modificadores químicos e programa de temperatura

Dois modificadores químicos foram avaliados para quantificação de selênio, sendo: *i)* 5 µg de Pd e 3 µg de Mg e *ii)* 5 µg de Pd. No tubo de grafite, os modificadores foram adicionados em solução padrão contendo 50 µg L⁻¹ de Se e em solução do digerido obtido após a decomposição da amostra A por MWAD. A curva de temperatura de pirólise foi obtida variando-se a sua temperatura entre 900 e 1600 °C, mantendo-se a temperatura de atomização constante em 1900 °C. Posteriormente, a temperatura de atomização foi modificada de 1800 a 2300 °C, mantendo-se fixa a temperatura de pirólise anteriormente selecionada. A temperatura de secagem foi escolhida com base no ponto de ebulição da água. Os resultados obtidos estão exibidos na Figura 16.

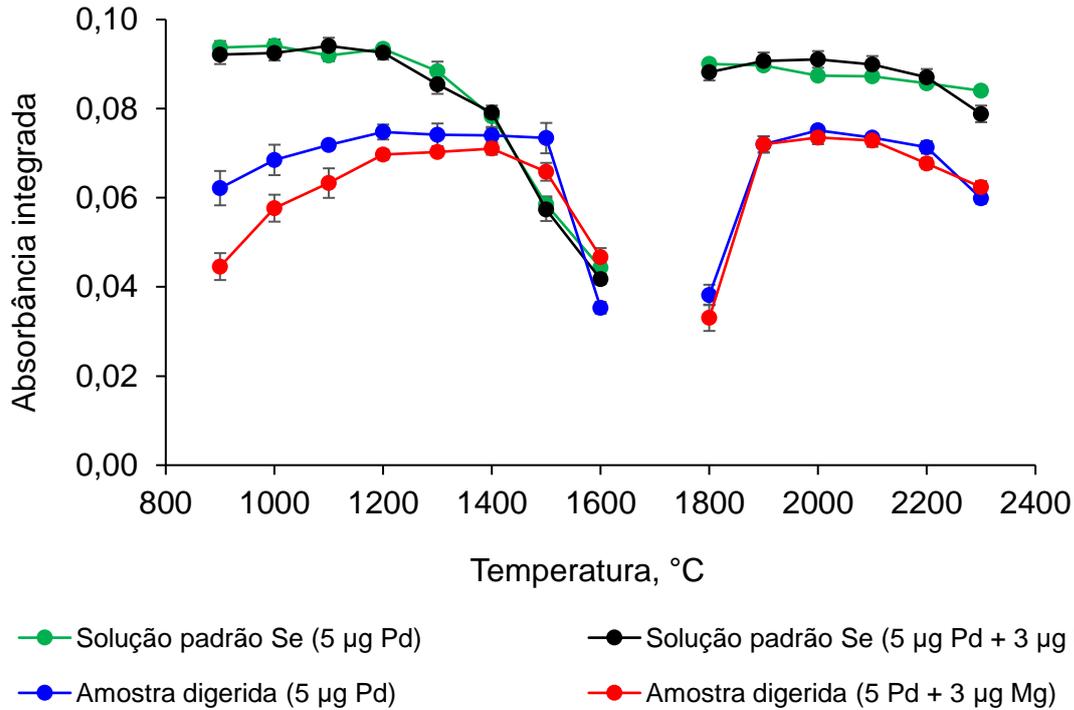


Figura 16. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Se em solução padrão contendo 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se e solução obtida após decomposição da amostra A por MWAD, sendo a mistura de Pd-Mg e Pd usados como modificadores químicos. As barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 3$).

Conforme demonstrado na Figura 16, na etapa de pirólise, para 5 μg de Pd e mistura 5 μg de Pd e 3 μg de Mg na solução padrão de Se, a absorbância integrada do analito permaneceu estável na faixa de 900 a 1200 $^{\circ}\text{C}$, sem ter sido observada diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste ANOVA) entre os sinais do analito para ambos os modificadores. Porém, foi observado um decréscimo do sinal a partir de 1300 $^{\circ}\text{C}$, provavelmente associado à volatilização do analito e consequente redução da absorbância na etapa de atomização do Se.

No digerido da amostra, a absorbância integrada permaneceu constante na faixa de temperatura de 1100 a 1500 $^{\circ}\text{C}$ quando 5 μg de Pd foram empregados como modificador químico, sem diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste ANOVA) entre os sinais do analito nesse intervalo de temperatura. Quando foi utilizado o modificador químico misto, essa faixa se restringiu entre 1200 e 1400 $^{\circ}\text{C}$, igualmente sem diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste ANOVA) entre os sinais de absorbância integrada. Em

ambas as condições de modificadores, foi observada uma redução do sinal do analito em temperaturas inferiores a 1100 °C, que pode estar associada a interferências na etapa de atomização do analito devido à remoção inadequada da matriz da amostra na etapa de pirólise.

É comum que, na avaliação das temperaturas da etapa de pirólise, seja selecionada a temperatura mais elevada possível visando a maior remoção da matriz. Porém, para elementos voláteis como As, Pb e Se, essa escolha pode aumentar o risco de perdas de analito durante a etapa de pré-atomização e resultar em concentrações erroneamente baixas.⁶⁹ Diante disso, a temperatura de pirólise foi fixada em 1200 °C, por atender a condição de menor temperatura necessária para remoção da matriz quando utilizado o modificador químico Pd-Mg e também por não ter havido diferença significativa entre os sinais de absorvância nas temperaturas de 1100 °C e 1500 °C quando empregado somente Pd como modificador químico, tanto para o digerido da amostra quanto a solução de selênio. Adicionalmente, vale ressaltar que a temperatura de pirólise em 1200 °C é amplamente empregada na determinação de Se por GFAAS, independentemente do método de preparo de amostras utilizado.⁹⁴⁻⁹⁹

Em relação às temperaturas de atomização, os sinais de absorvância integrada permaneceram semelhantes em 1900, 2000 e 2100 °C para ambos os modificadores na solução do digerido, sem diferença estatisticamente significativa entre os valores de absorvância (nível de confiança de 95%, teste ANOVA). Como também não havia diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste ANOVA) entre os sinais do analito obtidos para a solução padrão de Se, nesse intervalo de temperatura, de 1900 °C a 2100 °C, foi selecionada uma temperatura intermediária, de 2000 °C, para a quantificação do analito tanto no digerido quanto em solução padrão de Se.

