



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MESTRADO
EM QUÍMICA

MARINA SANTOS DE JESUS

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO DE Se (IV)
PARA A DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO TOTAL EM MOLUSCOS BIVALVES
POR HG-MIP OES**

ILHÉUS-BA

2018

MARINA SANTOS DE JESUS

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO DE Se (IV)
PARA A DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO TOTAL EM MOLUSCOS BIVALVES
POR HG-MIP OES**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Química como requisito parcial de obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Castro Lima
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim

ILHÉUS-BA

2018

J58

Jesus, Marina Santos de

Estudo de condições de geração de vapor químico de Se (IV) para a determinação de Selênio total em moluscos bivalves por HG – MIP OES. – Ilhéus, BA: UESC, 2018.

83f. : il.

Orientador: Daniel de Castro Lima
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Selênio. 2. Máquinas a vapor. 3. Análise multivariada. 4. Espectrometria. 5. Espectrômetros ópticos. 6. Bivalve (Molusco). I. Título.

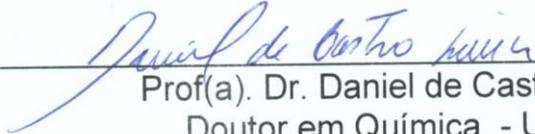
CDD 546.724

MARINA SANTOS DE JESUS

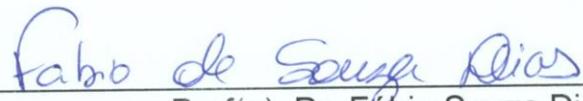
ESTUDOS DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO DE Se PARA DETERMINAÇÃO DE Se TOTAL EM AMOSTRAS DE MOLUSCOS BIVALVES, COROA DO MEIO, RIO CACHOEIRA, ILHÉUS, BAHIA

Ilhéus-BA, 27 de abril de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Daniel de Castro Lima
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dr. Fábio Souza Dias
Doutor em Química - UFBA
Universidade Federal do Recôncavo Baiano



Prof(a). Dr. Ivon Pinheiro Lôbo
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual de Santa Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor incondicional, pela força, sustento e por estar presente em todos os momentos. Ao meu pai Antônio, anjo protetor, o motivo dos meus sorrisos mais sinceros, quero te agradecer por todos os ensinamentos e princípios de vida. A minha mãe, pelo amor incondicional e dedicação.

A todos os meus queridos irmãos e familiares, Jilson, Jildo, Edilson, Genivaldo Jucelino, Gilberto, Marlene, Marineis, Edízio, Maikesse, Laísa, Caroline, Alex, Paulo, Ediraldo, Sáci, e a todos os outros que não foram citados, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Daniel de Castro Lima pela paciência, disponibilidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim, pela co-orientação, incentivo, ensinamentos e oportunidades.

Aos Professores. Dr. Ivon Pinheiro Lobo, Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva, Dr. Raildo Mota de Jesus e Dr. Luana Santos pelos preciosos ensinamentos.

Aos meus queridos colegas, Sêmele Santos, Caroline Santana, Deisy Puentes, Glêydson Amarante, Fernanda Glória, Pedro, Adriana Nascimento e Cayo Farias, pelo companheirismo e amizade que foram fundamentais para tornar os desafios mais leves.

Aos queridos amigos do LQAA e do Laboratório de Água: Wesley Guedes, Ivero Pita, Vinícius Câmara, Luciano Nascimento, Adrielle Fontes, Erivelton Ribeiro, Vanessa Ferreira, Júlia Romero, Sheylla Myrelle, e a todos os outros que não foram citados, pela amizade.

Aos amigos, em especial, a Clissiane Soares, por ter se dedicado no auxílio da realização deste trabalho, a Luana Moreira, que mesmo com a distância sempre se mostrou disponível a colaborar com o que fosse possível para o andamento do trabalho, e a Floriatan Costa pelo incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQUIM) da UESC, pela oportunidade de aperfeiçoamento. A todos que direta e indiretamente contribuíram para a concretização desse trabalho.

RESUMO

O Selênio (Se) é um elemento importante para a desintoxicação e mecanismo antioxidante de defesa do organismo humano. Mas, pode ser tóxico se quantidade excessiva for ingerida de forma contínua. Por isso é fundamental avaliar os níveis deste elemento em amostras alimentícias. Assim, neste trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de selênio em moluscos bivalves lambreta (*Anodontites trapesialis*), moapem (*Tagelus plebeius*) e sururu (*Mytella guyanensis*), coletados no Rio Cachoeira, Ilhéus-Ba, por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas com geração de hidretos (HG-MIP OES). As condições experimentais para gerar o hidreto de selênio foram estabelecidas usando otimização multivariada: inicialmente foi feita uma triagem de fatores por planejamento fatorial de dois níveis e três fatores (2^3), para os fatores concentração de ácido clorídrico ([HCl]), concentração de borohidreto de sódio ([NaBH₄]) e vazão dos reagentes (V.R). Posteriormente, a metodologia de superfície de resposta usando o planejamento Box-Behnken foi usada para estabelecer um modelo matemático e verificar as condições críticas através da Teoria de La Grange. A significância estatística dos fatores no planejamento fatorial foram avaliadas através do diagrama de Pareto, e os três fatores estudados foram significativos. O planejamento Box-Behnken determinou as condições críticas HCl 2,8 mol L⁻¹, NaBH₄ 0,7% m/v e V.R 1,5 mL min⁻¹. Tendo em vista que após a digestão da amostra o selênio é oxidado a seu estado de oxidação mais elevado, foi necessário um procedimento de pré-redução do Se (VI) para Se (IV), antes da reação de geração do hidreto. Tal procedimento foi feito com HCl 6,0 mol L⁻¹ e aquecimento em banhomaria. Assim um planejamento do tipo Doehlert foi usado para avaliar o tempo (10 - 50 min) e a temperatura (25 - 120 °C) de pré-redução, e as condições críticas foram 30 min e 70°C. Limite de detecção 0,30 mg kg⁻¹, limite de quantificação 1,02 mg kg⁻¹ e %RSD de 8% foram obtidos. A exatidão do método foi confirmada pela análise do CRM de tecido de ostra (NIST 1566b). Finalmente, o método desenvolvido foi aplicado nas amostras de moluscos bivalves, e as concentrações de selênio total encontradas foram 2,60 ± 0,33; 2,76 ± 0,15; e 2,60 ± 0,42 mg kg⁻¹ para lambreta, moapem e sururu, respectivamente. O método analítico desenvolvido mostrou-se preciso e de baixo custo, podendo ser usado para determinar selênio em moluscos bivalves.

Palavras-chave: Geração de vapor, selênio, otimização multivariada, HG-MIP OES.

ABSTRACT

Selenium (Se) is an important element for the detoxification and antioxidant defense mechanism of the human body. But, it can be toxic if too much is ingested continuously. Therefore it is fundamental to evaluate the levels of this element in food samples. method for the determination of selenium in bivalve mackerel (*Anodontites trapesialis*), moapem (*Tagelus plebeius*) and sururu (*Mytella guyanensis*), collected in Rio Cachoeira, Ilhéus-Ba, by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (HG-MIP OES). The experimental conditions to generate selenium hydride were established using multivariate optimization: factorial was initially screened for two levels and three factors (2^3) for the factors hydrochloric acid ([HCl]) concentration, borohydride concentration ([NaBH₄]) and reagent flow rate (V.R). Subsequently, the response surface methodology using Box Behnken-type planning was used to establish a mathematical model and verify the critical conditions through the La Grange Theory. The statistical significance of the factors in the factorial planning were evaluated through the Pareto diagram, and the three factors studied were significant. The Box- Behnken design determined the critical conditions HCl 2.8 mol L⁻¹, NaBH₄ 0.7% m/v and V.R 1.5 mL min⁻¹. Considering that after digestion of the sample Se is oxidized to its higher oxidation state, a pre-reduction procedure of Se (VI) was required for Se (IV) prior to the hydride generation reaction. Thus a Doehlert type design was used to evaluate pre-reduction time (10 - 50 min) and temperature (25 – 120 °C), and the critical conditions were 30 min and 70 °C. Limit of detection 0.30 mg kg L⁻¹ and quantification 1.02 mg kg L⁻¹ and %RSD 8% were obtained. The accuracy of the method was confirmed by the CRM analysis of oyster tissue (NIST 1566b). Finally, the method developed was applied in bivalve mollusc samples, and the total selenium concentrations found were 2.60 ± 0.33; 2.76 ± 0.15; and 2.60 ± 0.42 mg kg⁻¹ for lambreta, moapem and sururu, respectively. The analytical method developed was accurate and low cost, and could be used to determine if total bivalve molluscs samples.

Keywords: chemical vapor generation, selenium, Multivariate optimization, HG-MIP OES.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Ciclo biológico do selênio no ambiente aquático. Fonte: (SEIXAS; KEHRING, 2007).
15
- Figura 2 – Sururu (*Mytella guyanensis*) (A), Moapem (*Tagelus plebeius*) (B), Lambreta (*Anodontites trapesialis*) (C).
16
- Figura 3 – Componentes de um espectrômetro com plasma de micro-ondas gerado por N₂ (MP-AES 4200, Agilent Technologies). 27
- Figura 4 – Sistema de introdução de amostra multimodal (MSIS) 28
- Figura 5 – Desenho de um planejamento Doehlert, representado por um hexágono regular com as coordenadas normalizadas, para duas variáveis.
41
- Figura 6 – Obtenção dos pontos experimentais para a matriz Box-Behnken a partir de um planejamento fatorial de três níveis para três fatores.
42
- Figura 7 – Esquema geral do procedimento utilizado para a determinação de selênio por HG-MIP OES.
45
- Figura 8 – Diagrama de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo 2³
52
- Figura 9 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores concentração de NaBH₄ e concentração de HCl.
55
- Figura 10 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores V.R e concentração de NaBH₄.
56
- Figura 11 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores V.R e concentração de HCl.
56

Figura 12 – Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido do planejamento Box-Behnken (R^2 0,9257).	58
Figura 13 – Gráfico de valores preditos vs resíduos obtido do planejamento Box-Behnken.	59
Figura 14 – Estudo univariado da V.R (amostra/ NaBH_4) para a geração de vapor de Se (IV). Condições: Se (IV) $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, HCl $1,8 \text{ mol L}^{-1}$, NaBH_4 0,7% (m/v) e determinação por HG-MIP OES.	60
Figura 15 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Dohelert referente a otimização das variáveis tempo de pré-redução e temperatura de pré-redução de Se sob aquecimento.	62
Figura 16 - Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido do planejamento Dohelert (R^2 0,9349).	63
Figura 17 - Gráfico de valores preditos vs resíduos obtido do planejamento Dohelert.	63
Figura 18 – Curva de resposta obtida para a determinação de Se em amostras de moluscos bivalves por HG-MIP OES utilizando as condições experimentais estabelecidas.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos sistemas de geração de hidretos.	22
Tabela 2 – Condições experimentais empregados na geração de vapor de selênio, e outros elementos, o preparo de amostra e técnica analítica de detecção.	35
Tabela 3 – Matriz codificada para um planejamento fatorial completo 2^3	39
Tabela 4 – Matriz de Doehlert para duas variáveis (A e B) com um ponto central. ...	42
Tabela 5 – Condições operacionais do MIP OES para a determinação de selênio. .	43
Tabela 6 – Fatores independentes e níveis no planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de geração de vapor químico de Se (IV) por HG-MIP OES.	46
Tabela 7 – Fatores e níveis estudados no planejamento Box-Behenken para otimização das condições de geração de vapor químico de Se (IV) por HG-MIP OES.	46
Tabela 8 – Fatores e níveis estudados no planejamento Dohelert para otimização das condições de pré-redução de Se sob aquecimento.	48
Tabela 9 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial completo 2^3 utilizada para a avaliação preliminar dos parâmetros experimentais de geração de vapor químico de Se (IV).	51
Tabela 10 – Análise da variância referente ao modelo linear.	54
Tabela 11 – Matriz de experimentos do planejamento Box-Behnken utilizada para estabelecer as melhores condições de geração de vapor de Se (IV) por	