Apesar do comportamento térmico ser relativamente semelhante para os dois modificadores químicos na solução do digerido, ao utilizar o modificador Pd-Mg, foi notado um aumento expressivo do sinal de fundo em todas as temperaturas avaliadas. Para a pirólise em 1200 °C e atomização em 2000 °C, por exemplo, a média da absorvância integrada do sinal de fundo foi 0,208 para

o modificador químico misto e 0,141 para o Pd, ou seja, um aumento superior a 45% no sinal de fundo, conforme exibido na Figura 17.

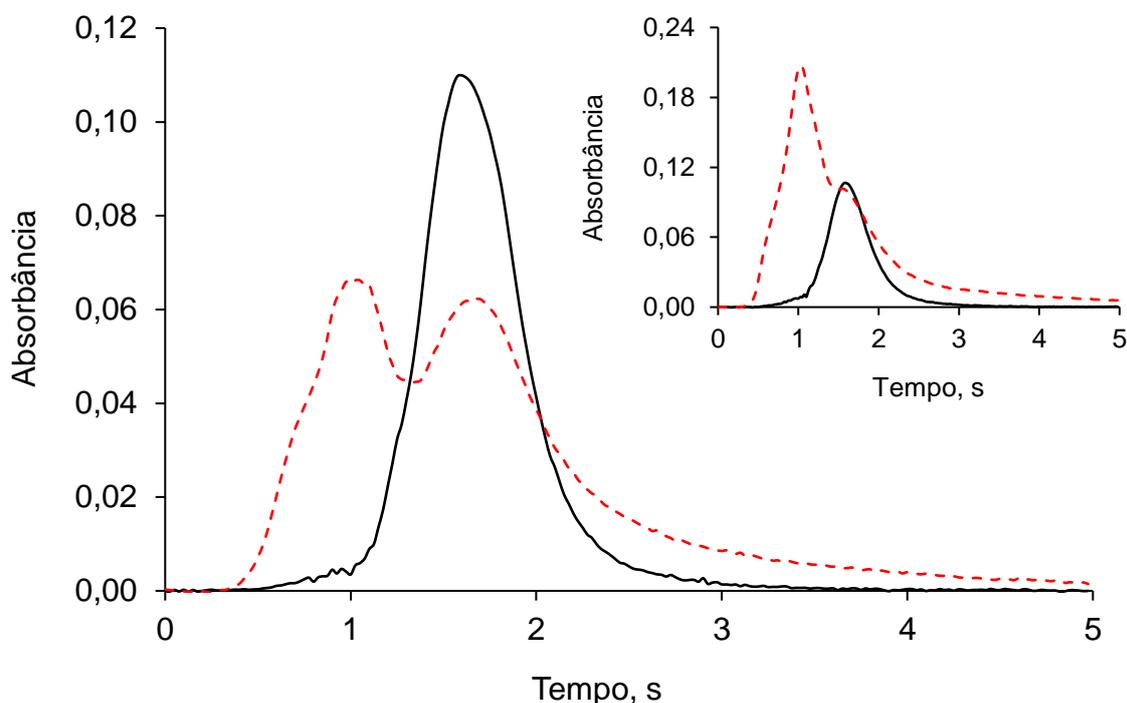


Figura 17. Comparação dos perfis de absorvância do analito (—) e fundo (---) para os modificadores químicos de Pd e Pd-Mg empregados nos digeridos obtidos da MWAD, da esquerda para a direita, respectivamente. A temperatura de pirólise foi fixada em 1200 °C e a de atomização em 2000 °C.

A primeira suposição para o aumento do sinal de fundo quando utilizado o modificador misto é que a presença exclusiva de Pd proporcionou uma estabilização mais eficaz das espécies químicas que contribuem para o fundo, como os fosfatos, que estão presentes em alta concentração na amostra A. Como já relatado, o modificador Pd, seja isolado ou em combinação com cálcio, desempenha um papel significativo na estabilização de moléculas gasosas, como o PO e o P₂, que são intermediários no processo de atomização do fósforo.^{100,101} Embora alguns autores sugiram que as interferências espectrais para a linha de ressonância do selênio (196,0 nm) causadas pelo fosfato possam ser eliminadas com a correção de fundo pelo efeito Zeeman,¹⁰² outros estudos mencionam que a elevada concentração de fosfato pode provocar interferência espectral em 196,0 nm por causa do fundo finamente estruturado.^{95,103,104}

A segunda suposição considera que elevado teor de nitrato de magnésio, devido à adição do modificador químico e o produto da reação do óxido de magnésio com ácido nítrico, decorrente do magnésio presente na composição da matriz da amostra A, podem ter contribuído para o aumento do sinal de fundo. Essa circunstância foi previamente registrada por Gammelgaard e Jons que conduziram uma comparação entre o desempenho dos modificadores paládio e paládio-magnésio na análise de material certificado de plasma.¹⁰⁵ Concluíram que o sinal de absorção de fundo na presença do modificador misto tornava-se significativamente mais elevado ao utilizar quantidades acima de 20 µg do modificador. Além disso, notaram a formação de uma fina camada de coloração branca nas extremidades do tubo de grafite, o que também resultava em uma gradual diminuição da sensibilidade do método analítico.

Em razão das problemáticas encontradas com o modificador misto, a escolha foi utilizar somente paládio como modificador químico.

5.6.2 Avaliação de interferência provocada por efeito de matriz

O efeito de matriz é um fenômeno que ocorre quando os componentes da matriz da amostra, exceto o analito, interferem no sinal do analito.¹⁰⁶ Na GFAAS, o efeito de matriz ocorre quando os componentes da matriz de uma amostra inibem a formação de átomos do analito livres ou contribuem para a volatilização do analito antes da etapa de atomização dele. A principal forma de contorná-lo é através das condições STPF, que compreendem essencialmente a atomização em plataforma de grafite, integração do sinal em área de pico e modificadores químicos.^{66,107} Sob essas condições, concentrações relativamente elevadas de matriz na faixa de mg L⁻¹ podem ser toleradas além da faixa de µg L⁻¹ do analito. No entanto, é geralmente recomendado que as soluções de calibração correspondam às amostras em relação ao componente principal da matriz, a fim de minimizar os efeitos da matriz.⁶⁹

Para investigar a presença de efeito de matriz na determinação de Se na amostra digerida, foram preparadas duas curvas de calibração com concentrações entre 0 a 120 µg L⁻¹ (0 a 1,8 ng), conforme ilustrado na Figura 18. Uma curva de calibração externa foi preparada a partir de soluções padrões de Se meio aquoso, enquanto a curva por adição de padrão foi preparada

adicionando-se quantidades crescentes de Se ao digerido da amostra A, obtido mediante a MWAD.

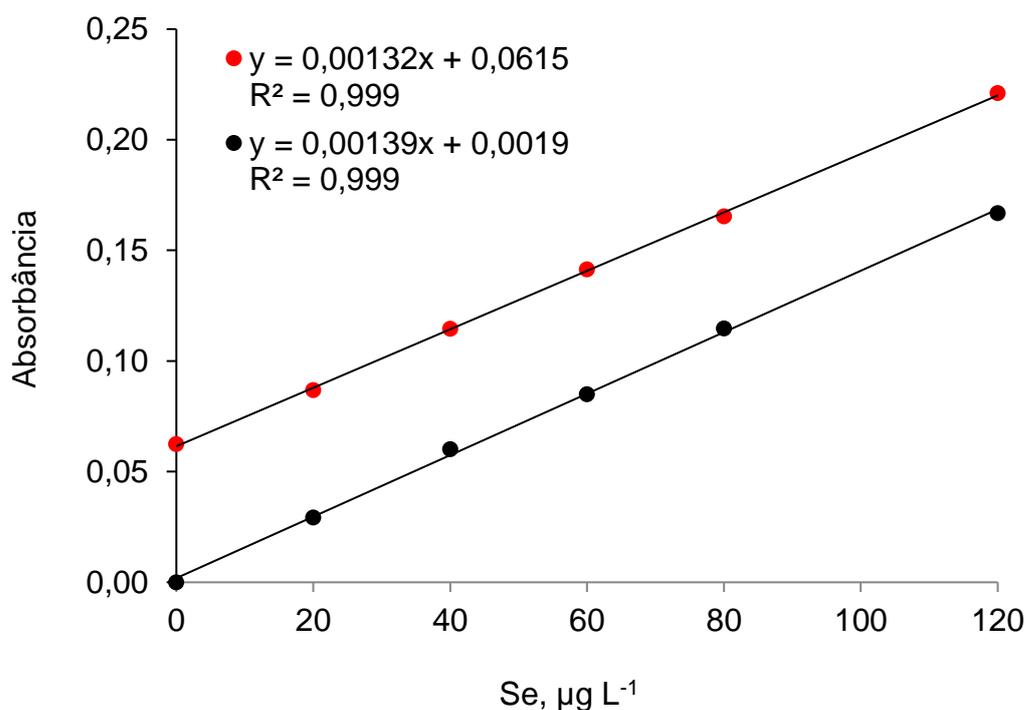


Figura 18. Efeito da matriz na sensibilidade das curvas de calibração externa (●) e adição padrão (●).

Conforme exibido na Figura 18, as curvas de calibração têm inclinações similares, sendo 0,00132 para solução padrão e 0,00139 para a adição de padrão. O coeficiente de correlação (R^2) para ambas foi 0,999. Embora a sensibilidade tenha sido aproximadamente 5% maior na presença da amostra, o aumento não foi significativo (nível de confiança de 95%, teste *t-Student*), indicando que a matriz da amostra não interferiu consideravelmente nos mecanismos de atomização do analito. Para a avaliação do efeito de matriz, seria melhor analisar o digerido diretamente, sem diluí-lo. Porém, o uso de soluções contendo no máximo 1% de HNO_3 é recomendado, sendo assim foi necessário adicionar uma etapa de diluição de 5 vezes do digerido da amostra, obtendo-se a acidez residual de 0,95%. Como o preparo da curva de calibração por adição de padrão é mais moroso e sujeito a contaminações, foi selecionada a calibração externa visando não comprometer a frequência analítica.

5.6.3 Avaliação da massa característica

As massas características obtidas para o digerido da amostra e a solução padrão de Se foram 44,1 e 44,2 pg de Se, respectivamente. Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho já foram reportados para o tubo de grafite end-cap. Em um estudo sobre determinação de Se por GFAAS em amostras biológicas, Feuerstein e Schlemmer ¹⁰⁸ obtiveram uma massa característica de 41,2 pg de Se. O modificador químico utilizado foi Pd-Mg, e temperatura de pirólise e atomização foram 1000 e 2150 °C, respectivamente. Freschi e colaboradores ¹⁰⁹ avaliaram o uso de Ir como modificador químico na determinação simultânea de As, Bi, Pb, Sb e Se em amostras de leite. Para o selênio, a massa característica alcançada foi 53 pg quando as temperaturas de pirólise e atomização foram 1300 e 2200 °C, respectivamente. Os autores associaram a massa característica mais elevada com a mais alta temperatura empregada durante a atomização e ao modificador químico empregado.

Apesar da massa característica alcançada neste trabalho ser superior ao esperado, de 29 pg de selênio, quando empregado o tubo de grafite end-cap ⁶⁹, os valores obtidos foram similares, evidenciando a ausência do efeito de matriz na determinação de selênio por GFAAS.

5.6.4 Avaliação dos perfis de absorvância do Se nos digeridos

Após estabelecidas as condições do método de determinação de selênio por GFAAS, foram avaliados os perfis de absorvância do Se nos digeridos da amostra A obtidos mediante os três métodos de decomposição avaliados. Os resultados são ilustrados na Figura 19.