HG-MIP OES.	55
Tabela 12 – Valores críticos obtidos para as variáveis HCl, NaBH ₄	57
Tabela 13 – Análise da variância do modelo quadrático.	58
Tabela 14 – Planejamento Dohelert referente ao estudo da temperatura e tempo de pré-redução de Se em banho-maria.	61
Tabela 15 – Valores críticos obtidos para as variáveis tempo de pré-redução e temperatura de pré-produção de Se em banho-maria.	62
Tabela 16 – Análise de variância do modelo quadrático obtido.	62
Tabela 17 – Parâmetros relativos à curva de resposta.	65
Tabela 18– Parâmetros de confiabilidade analítica relativos à determinação de Se em amostras de moluscos bivalves por HG-MIP OES.	66
Tabela 19– Métodos analíticos para a determinação de selênio em amostras ambientais.	66
Tabela 20– Resultado da análise do material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) empregando o método desenvolvido para a determinação de selênio (n= 3) por HG MIP OES.	67
Tabela 21 – Resultados (média ± intervalo de confiança e desvio padrão relativo; n=3) da determinação da concentração de Se total nas amostras de moluscos bivalves coletados em “coroa do meio” por HG MIP OES.	68
Tabela 22 – Concentrações de selênio total em moluscos bivalves coletados em diferentes locais do Brasil.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRM	Material de Referência Certificado. Do inglês: <i>Certified Reference Material</i>
-----	--

HG-MIP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Micro-ondas com Geração de Hidretos. Do inglês: <i>Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry Hydride Generation</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado. Do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado. Do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção. Do inglês: <i>Limit of detection</i>
LQ	Limite de Quantificação. Do inglês: <i>Limit of quantification</i>
MIP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Micro-ondas. Do inglês: <i>Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo. Do inglês: <i>Relative Standard Deviation</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
(SeMet)	Selenometionina

SUMÁRIO 1 INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2 OBJETIVOS	12
2.1 GERAL	12
2.2 ESPECÍFICOS.....	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1 SELÊNIO	13
3.2 PROCESSOS DE DISPONIBILIZAÇÃO DE SELÊNIO PARA OS ORGANISMOS AQUÁTICOS	14
3.3 ESPÉCIES DE MOLUSCOS BIVALVES ESTUARINOS, ILHÉUS, BAHIA, BRASIL	15
3.4 GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO.....	17
3.5 PROCESSO DE GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO	20
3.5.1 Mecanismo de formação dos hidretos	20

3.5.2 Diferentes sistemas de geração de hidretos.....	21
3.5.3 Transporte dos hidretos.....	22
3.5.4 Atomização e mecanismo de atomização dos hidretos.....	23
3.6 INTERFERÊNCIAS.....	23
3.6.1 Interferências na etapa de formação dos hidretos voláteis.....	24
3.6.2 Interferências na fase de vapor.....	24
3.6.3 Interferências espectrais.....	25
3.7 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS COM GERAÇÃO DE HIDRETO (HG-MIP OES).....	25
3.8 ESTUDO DOS FATORES EXPERIMENTAIS PARA A GERAÇÃO DE HIDRETOS.....	30
3.8.1 Agente redutor.....	31
3.8.2 Concentração do redutor e concentração do ácido.....	32
3.8.3 Agente pré-redutor.....	33
3.9 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	40
3.9.1 Planejamento fatorial completo.....	40
3.9.2 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	41
3.9.3 Matriz de Doehlert.....	42
3.9.4 Planejamento Box Behenken.....	44
4 EXPERIMENTAL.....	45
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	45
4.2 MATERIAL E REAGENTES.....	45
4.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA A DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR HG-MIP OES.....	46
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A GERAÇÃO DE VAPOR DE SELÊNIO (IV).....	47
4.5 AMOSTRAGEM.....	48
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	48
4.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-REDUÇÃO DE SE (VI) A SE (IV) SOB AQUECIMENTO.....	49
4.8 PROCEDIMENTO GERAL PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	50
4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	50
4.9.1 Linearidade.....	50
4.9.2 Limite de detecção e quantificação.....	51
4.9.3 Precisão.....	51

4.9.4 Acurácia do método analítico.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS E QUÍMICA PARA	52
GERAÇÃO DE VAPOR	52
5.1.1 Planejamento fatorial	52
5.1.2 Planejamento Box-Behnken	56
5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-REDUÇÃO DE SE (VI) A SE (IV) SOB AQUECIMENTO	62
5.2.1 Planejamento Dohelert	62
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	66
5.3.1 Linearidade.....	66
5.3.2 Limite de detecção e quantificação.....	67
5.3.3 Precisão.....	67
5.3.4 Acurácia do método analítico.....	68
5.3.5 Aplicação do método analítico desenvolvido	69
5.3.5.1 Determinação de Se em moluscos bivalves por HG-MIP OES	69
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A presença de espécies químicas elementares no ecossistema aquático desperta especial interesse, já que não são biodegradáveis e podem ser acumulados pelos organismos marinhos, e subconsequentemente transferidos para o homem via cadeia alimentar. Embora alguns elementos químicos sejam necessários para o desenvolvimento do metabolismo dos seres vivos (por exemplo, manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn) e selênio (Se)), se os níveis no organismo excederem os níveis essenciais podem se tornar tóxicos. Alguns outros elementos não têm função biológica conhecida e são tóxicos (cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg), por exemplo) (TEMPLETON et al., 2000).

O Selênio é considerado um micronutriente que desempenha importante papel na desintoxicação e mecanismo antioxidante de defesa do organismo humano. Porém, pode ser extremamente tóxico se quantidade excessiva for ingerida de forma contínua. Sua toxicidade pode ser caracterizada pela perda de pelos, fragilidade das unhas e problemas gastrointestinais (ALLANDER, 1994; AMWEG, STUART, WESTON, 2003; AONO, NAKAGUCHI, HIRAKI, 1991).

A porção estuarina do Rio Cachoeira/Ilhéus-BA, situada no município de IlhéusBa, abriga importantes espécies de moluscos bivalves, dentre os quais estão o sururu (*Mytella guyanensis*), o moapem (*Tagelus plebeius*), e a lambreta (*Anodontites trapesialis*), estes organismos são importantes fontes de renda para as comunidades envolvidas com as atividades de pesca neste ambiente.

Os bivalves são animais filtradores bastante conhecidos pela capacidade de acumular espécies químicas elementares. Esta característica é considerada útil para a monitorização da poluição por metais e outras substâncias em ambientes aquáticos (RUITER, 1995; et al., BIGAS et al., 2006; GOKOGLU et al., 2008).

Os níveis de selênio encontrados em amostras de moluscos bivalves de ambientes tidos como não poluídos, encontram-se na faixa de $\mu\text{g g}^{-1}$. Desta forma, a determinação direta desse elemento utilizando técnicas analíticas que se baseiam na nebulização pneumática convencional pode ser inadequada, pois, em vista da baixa eficiência de transporte do aerossol útil, os limites de detecção e quantificação obtidos são relativamente elevados (MORA et al., 2003).

No entanto, a introdução do analito na forma de hidreto gasoso é uma alternativa que tem sido empregada para a determinação desse elemento químico,

dentre outros formadores de hidretos. O emprego desta estratégia, como um passo prévio à detecção, proporciona um aumento de sensibilidade, além de minimizar e/ou eliminar interferências espectrais e não espectrais (MACHADO, JACINTHO, GINÉ, 2000; SCHICKLINA, YANG, BROEKAERT, 1996; VIEIRA, 2007).

Por isso, a geração de hidretos tem sido empregada com bastante frequência associadas às técnicas espectroanalíticas de absorção atômica (AAS) e aos métodos analíticos (LIMA et al.,2018) de fluorescência atômica (AFS), emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP OES). Esta última, tem ganhado atenção nos últimos anos e seu acoplamento com a geração de hidretos proporciona um método analítico simples, de custo operacional relativamente baixo e sensibilidade adequada para a determinação de baixas concentrações de selênio.

Ademais, para a eficiência e estabilidade da reação química de geração de hidretos alguns fatores (concentração do ácido, concentração do redutor, a taxa de fluxo dos reagentes, além de outros fatores) devem ser estabelecidos. A otimização de fatores associados a procedimentos analíticos com as ferramentas quimiométricas vêm sendo frequentemente empregada porque proporciona eficiência e redução do número de experimentos, o que resulta em menor consumo de reagentes e tempo de execução, além de permitir uma avaliação da interação entre os fatores envolvidos no sistema em estudo (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Além dos pontos abordados anteriormente, outra justificativa a ser considerada é que não consta na literatura trabalhos científicos com HG-MIP OES que utilizaram estas ferramentas na otimização de fatores experimentais envolvidos na geração de vapor químico de selênio, bem como às condições de pré-redução do mesmo seguido da determinação por HG-MIP OES.

Neste contexto, este trabalho científico aborda o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de selênio total em amostras de moluscos bivalves coletados no estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas com geração de hidretos (HGMIP OES).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer as melhores condições químicas e instrumentais para a geração de vapor químico de Se (IV) e condições de pré-redução de Se (VI) a Se (IV) sob aquecimento, através de técnicas de otimização multivariada para a determinação de selênio total em amostras de moluscos bivalves por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas com geração de hidretos (HG-MIP OES).

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as melhores condições instrumentais para a determinação de selênio por HG-MIP OES;
- Empregar o planejamento fatorial completo 2^3 para avaliar a significância estatística dos fatores: concentração de ácido clorídrico, concentração de borohidreto de sódio e fluxo dos reagentes, envolvidos na geração de vapor químico de selênio (IV);
- Empregar o planejamento Box Bhenken para otimizar os fatores concentração de ácido clorídrico, concentração de borohidreto de sódio e fluxo dos reagentes;
- Empregar o planejamento Dohelert para otimizar o tempo e a temperatura de pré-redução de selênio sob aquecimento;
- Validar o método analítico;
- Aplicar método desenvolvido para a determinação de Se total em amostras de moluscos bivalves coletados no estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus-Ba, com preparo de amostra já estabelecido.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 SELÊNIO

O termo “metais-traço” tem sido utilizado para designar espécies químicas elementares que em baixas concentrações no ambiente podem vir a constituir uma fonte potencial para a poluição ambiental. Muitos metais são essenciais para o desenvolvimento do metabolismo dos seres vivos, tais como: manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se), mas podem se tornar extremamente tóxicos se a concentração for superior aos níveis de tolerância do organismo (MARTINS et al., 2011, TEMPLETON et al., 2000). Enquanto alguns outros não têm função biológica conhecida e são tóxicos (cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg), por exemplo) (TEMPLETON et al., 2000).

O selênio é um metalóide que foi isolado e identificado por volta de 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Na natureza, este elemento químico pode ser encontrado no ar, na água e no solo nas formas inorgânicas, seleneto (Se^{-2}), selênio elementar (Se^0), selenito (SeO_3^{2-}) e selenato (SeO_4^{2-}). E na forma orgânica pode existir como ácidos selenoamino (selenocisteína (SeCys)) ou selenometionina (SeMet) pela substituição do enxofre em aminoácidos e compostos metilados de selênio como dimetilselenito (DMSe) e dimetildiselenito (DMDSel) (SEIXAS, 2007).

Este metalóide é considerado um micronutriente necessário a muitos processos metabólicos, principalmente quando se encontra associado a proteínas denominadas de selenoproteínas, (HOLBEN; SMITH, 1999). A ingestão equilibrada deste micronutriente pode atribuir benefícios ao organismo humano, sendo considerado um elemento protetor no caso de doenças como aterosclerose, câncer, artrite, cirrose e enfisema (MARTINS et al, 2017; RAYMAN, 2000; SCHRAUZER, SACHER, 1994). Por outro lado, quando em excesso no organismo pode se tornar extremamente tóxico. A sua toxicidade pode ser caracterizada pela perda de pelos e fragilidade das unhas, problemas gastrointestinais, erupção cutânea e anormalidades no sistema nervoso (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000; JACQUES, 2001, JUNIOR, 2008; MARTINS et al, 2017; MEUILLET et al., 2003, RIBEIRO et al., 2005).

Porém, a toxicidade dos compostos de selênio está relacionada principalmente à sua forma química. Sendo as formas inorgânicas consideradas mais tóxicas que as formas orgânicas, já que são mais solúveis em água e, portanto, mais

facilmente absorvidas pelo organismo. A toxicidade dos compostos de Se (IV) é cerca de 10 vezes maior que os compostos de Se (VI) para os sistemas biológicos (MARTINS et al, 2017). A forma elementar é uma espécie insolúvel em água e não é considerada tóxica; já os selenetos são espécies tóxicas e reativas que são rapidamente reduzidas a Se (0), mas quando na forma orgânica tornam-se as espécies mais biodisponíveis para os organismos vivos (ALLANDER, 1994; AMWEG, STUART, WESTON, 2003; AONO, NAKAGUCHI, HIRAKI, 1991; OMS, 1987; SEIXAS, 2007; WACHOWICZ, 2001).