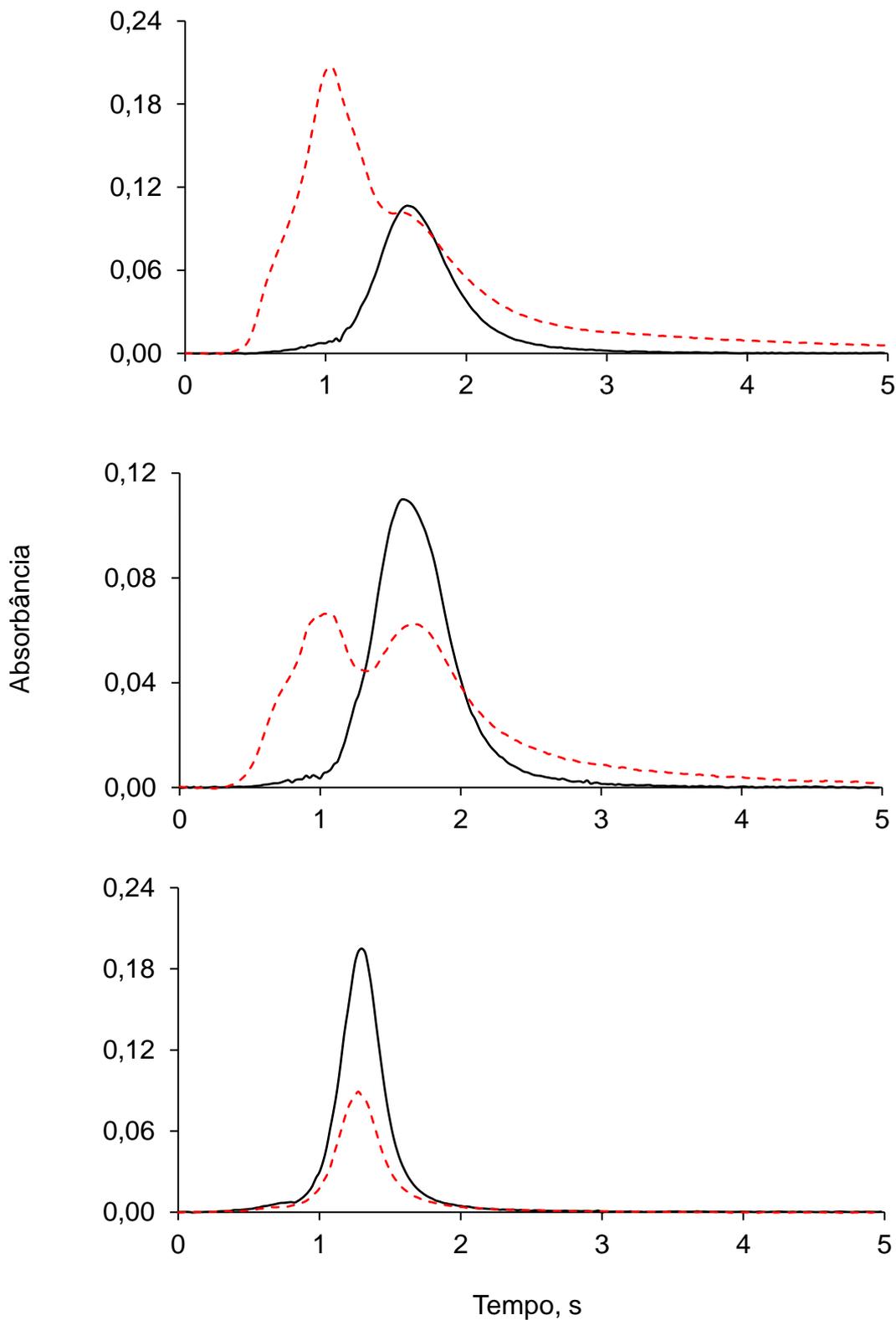


Figura 19. Perfis dos sinais de absorvância do Se (—) e fundo (---) nos digeridos da amostra A decomposta em bloco digestor, por MWAD e MIC, de cima para baixo, respectivamente. A temperatura de pirólise foi 1200 °C e a de atomização foi 2000 °C.

Conforme mostrado visualizado na Figura 19, os perfis dos sinais do Se nos digeridos oriundos da decomposição por bloco digestor e por MWAD foram semelhantes. Para ambos, há um sinal de fundo mais acentuado e um alargamento na base dos picos em comparação com os sinais para o digerido da MIC. Essas variações podem ser esclarecidas pelas particularidades dos procedimentos de cada método de decomposição.

Nos métodos por via úmida, a maioria dos constituintes inorgânicos permanece em solução na forma de sais solúveis em água, como nitratos, cloretos ou sulfatos e entre outros, a depender das interações na solução do digerido.¹¹⁰ Os fosfatos inorgânicos, como CaHPO_4 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mencionados na embalagem do suplemento da amostra, são solúveis em HNO_3 e assim como outros constituintes, permanecerão no digerido após a decomposição por via úmida. Como resultado disso, na etapa de atomização do selênio, as moléculas gasosas de fosfato podem causar interferência espectral, o que explica o sinal de fundo mais proeminente. Além disso, outros metais em solução podem alterar a volatilização do selênio, mesmo estabilizado com Pd, e influenciar no alargamento do sinal, aumentando o tempo de residência no interior do tubo de grafite.⁶⁹

Na MIC, os fosfatos, assim como óxidos de metais, sulfatos não voláteis e silicatos presentes na amostra não irão para a solução absorvedora devido à não volatilização deles durante a decomposição da amostra.⁵² Por serem termicamente estáveis, os fosfatos permanecem no resíduo inorgânico proveniente da combustão e não se solubilizam na solução absorvedora. Sendo assim, acredita-se que essa seja a explicação para a observação de um menor sinal de fundo relacionado com a MIC.

Apesar do sinal de fundo mais proeminente para os métodos por via úmida, o sinal do analito não foi prejudicado devido à correção de fundo realizada pelo corretor baseado no efeito Zeeman. Dessa forma, foi possível realizar a quantificação de Se em todos os digeridos, independentemente do método de decomposição utilizado. A massa característica obtida para os métodos de decomposição em bloco digestor, MWAD e MIC foi 44,5, 44,1 e 44,2 respectivamente.

5.7 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM OUTRAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Foi conduzida a análise das amostras de suplementos dietéticos selecionadas neste trabalho. Os resultados podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração de Se em suplementos dietéticos segundo diferentes métodos de decomposição das amostras. Os resultados são expressos em média e desvio padrão de três replicatas para o bloco digestor e para a MWAD (n = 3) e quatro replicatas para a MIC (n = 4).

Amostra	Se, $\mu\text{g g}^{-1}$			Concentração de Se ^a
	Bloco digestor	MWAD	MIC	
A	33,5 \pm 1,7	32,1 \pm 0,6	31,5 \pm 0,6	30
B	36,4 \pm 1,4	33,9 \pm 1,2	36,1 \pm 1,7	34
C	132,3 \pm 6,0	129,6 \pm 3,5	124,9 \pm 4,8	132
D	211,3 \pm 7,6	218,1 \pm 3,8	219 \pm 8,8	200
E	12,8 \pm 0,4	12,9 \pm 0,2	7,5 \pm 0,3	10

^a Informada no rótulo do suplemento dietético.

Como pode ser visto na Tabela 11, foi possível quantificar Se nas amostras de suplementos dietéticos mediante os três métodos de decomposição avaliados, com exceção da amostra E mediante a MIC. Nas amostras A, B, C e D, a concentração média de Se encontrada foi 32,4, 35,5, 128,9 e 216,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para essas amostras, a concentração de Se encontrada através dos três métodos de decomposição avaliados não tinham diferenças significativas (nível de confiança de 95%, teste ANOVA). Além disso, as concentrações de Se foram condizentes com os valores informados nos rótulos dos suplementos dietéticos (nível de confiança de 95%, teste *t-Student*).