Em virtude das propriedades nutricionais, funções metabólicas, dosagens essenciais e tóxicas, algumas organizações governamentais estabelecem limites máximos para as concentrações de selênio em diversos tipos de amostras (MARTINS et al, 2017). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por exemplo, prevê limites para selênio $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ em alimentos líquidos; $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$ em alimentos sólidos e, uma ingestão diária de $34 \mu\text{g}$ para adultos, $17 \mu\text{g}$ para uma faixa etária de 1 a 3 anos de idade e $21 \mu\text{g}$ para uma faixa etária de 4 a 10 anos de idade. Com base no que foi exposto, estudos são fomentados para o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de selênio quando presente na amostra em níveis traço ou ultratraços. Nesta faixa de concentração, este elemento químico não pode ser quantificado usando os métodos analíticos que se baseiam na nebulização pneumática convencional devido a baixa sensibilidade.

3.2 PROCESSOS DE DISPONIBILIZAÇÃO DE SELÊNIO PARA OS ORGANISMOS AQUÁTICOS

O selênio encontrado no ambiente aquático é oriundo tanto de fontes naturais quanto ações antrópicas. As primeiras são decorrentes de processos geofísicos e biológicos, sendo responsáveis pela presença deste elemento químico no ambiente. As ações antrópicas, são decorrentes de descargas de efluentes domésticos, industriais e/ou agrícola, são responsáveis pela redistribuição de selênio no ambiente, ou seja, pela liberação das fontes geológicas e pela disponibilização para os organismos vivos que compõem este ecossistema (SEIXAS; KEHRIG, 2007).

Naturalmente, este elemento químico se torna disponível para os organismos aquáticos por meio de quatro processos, de oxidação e metilação, representados na

Figura 1. O primeiro processo está relacionado a oxidação e metilação do selênio inorgânico, ou seja, as raízes das plantas aquáticas e os microorganismos bentônicos, via oxidação, convertem as formas imobilizadas nas formas solúveis (Se (IV) e Se (VI)), e por meio do processo de metilação convertem o selênio inorgânico em formas orgânicas, com um ou mais grupamento metil que, normalmente, resultam numa forma volátil. Já, o segundo processo, denominado de bioturbação, está relacionado a oxidação do sedimento pelos seres invertebrados bentônicos. Contudo, o terceiro processo, decorre da perturbação física e oxidação química associada à circulação da água. E o quarto, e último processo, ocorre pelo fato de os sedimentos poderem ser oxidados pelas plantas fotossintéticas (LEMLY, 1999).

Uma vez mobilizado do sedimento, o selênio entra na cadeia alimentar dos sistemas biológicos por meio da comunidade planctônica (primeiros níveis tróficos), e então é distribuído e acumulado através dos níveis tróficos subseqüentes, podendo então, sofrer os processos de bioconcentração e bioacumulação (SEIXAS; KEHRIG, 2007).

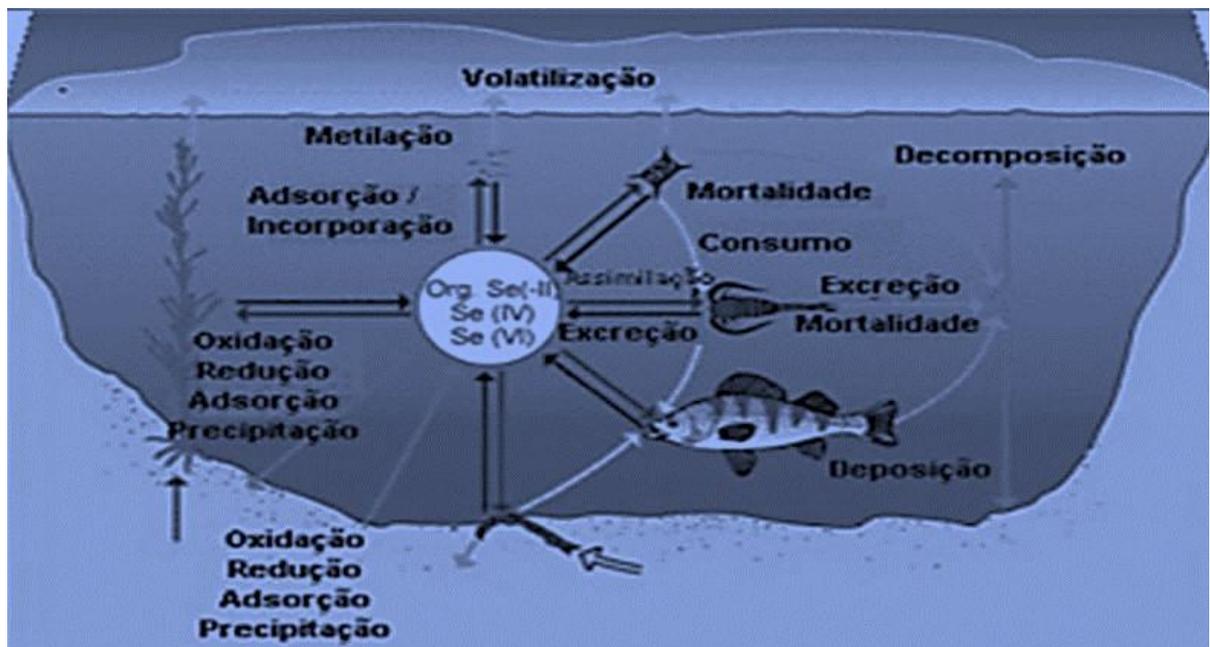


Figura 1- Ciclo biológico do selênio no ambiente aquático. Fonte: (SEIXAS; KEHRING, 2007).

3.3 ESPÉCIES DE MOLUSCOS BIVALVES ESTUARINOS, ILHÉUS, BAHIA, BRASIL

O município de Ilhéus fica situado na região sudeste da Bahia e abrange área correspondente a 1712 km². Possui um vasto litoral, com aproximadamente 80 km de extensão, sendo limitado ao norte pelo rio Sargi e ao sul pelo rio Acuípe. Neste

município, as áreas de manguezal de maior relevância centralizam-se na zona urbana, ao longo das margens da porção estuarina dos rios Cachoeira, Santana, Fundão e Almada (ALMEIDA et al, 2006).