Na amostra E, cuja concentração de selênio informada no rótulo é 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, foram encontrados 12,8, 12,9 e 7,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para decomposição em bloco digestor, MWAD e a MIC, respectivamente. Ao comparar esses resultados, foi observado a diferença significativa (nível de confiança de 95%, teste ANOVA) entre os valores. No caso da MIC, a concentração de Se encontrada foi 58%

inferior àquela encontrada para os métodos de decomposição por via úmida. Essa diferença pode ser atribuída à incompleta volatilização do analito na MIC devido à composição majoritariamente inorgânica da matriz da amostra. Em contraste com as amostras A, B, C e D, cujos teores de carbono total eram 29,6%, 39,4%, 36,6% e 40,6%, respectivamente, a amostra E continha apenas 9,7% de carbono. Além do mais, observou-se uma elevada quantidade de resíduo após a combustão da amostra E (ver Figura 20). Isso indica que a massa de 300 mg de celulose microcristalina não foi suficiente para auxiliar no processo de combustão no meio reacional, e como consequência, o selênio não foi totalmente volatilizado da fração inorgânica da matriz. Diante disso, os valores obtidos na MIC foram desconsiderados para a amostra E.



Figura 20. Pastilha da amostra E antes e após a MIC, da esquerda para a direita.

Segundo as diretrizes da ANVISA, os valores mínimos e máximos de ingestão diária recomendada (IDR) de selênio para adultos são estabelecidos em 8,2 μg e 319,7 μg , respectivamente. Essas quantidades são calculadas com base nas atuais recomendações diárias estipuladas por referências internacionais, como o IOM e a EFSA.^{29,111,112} De modo geral, nas cinco amostras de suplementos dietéticos, o teor de selênio determinado situou-se na faixa de 92,6 a 129% do valor declarado, ainda assim, inferiores à quantidade máxima da IDR, sendo aproximadamente 10, 11, 40, 67 e 4% para as amostras A, B, C, D e E, respectivamente. Portanto, todas as amostras estão em conformidade com as especificações do órgão regulador, garantindo que são

seguras para o consumo diário nas quantidades definidas nas respectivas embalagens.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível demonstrar a aplicabilidade de três métodos de decomposição de amostras para suplementos dietéticos e subsequente quantificação de selênio por GFAAS. Dentre os métodos, a MIC proporcionou a melhor eficiência de decomposição, menor tempo de aquecimento e uso de ácido nítrico mais diluído. As condições otimizadas foram de 5 min para a decomposição de 250 mg de amostra, misturados com 200 mg de celulose microcristalina como auxiliar de combustão. A solução absorvedora foi ácido nítrico 0,25 mol L⁻¹, representando uma redução de 20 vezes a concentração do ácido utilizado na decomposição em bloco digestor e de 10 vezes para a MWAD.

Nas medições por GFAAS, foi verificado que ao utilizar o modificador químico de Pd foi obtido menor sinal de absorbância de fundo nos digeridos da MWAD, em relação ao modificador misto Pd-Mg. Isto pode ser explicado pela estabilização mais eficaz das espécies químicas que contribuem para o sinal de fundo, como os fosfatos, que podem estar presentes em alta concentração na amostra A. Além disso, foi observado que a matriz do digerido obtido na MWAD, não interferiu na quantificação do analito. No entanto, a solução final precisou ser diluída, ao menos, 5 vezes para não diminuir a vida útil do tubo de grafite

Embora na MIC tenha sido utilizada a massa inferior do que na MWAD e na decomposição em bloco digestor, foram observados menores limites de detecção e quantificação para a MIC, sendo eles 0,08 µg g⁻¹ e 0,21 µg g⁻¹, respectivamente. Como na MIC foi utilizada ácido nítrico mais diluído, não houve necessidade de diluição adicional da solução do digerido, diferentemente dos digeridos obtidos nos métodos de decomposição por via úmida. Sendo assim, o LOD e LOQ para a MIC foram melhores.

Para uma das quatro amostras de suplemento analisadas a MIC não foi eficiente, possivelmente porque não ocorreu a volatilização completa do selênio na matriz inorgânica da amostra, o que acarretou na determinação de uma concentração de Se inferior a encontrada para os métodos de decomposição por

via úmida. Nas amostras analisadas os teores de selênio encontrados eram de 92,6% a 129% do valor declarado no rótulo.

De qualquer forma, os métodos de decomposição avaliados são adequados para determinação de selênio por GFAAS em suplementos dietéticos. A escolha do método dependerá de considerações específicas, como disponibilidade de tempo, materiais e equipamentos disponíveis no laboratório, ressaltando a necessidade de adequação do método conforme as exigências de cada análise.

7. REFERÊNCIAS

1. Rayman, M. P. Selenium and Human Health. *The Lancet*, **2012**, 379, 1256–1268.
2. Mojadadi, A.; Au, A.; Salah, W.; et al. Role for Selenium in Metabolic Homeostasis and Human Reproduction. *Nutrients*, **2021**, 13, 3256.
3. Kieliszek, M. Selenium—Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules*, **2019**, 24, 1298.
4. Johnson, C. C.; Fordyce, F. M.; Rayman, M. P. Symposium on ‘Geographical and geological influences on nutrition’ Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition: Conference on ‘Over- and undernutrition: challenges and approaches.’ *Proc. Nutr. Soc.*, **2010**, 69, 119–132.
5. Federal Drug Administration. FDA 101: Dietary Supplements. *FDA* **2022**. Disponível em: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/fda-101-dietary-supplements>.
6. Hirtz, A.; Günther, K. Determination of Total Selenium and Extractability of Selenium in Commercially-Available Dietary Supplements by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS). *Anal. Lett.*, **2020**, 53, 2529–2544.
7. Suhajda, Á.; Hegóczki, J.; Janzsó, B.; et al. Preparation of Selenium Yeasts I. Preparation of Selenium-Enriched *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2000**, 14, 43–47.
8. Rayman, M. P. Selenium Intake, Status, and Health: A Complex Relationship. *Hormones*, **2020**, 19, 9–14.
9. Blaze, J. A Comparison of Current Regulatory Frameworks for Nutraceuticals in Australia, Canada, Japan, and the United States. *Innov. Pharm.* **2021**, 12 (2), 1–8.
10. Smichowski, P.; Londonio, A. The Role of Analytical Techniques in the Determination of Metals and Metalloids in Dietary Supplements: A Review. *Microchem. J.*, **2018**, 136, 113–120.
11. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; et al. *Fundamentos de química analítica*; 9ª.; Cengage Learning, 2021.

12. Brown, K. M.; Arthur, J. R. Selenium, Selenoproteins and Human Health: A Review. *Public Health Nutr.*, **2001**, 4, 593–599.
13. Combs, G. F.; Combs, S. B. 1 - CHEMICAL ASPECTS OF SELENIUM. In: *The Role of Selenium in Nutrition*; Academic Press, 1986. p. 1–14.
14. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds; Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients; Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes; et al. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*; National Academies Press: Washington, D.C., 2000; p. 9810.
15. Kieliszek, M.; Błażej, S. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules*, **2016**, 21, 609.
16. Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in Food and the Human Body: A Review. *Sci. Total Environ.*, **2008**, 400, 115–141.
17. Boggia, R.; Zunin, P.; Turrini, F. Functional Foods and Food Supplements. *Appl. Sci.*, **2020**, 10, 8538.
18. Constantinescu-Aruxandei, D.; Frîncu, R. M.; Capră, L.; et al. Selenium Analysis and Speciation in Dietary Supplements Based on Next-Generation Selenium Ingredients. *Nutrients*, **2018**, 10, 1466.
19. Niedzielski, P.; Rudnicka, M.; Wachelka, M.; et al. Selenium Species in Selenium Fortified Dietary Supplements. *Food Chem.*, **2016**, 190, 454–459.
20. Clark, L. C.; Combs, G. F., Jr; Turnbull, B. W.; et al. Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, **1996**, 276, 1957–1963.
21. Hsueh, Y.-M.; Su, C.-T.; Shiue, H.-S.; et al. Levels of Plasma Selenium and Urinary Total Arsenic Interact to Affect the Risk for Prostate Cancer. *Food Chem. Toxicol.*, **2017**, 107, 167–175.
22. Lippman, S. M.; Klein, E. A.; Goodman, P. J.; et al. Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*, **2009**, 301, 39–51.
23. Fairweather-Tait, S. J.; Bao, Y.; Broadley, M. R.; et al. Selenium in Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.*, **2011**, 14, 1337–1383.
24. Rayman, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br. J. Nutr.*, **2008**, 100, 254–268.

25. FDA. Federal Drug Administration. Food Labeling: Revision of the Nutrition and Supplement Facts Labels: Guidance for Industry - Small Entity Compliance Guide. **2020**, 38.
26. EFSA. European Food Safety Authority. *Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals*. Parma, 2006.
27. EFSA; Cubadda, F.; Ciccolallo, L.; et al. Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level for Selenium. *EFSA J.*, **2023**, 21.
28. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, Brasília, DF, 2005.
29. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa - IN nº 28, de 26 de julho de 2018, Brasília, DF, 2018.
30. Clark, R. F.; Strukle, E.; Williams, S. R.; et al. Selenium Poisoning From a Nutritional Supplement. *JAMA* , **1996**, 275, 1087–1088.
31. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). CDC alert on adverse effects associated with consuming “Total Body Formula” and “Total Body Mega Formula”. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25185> Acesso em: 14 jan. 2024.
32. Roche, A.-M. The link between Big Pharma and the supplement industry | Elsevier. Disponível em: <https://www.elsevier.com/connect/the-link-between-big-pharma-and-the-supplement-industry> Acesso em: 14 jan. 2024.
33. Krug, J. F.; Rocha, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**; 2ª Ed. São Paulo: EditSBQ-Sociedade Brasileira de Química, 2019.
34. Matusiewicz, H. Sample Preparation for Inorganic Trace Element Analysis. *Phys. Sci. Rev.*, **2017**, 2.
35. Barin, J. S.; Bizzi, C. A.; Flores, É. M. de M.; et al. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: Krug, F. J.; Rocha, F. R. P (org.) **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2ª Ed. São Paulo: EditSBQ-Sociedade Brasileira de Química, 2019.
36. Jackwerth, E.; Wurfels, M. Pressure Digestion: Apparatus, Problems and Applications. In: Stoeppler, M. (org.) **Sampling and Sample Preparation**. Berlin: Springer Heidelberg, 1997.

37. Latif, A. L. O. **Avaliação do teor total e bioacessível de macro e microelementos em suplementos polivitamínicos e minerais comercializados na Bahia, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Estado da Bahia: Salvador, 2023.
38. Mello, P. A.; Barin, J. S.; Guarnieri, R. A. Microwave Heating. In: Flores, E. M. M (org). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis.** Elsevier, 2014.
39. Gedye, R. Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation and Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 4729–4729.
40. Moraes, D. P.; Bizzi, C. A.; Nóbrega, J. A.; et al. Preparo de amostras assistido por radiação micro-ondas. In: Krug, F. J.; Rocha, F. R. P (org.) **Métodos de preparo de amostras para análise elementar.** 2ª Ed. São Paulo: EditSBQ-Sociedade Brasileira de Química, 2019.
41. Abu-Samra, Adel.; Morris, J. Steven.; Koirtyohann, S. R. Wet Ashing of Some Biological Samples in a Microwave Oven. *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1475–1477.
42. Nóbrega, J. A.; Pirola, C.; Fialho, L. L.; et al. Microwave-Assisted Digestion of Organic Samples: How Simple Can It Become? *Talanta*, **2012**, 98, 272–276.
43. Smith, F.; Arsenault, E. Microwave-Assisted Sample Preparation in Analytical Chemistry. *Talanta*, **1996**, 43, 1207–1268.
44. Tumir, H.; Bošnjir, J.; Vedrinar-Dragojević, I.; et al. Monitoring of Metal and Metalloid Content in Dietary Supplements on the Croatian Market. *Food Control*, **2010**, 21, 885–889.
45. Santos Júnior, A. D. F.; Matos, R. A.; Andrade, E. M. J.; et al. Multielement Determination of Macro and Micro Contents in Medicinal Plants and Phytomedicines from Brazil by ICP OES. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2016**.
46. Araújo, G. C. L.; Gonzalez, M. H.; Ferreira, A. G.; et al. Effect of Acid Concentration on Closed-Vessel Microwave-Assisted Digestion of Plant Materials. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2002**, 57, 2121–2132.
47. Trevizan, L. C.; Donati, G. L.; Nogueira, A. R. A.; et al. Microwave-Assisted Procedures for Sample Preparation: Recent Development. In: Arruda, M. A. Z. **Trends in sample preparation** (org.). New York: Nova Science Publishers, 2007.