O Rio Cachoeira desemboca em meio à área urbana deste município, banhando o centro da cidade e o bairro Pontal. Neste estuário, alguns dos principais tensores ambientais estão relacionados a descargas de efluentes domésticos, resíduos sólidos, industriais e, além disso, extensas áreas de manguezais têm passado por problemas de soterramentos ao longo da BR-415 (ALMEIDA et al, 2006).

Neste ambiente estuarino encontra-se uma área sedimentar denominada de “Coroa do Meio”, localizada no bairro Teotônio Vilela, onde há uma ocorrência significativa de algumas espécies de moluscos bivalves, dentre os quais estão: o sururu (*Mytella guyanensis*), representado na Figura 2A, o moapem (*Tagelus plebeius*), representado na Figura 2B, e a lambreta (*Anodontites trapesialis*) representada na Figura 2C. Estas três espécies são importantes fontes de renda para as comunidades envolvidas com as atividades de coleta de produtos de pesca na região (CEUTA; BOEHS, 2012).

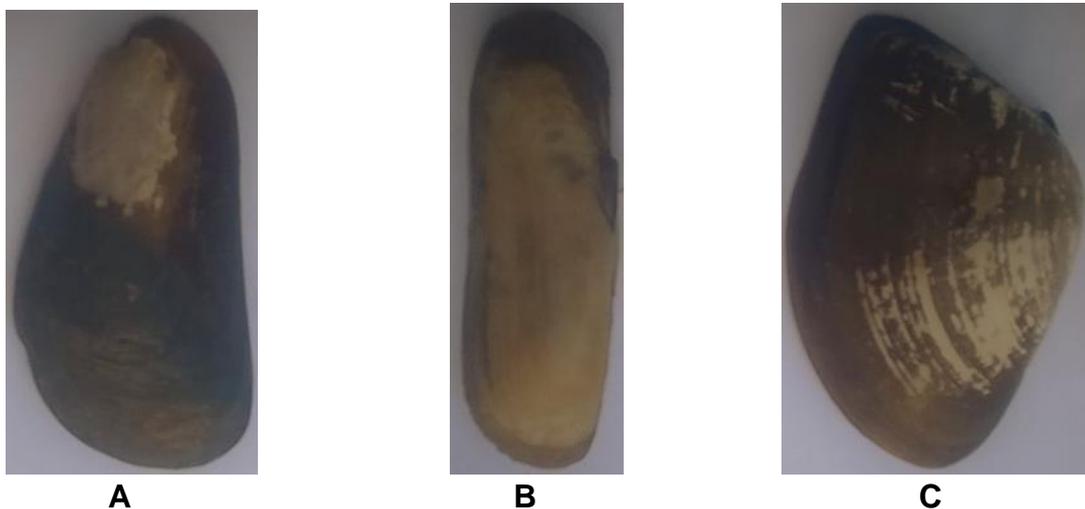


Figura 2 – Sururu (*Mytella guyanensis*) (A), Moapem (*Tagelus plebeius*). (B), Lambreta (*Anodontites trapesialis*) (C).

Os bivalves são animais filtradores que têm capacidade para acumular metais tóxicos em seus tecidos, bem como outras substâncias, que subsequentemente podem ser transferidos ao homem via cadeia alimentar, por isso, são utilizados como bioindicadores para a monitorização da poluição por metais, e outras substâncias, em ambientes costeiros (FERREIRA et al. 2012).

Ademais, a coleta de moluscos bivalves em “Coroa do Meio” ocorre de forma extrativista, durante todo ano. Porém, não há regulamentação legal nem instruções normativas por parte dos órgãos ambientais estaduais e municipais para a captura das espécies. Há, somente, resoluções e portarias que regulamentam e estabelecem padrões de qualidade que são essenciais para que tanto a água como os organismos aquáticos possam ser usados com segurança pelo homem, sem causar malefícios à saúde (CEUTA; BOEHS, 2012, SANDE et al, 2010).

Neste contexto, a legislação brasileira sugere limite para selênio de 0,30 mg kg⁻¹ em alimentos sólidos e a resolução CONAMA recomenda valor de 0,01 mg L⁻¹ de Se para água de estuário. Contudo, não consta na literatura científica dados a respeito da concentração de selênio tanto no ambiente quanto nos organismos do ecossistema estuarino do Rio Cachoeira. Mas, encontra-se alguns trabalhos reportando sobre as concentrações de selênio encontrados em espécies de moluscos bivalves em outros países e regiões do Brasil.

Seixas et al. (2007) encontraram uma média de 0,71 µg g⁻¹, em peso seco, de selênio em mexilhão coletada na Baía de Guanabara/RJ. Os autores constataram que a concentração foi similar às concentrações encontradas por Baldwin e Maher (1997), 0,7-1,8 µg g⁻¹ em peso seco, e inferior às concentrações encontradas em moluscos bivalves de ambientes não impactados da Austrália, que variavam de 1,3 a 11 µg g⁻¹ em peso seco, e em ambientes da costa indiana, 3,94 µg g⁻¹ em peso seco.

Barbosa (2013) encontrou faixas de concentrações de selênio de 2,04 - 9,02; 8,81 - 2,53 e 5,56 -14,2 µg g⁻¹ em peso seco nas espécies de moluscos bivalves *Iphigenia brasiliiana*, *Lucina pectinata* e *Trachycardium muricatum*, respectivamente, coletados ao longo da Baía de Todos Santos, Bahia, Brasil.

3.4 GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO

A maioria das técnicas espectroanalíticas normalmente empregam dispositivos denominados de nebulizadores pneumáticos para a formação do aerossol líquido. Apesar destes dispositivos serem de fácil operação, apresentam eficiência bastante limitada quando diz respeito à porcentagem de amostra que é capaz de ser convertida em aerossol útil (menos de 5%), ou seja, aquele que chega no sistema de atomização/emissão (TAKASE et al., 2002).