48. Bizzi, C. A.; Nóbrega, J. A.; Barin, J. S. Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion. In: Flores, E. M. M (org). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Elsevier, 2014.
49. Pereira, R. M.; Crizel, M. G.; La Rosa Novo, D.; et al. Multitechnique Determination of Metals and Non-Metals in Sports Supplements after Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Acid. *Microchem. J.*, **2019**, 145, 235–241.
50. Barin, J. S.; Flores, É. M. M.; Mesko, M. F.; et al. Microwave-Induced Combustion. In: Flores, E. M. M (org). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Elsevier, 2014.
51. Flores, É. M. M.; Barin, J. S.; Mesko, M. F.; et al. Sample Preparation Techniques Based on Combustion Reactions in Closed Vessels — A Brief Overview and Recent Applications. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2007**, 62, 1051–1064.
52. Flores, É. M. M.; Flores, E. L. M.; Paniz, J. N. G.; et al. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: Krug, F. J.; Rocha, F. R. P (org.) **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2ª Ed. São Paulo: EditSBQ-Sociedade Brasileira de Química, 2019.
53. Mesko, M. F. **Determinação de Halogênios Em Carvão, Coque Petroquímico e Alimentos Após Combustão Iniciada Por Microondas**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Maria: Santa Maria-RS, 2008.
54. Flores, É. M. de M.; Barin, J. S.; Paniz, J. N. G.; et al. Microwave-Assisted Sample Combustion: A Technique for Sample Preparation in Trace Element Determination. *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 3525–3529.
55. Mello, P. A.; Diehl, L. O.; Oliveira, J. S. S.; et al. Plasma-Based Determination of Inorganic Contaminants in Waste of Electric and Electronic Equipment after Microwave-Induced Combustion. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2015**, 105, 95–102.
56. Pereira, L. S. F.; Pedrotti, M. F.; Enders, M. S. P.; et al. Multitechnique Determination of Halogens in Soil after Selective Volatilization Using Microwave-Induced Combustion. *Anal. Chem.*, **2017**, 89, 980–987.

57. Picoloto, R. S.; Wiltsche, H.; Knapp, G.; et al. Determination of Inorganic Pollutants in Soil after Volatilization Using Microwave-Induced Combustion. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2013**, 86, 123–130.
58. Pereira, J. S. F.; Pereira, L. S. F.; Schmidt, L.; et al. Metals Determination in Milk Powder Samples for Adult and Infant Nutrition after Focused-Microwave Induced Combustion. *Microchem. J.*, **2013**, 109, 29–35.
59. Pereira, R. M. **Desenvolvimento de Métodos Alternativos Para a Determinação de Metais Em Suplementos Dietéticos Por Cromatografia de Íons Com Detecção Condutimétrica Direta**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Pelotas: Pelotas, RS, 2018.
60. Borges, D. L. G.; Holcombe, J. A. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. In: Meyers, R. A.(org.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Wiley, 2017.
61. Frech, Wolfgang.; Baxter, D. C.; Huetsch, Bruno. Spatially Isothermal Graphite Furnace for Atomic Absorption Spectrometry Using Side-Heated Cuvettes with Integrated Contacts. *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1973–1977.
62. L'vov, B.; Pelieva, L.; Sharnopolsky, A. Decrease in the Effect of the Base during Atomic Absorption Analysis of Solutions in the Tube Furnaces by Evaporation of Samples from a Graphite Substrate. *Zh Prikl Spektrosk.*, **1977**, 27, 395–399.
63. Slavin, W. Chapter 3 - Graphite Furnace AAS. In: R.F.M. Herber, R.; Stoeppler, M.(org.). **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, Germany: Elsevier, 1994.
64. Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*, 3nd.ed.; Wiley-VCH, 1999.
65. Manning, D. C.; Slavin, W. The Determination of Trace Elements in Natural Waters Using the Stabilized Temperature Platform Furnace. *Appl. Spectrosc.*, **1983**, 37, 1–11.
66. Slavin, W.; Manning, D.; Carnrick, G. The Stabilized Temperature Platform Furnace. *Spectrosc.*, **1981**, 2, 137–145.
67. Slavin, W. Atomic Absorption Spectrometry. In: Riordan, J. F.; Vallee, B. L. **Methods in Enzymology**; Elsevier, 1988.

68. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*; 9nd.ed.. New York: Freeman & Company, 2016.
69. Schlemmer, G.; Radziuk, B. *Analytical Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A Laboratory Guide*. Birkhäuser: Berlin, 1999.
70. Schlemmer, G.; Welz, B. Palladium and Magnesium Nitrates, a More Universal Modifier for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **1986**, 41, 1157–1165.
71. Wennrich, R.; Frech, W.; lundberg, E. Spectral interferences in graphite furnace Zeeman effect atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **1989**, 44, 239-246.
72. Knowles, M. B.; Brodie, K. G. Determination of Selenium in Blood by Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Using a Palladium-Ascorbic Acid Chemical Modifier. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1988**, 3, 511.
73. Gardiner, P. H. E.; Littlejohn, D.; Halls, D. J.; et al. Direct Determination of Selenium in Human Blood Serum and Plasma by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **1995**, 9, 74–81.
74. Saeed, K.; Thomassen, Y. Spectral Interferences from Phosphate Matrices in the Determination of Arsenic, Antimony, Selenium and Tellurium by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **1981**, 130, 281–287.
75. De Loos-Vollebregt, M. T. C. Background Correction Methods in Atomic Absorption Spectrometry. In: Meyers, R. A.(org.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Wiley, 2013.
76. Carnrick, G. R.; Manning, D. C.; Slavin, W. Determination of Selenium in Biological Materials with Platform Furnace Atomic-Absorption Spectroscopy and Zeeman Background Correction. *The Analyst*, **1983**, 108, 1297.
77. Ediger, R. D. Atomic Absorption Analysis with the Graphite Furnace Using Matrix Modification. *Atom. Absorpt. Newsletter*, **1975**, 14, 127–130.
78. Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A. Study of Ammonium Molybdate to Minimize the Phosphate Interference in the Selenium Determination by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with Deuterium Background Correction. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2002**, 57, 327–337.

79. Ciappellano, S.; Brighenti, F.; Porrini, M.; et al. Selenium determination in foodstuffs using zeeman GFAAS. In: Minoia, C.; Caroli, S. (org.). **Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology**. Elsevier, 1992, 279–304.
80. Sanzolone, R. F.; Chao, T. T. Matrix Modification with Silver for the Electrothermal Atomization of Arsenic and Selenium. *Anal. Chim. Acta* , **1981**, 128, 225–227.
81. Welz, B.; Schlemmer, G.; Mudakavi, J. R. Palladium Nitrate–Magnesium Nitrate Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Part 5. Performance for the Determination of 21 Elements. *J Anal Spectrom*, **1992**, 7, 1257–1271.
82. Larsen, E. H.; Ekelund, J. Determination of Total Selenium in Nutritional Supplements and Selenised Yeast by Zeeman-Effect Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *The Analyst*, **1989**, 114, 915.
83. Berghof. *Application Report*; Microwave Pressure Digestion-Speedwave Four v7.0; Germany, **2011**.
84. Rohr, U.; Ortner, H. M.; Schlemmer, G.; et al. Corrosion of Transversely Heated Graphite Tubes by Mineral Acids. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **1999**, 54, 699–718.
85. Kelte Filho, I.; Butik, M.; Jaski, A. C.; et al. Fast Method to Determine the Elements in Maize Flour: Reduction in Preparation Time and Reagent Consumption. *Braz. J. Food Technol.*, **2017**, 21.
86. Lee, J.; Park, Y.-S.; Lee, H.-J.; et al. Microwave-Assisted Digestion Method Using Diluted Nitric Acid and Hydrogen Peroxide for the Determination of Major and Minor Elements in Milk Samples by ICP-OES and ICP-MS. *Food Chem.*, **2022**, 373.
87. Martins, C. A.; Cerveira, C.; Scheffler, G. L.; et al. Metal Determination in Tea, Wheat, and Wheat Flour Using Diluted Nitric Acid, High-Efficiency Nebulizer, and Axially Viewed ICP OES. *Food Anal. Methods*, **2015**, 8, 1652–1660.
88. Narukawa, T.; Hioki, A.; Chiba, K. Aqueous Extraction of Water-Soluble Inorganic Arsenic in Marine Algae for Speciation Analysis. *Anal. Sci.*, **2012**, 28, 773–779.

89. Pereira, J. S. F.; Mello, P. A.; Moraes, D. P.; et al. Chlorine and Sulfur Determination in Extra-Heavy Crude Oil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry after Microwave-Induced Combustion. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2009**, 64, 554–558.
90. IUPAC. *International Union of Pure and Applied Chemistry*; 3^a ed.; The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Research Triangle Park, NC, 2006.
91. Valiente, L.; Piccina, M.; Romero Ale, E.; et al. Determination of Selenium in Dietary Supplements by ETAAS and HG-AAS: A Comparative Study. *At. Spectrosc.*, **2002**, 23, 129–134.
92. Chirita, L.; Covaci, E.; Mot, A.; et al. Determination of Selenium in Food and Environmental Samples by Hydride Generation High-Resolution Continuum Source Quartz Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2021**, 36, 267–272.
93. Tyburska, A.; Jankowski, K. Determination of Selenium in Dietary Supplements by Optical Emission Spectrometry after Alkaline Dissolution and Subsequent Headspace Solid Phase Microextraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, 74, 268–272.
94. Bass, D.; Bosnak, C. P. Determination of Toxic, Trace and Essential Elements in Food Matrices Using THGA Coupled with Longitudinal Zeeman Background Correction - Application Note. **2011**.
95. Radziuk, B.; Thomassen, Y. Chemical Modification and Spectral Interferences in Selenium Determination Using Zeeman-Effect Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7, 397–403.
96. Rosa, C. R.; De Moraes, M.; Neto, J. A. G.; et al. Effect of Modifiers on Thermal Behaviour of Se in Acid Digestates and Slurries of Vegetables by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Chem.*, **2002**, 79, 517–523.
97. Shahid, R.; Kazi, T. G.; Afridi, H. I.; et al. Deep-Eutectic-Solvent-Based Dispersive and Emulsification Liquid–Liquid Microextraction Methods for the Speciation of Selenium in Water and Determining Its Total Content Levels in Milk Formula and Cereals. *Anal. Methods*, **2020**, 12, 5186–5194.

98. Styris, D. L.; Prell, L. J.; Redfield, D. A.; et al. Mechanisms of Selenium Vaporization with Palladium Modifiers Using Electrothermal Atomization and Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 508–517.
99. Tuzen, M.; Pekiner, O. Z. Ultrasound-Assisted Ionic Liquid Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric for Selenium Speciation in Foods and Beverages. *Food Chem.*, **2015**, 188, 619–624.
100. Curtius, A. J.; Schlemmer, G.; Welz, B. Determination of Phosphorus by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Part 2. Comparison of Different Modifiers. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1987**, 2, 115.
101. Lepri, F. G. **Investigações Sobre a Determinação de Enxofre Em Materiais Biológicos, Estabilização, Atomização e Correção de Fundo Baseada No Efeito Zeeman Para o Fósforo e Determinação de Elementos Traço Em Carvão Utilizando Espectrometria de Absorção Atômica e Molecular de Alta Resolução Com Fonte Contínua.** Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2009.
102. Welz, B.; Schlemmer, G. Determination of Arsenic, Selenium and Cadmium in Marine Biological Tissue Samples Using a Stabilised Temperature Platform Furnace and Comparing Deuterium Arc with Zeeman-Effect Background Correction Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1986**, 1, 119.
103. Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U. Observation, Identification and Correction of Structured Molecular Background by Means of Continuum Source AAS—Determination of Selenium and Arsenic in Human Urine. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2000**, 15, 137–141.
104. Castilho, I. N. B.; Pereira, É. R.; Welz, B.; et al. Determination of Selenium in Soil Samples Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Direct Solid Sample Analysis. *Anal. Methods*, **2014**, 6, 2870–2875.
105. Gammelgaard, B.; Jøns, O. Comparison of Palladium Chemical Modifiers for the Determination of Selenium in Plasma by Zeeman-Effect Background Corrected Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal. Spectrom.*, **1997**, 12, 465–470.

106. Guilbault, G. G.; Hjelm, M. Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis (Recommendations 1989). *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1657–1664.
107. Slavin, W.; Carnrick, G. R. The Possibility of Standardless Furnace Atomic Absorption Spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **1984**, 39, 271–282.
108. Feuerstein, M.; Schlemmer, G.; Box, P. O. Determination of Se in Human Serum by GFAAS With Transversely Heated Graphite Atomizer and Longitudinal Zeeman-Effect Background Correction. **1999**, 20.
109. Freschi, G. P. G.; Fortunato, F. M.; Freschi, C. D.; et al. Simultaneous and Direct Determination of As, Bi, Pb, Sb, and Se and Co, Cr, Cu, Fe, and Mn in Milk by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Food Anal. Methods*, **2012**, 5, 861–866.
110. Krug, J. F.; Nóbrega, J. A.; Guerra, M. B. B.; et al. Solubilização e decomposição de sólidos inorgânicos. In: Krug, F. J.; Rocha, F. R. P (org.) **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2ª Ed. São Paulo: EditSBQ-Sociedade Brasileira de Química, 2019.
111. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa - IN nº 102, de 15 de outubro de 2021, Brasília, DF, 2021.
112. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Justificativas para os limites mínimos e máximos de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas da proposta regulatória de suplementos alimentares. Brasília, DF, 2018.