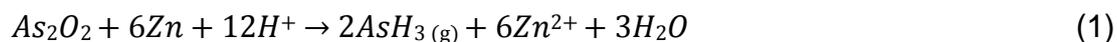
Sendo assim, a determinação direta de alguns elementos encontrados em baixas concentrações em amostras ambientais e biológicas como o selênio, por exemplo, utilizando métodos analíticos que se baseiam na nebulização pneumática convencional, normalmente, é inadequada devido a baixa sensibilidade destes sistemas de introdução de amostra, os quais também podem ser inviáveis para soluções de amostra muito viscosas, com alto teor salino e quando se dispõe de volumes de amostra na ordem de microlitros (TAKASE et al., 2002).

Neste contexto, surge o modo de introdução do analito em fase gasosa como uma alternativa promissora para suprir algumas limitações existentes no sistema de introdução da amostra por nebulização pneumática como a baixa eficiência do transporte do aerossol líquido (TAKASE et al., 2002).

A geração de vapor químico, ou mais especificamente, a geração de hidretos, tem sido empregada nas determinações de As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te como um passo prévio à detecção. Neste processo ocorre a separação do analito da matriz, a melhora da sensibilidade e do limite de detecção (SCHICKLINA, YANG, BROEKAERT, 1996; VIEIRA, 2007).

Trata-se de um procedimento no qual um determinado analito, que forma vapor químico, contido em uma amostra líquida é misturado com reagentes que o converte em uma espécie química gasosa. Em geração de hidretos, a formação desta espécie se dá pela reação entre uma amostra acidificada e um agente redutor, que pode ser um metal ou um reagente específico, sendo mais comum o tetrahidroborato de sódio (NaBH_4) (DEDINA; TSALEV, 1995; WELZ; SPERLING, 1999).

“Segundo a literatura, a geração de hidretos existe a mais de 100 anos e teve como ponto de partida o clássico teste de Marsh. Esse teste consistia num sistema de redução metal/ácido para produzir hidrogênio para posterior redução do analito ao respectivo hidreto, sendo utilizado para detectar pequenas quantidades de arsênio”. A Equação 1 mostra a reação de formação do hidreto de arsênio por meio dessa reação química (SLACHCINSKI, 2014).



Um dos trabalhos que impulsionou a geração de vapor foi o trabalho de Holak, realizado por volta de 1970. Neste trabalho, Holak utilizou a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) e conseguiu reduzir arsênio

(As) a arsina (AsH_3), mediante a reação de zinco (Zn) metálico com a solução da amostra acidificada com ácido clorídrico (HCl). Depois de formada, arsina era então transportada por um fluxo de nitrogênio (N_2) para o interior da chama composta de ar/acetileno no AAS. Com essa estratégia, foi observado um ganho significativo de sensibilidade, que foi associada a maior eficiência de transporte do analito quando na forma de hidreto gasoso se comparado ao convencional sistema de nebulização pneumática, uma vez que a maior parte da arsina formada chegava ao atomizador do espectrômetro de absorção atômica (HOLAK, 1969).

No entanto, devido a algumas desvantagens apresentadas como valores de branco analítico relativamente altos, baixa repetitividade das análises, as quais foram associadas principalmente ao uso de metais de baixa pureza, e pelo fato de o sistema de redução metal/ácido comumente utilizado ser restrito à formação de um limitado número de hidretos esse método não teve muito sucesso (TAKASE, 2002).

Com a introdução do tetraidroborato de sódio como agente redutor (NaBH_4), a reação química de geração de hidretos voláteis tornou-se mais eficiente, favorecendo melhor repetibilidade durante as medidas e a determinação de um maior número de elementos químicos (As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te) (BRAMAN; JUSTEN; FOREBACK, 1972; TAKASE, 2002; ZHANG; FANG; FENG, 2011).

Nesses últimos anos, tem sido comum o emprego da geração de hidretos associada às técnicas espectroanalíticas de absorção atômica (AAS), e aos métodos de fluorescência atômica (AFS), emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP OES), emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (LIMA et al., 2018), para a determinação de baixas concentrações de selênio, além de outros elementos que podem ser quantitativamente convertidos em seus respectivos hidretos voláteis, em diferentes tipos de matrizes.

Zappellini (2014) utilizou um método de geração de hidreto com o ICP OES para determinação multielementar de arsênio (As) e selênio (Se) em amostras de efluentes da Empresa Carbonífera Metropolitana. As condições ótimas para as variáveis envolvidas no processo foram: NaBH_4 4,5%, KI de 5,0%, HCl 4 mol L^{-1} , potência do plasma de 0,8 KW, vazão do gás 18,0 L min^{-1} . A exatidão do método foi confirmada por meio da análise de padrões certificados (NIST) e amostras de referência com a adição e recuperação de padrão. O método proposto apresentou

vantagens em relação ao desempenho tradicional do ICP OES, ou seja, com o modo de introdução direta.

Morais et al. (1995) utilizou a espectrometria de absorção atômica com o método de geração de hidretos (HG-FAAS) para determinar baixos níveis de selênio em amostras de fígado bovino. A exatidão do método foi confirmada por meio da análise do material de referência certificado NIST 1577a. O método proposto permitiu a determinação de Se em fígado bovino em concentrações acima de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$.

Wang e Zhang (2011) determinaram simultaneamente arsênio, bismuto, telúrio e selênio em amostras de solo utilizando um espectrômetro de fluorescência atômica multicanal com geração de hidretos, HG MC AFS. Os limites de detecção do método para arsênio, bismuto, telúrio e selênio foram $0,19 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

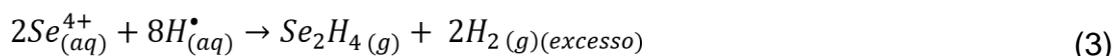
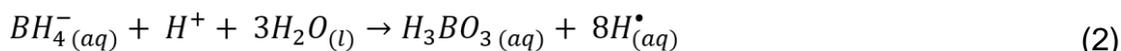
3.5 PROCESSO DE GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO

O processo de determinação do analito através da geração de vapor químico é dividido em três etapas principais: a geração do hidreto volátil, o transporte do hidreto volátil para o atomizador e a atomização (LAJUNEM, 1992; POLLOCK, 1972; VIEIRA; RIBEIRO; CURTIUS, 2004).

3.5.1 Mecanismo de formação dos hidretos

A literatura propõe duas hipóteses de mecanismo para a formação dos hidretos voláteis: o mecanismo do hidrogênio “nascente” e o mecanismo do hidrogênio “não nascente”.

O mecanismo do hidrogênio “nascente” é conhecido como a primeira hipótese que descreve a forma como os hidretos voláteis são formados. De acordo com este mecanismo, considerando o sistema de redução borohidreto de sódio/ácido, o íon BH_4^- reage com o íon H^+ formando ácido bórico e hidrogênio atômico. Em uma etapa posterior, o hidrogênio atômico reage com íon do analito formando o hidreto correspondente (D'ULIVO, 2010). As equações 2 e 3 representam as supostas reações que ocorrem na geração do hidreto de selênio.



A segunda proposta de mecanismo de formação dos hidretos, mecanismo do hidrogênio “não-nascente”, tem sido abordado por pesquisadores que discordam do fato de que o processo de redução de íons hidrônio a hidrogênio atômico, na presença de $NaBH_4$, seja termodinamicamente favorável. Segundo esses pesquisadores, a transferência gradual de átomos de hidrogênio do borano para o substrato analito, logo após a formação de complexos intermediários analito-borano, é mais provável de ocorrer (D’ULIVO, 2010; D’ULIVO et al., 2011) como representado nas equações 4 e 5, respectivamente.



Alguns estudos demonstraram experimentalmente, através do uso de reagentes deuterados, que a reação de arsênio (III) e arsênio (V) com o $NaBD_4$ (borohidreto de sódio deuterado) em HCl 3 mol L^{-1} e H_2O gerou como produto principal AsD_3 , e quando o $NaBH_4$ foi usado em ácido deuterado (DCI) e água deuterada (D_2O), obteve-se como principal produto a arsina (AsH_3). Diante disso, concluiu-se que a formação desta ocorreu mediante a transferência do hidrogênio que estava associado ao boro e não pelo envolvimento do hidrogênio atômico, pois, se este fosse realmente o responsável pela formação do hidreto, o produto principal obtido na reação química seria $AsH_nD_3^{-n}$ (BRANCH; HUTCHISON, 1985).

3.5.2 Diferentes sistemas de geração de hidretos

Existem basicamente dois tipos de sistemas de geração de hidretos: sistemas em batelada e sistemas em fluxo (fluxo contínuo e injeção em fluxo). Ressaltando que o formato destes sistemas influencia diretamente a formação e liberação das espécies voláteis (DEDINA; TSALEV, 1995; NAKAHARA, 1995; SLACHCINSKI, 2014). A Tabela 1 apresenta as características principais destes três sistemas.

Tabela 1 – Características dos sistemas de geração de hidretos.

Sistema em Batelada	Fluxo Contínuo (CF)	Injeção em fluxo (FI)
<ul style="list-style-type: none"> • A amostra é introduzida manualmente (1-50mL) □ • O agente redutor é adicionado através de bomba peristáltica ou injetado manualmente; □ • A espécie gasosa é transportada para sistema de atomização por um gás inerte; □ • O sinal é transiente e depende da cinética de liberação das espécies voláteis; □ • Pouca possibilidade de automação e frequência analítica relativamente baixa. □ 	<ul style="list-style-type: none"> Amostra e reagentes são transportados continuamente por bombas peristálticas a um ponto de mistura; □ Através de uma bobina de reação os reagentes são conduzidos a um separador gás-líquido; □ As espécies gasosas são transportadas para o atomizador por um gás inerte; □ O sinal é contínuo e proporcional à concentração do analito; □ □ De fácil automação, mas o equilíbrio do sinal é mais demorado; □ Maior frequência analítica em relação ao sistema em batelada 	<ul style="list-style-type: none"> A solução carreadora é bombeada continuamente e um volume de amostra é injetado no carreador (~100-1000 µL); □ Sinais transientes são gerados, cuja área integrada é proporcional à massa do analito; □ O perfil do sinal depende da dispersão da amostra no carreador; □ Sensibilidade semelhante ao sistema em batelada, De fácil automação □ Possui frequência analítica maior em relação os sistemas em batelada e fluxo contínuo, volume e consumo menor de reagentes.

Fonte: Vieira, 2007, adaptada.

3.5.3 Transporte dos hidretos

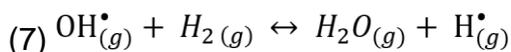
O transporte das espécies voláteis ao sistema de atomização pode se dá de forma direta, onde os hidretos são conduzidos ao atomizador por intermédio de um gás inerte, mais comumente o argônio (Ar). De outra forma, os hidretos formados são inicialmente são trapeados em armadilhas, que teoricamente ficam localizadas entre o frasco reacional e o atomizador, sendo em seguida transportado para o atomizador, tal processo é denominado de “coleta” (TAKASE et al., 2002; YAN; NI, 1994). Ressaltando, que este procedimento era bastante comum quando o sistema de redução metal/ácido era utilizado, já que a reação era relativamente lenta podendo decorrer minutos para ser concluída, daí a importância de pré-concentrar as espécies antes de transportá-las para o atomizador. Entretanto, em termos de frequência analítica, o transporte dos hidretos de forma direta tende a ser mais um processo mais vantajoso em relação ao modo de coleta (TAKASE et al., 2002).

3.5.4 Atomização e mecanismo de atomização dos hidretos

No processo de atomização ocorre a conversão do hidreto do analito a seu átomo livre. Há diversas possibilidades de atomizadores empregados para promover a atomização dos hidretos, visto a variedade de técnicas analíticas que podem ser empregadas em conjunto com geração de vapor (TAKASE et al., 2002). A absorção atômica, por exemplo, apresenta as seguintes possibilidades: o tubo de quartzo aquecido externamente, a chama e o forno de grafite (CHU; BARRO; BAUMGARNER, 1972; TAKASE et al., 2002; THOMPSON; THOMENRSON, 1974).

Na espectrometria de emissão óptica, os hidretos do analito são introduzidos diretamente no plasma. Segundo a literatura, a atomização ocorre via interação dos hidretos com radicais hidrogênio ($H\bullet$), e que, apesar de o mecanismo de formação de radicais $H\bullet$ ainda não ser muito bem compreendido, supõe-se que traços de oxigênio podem ser responsáveis pela formação dos mesmos (BAX; VAN ELTEREN, 1986; TAKASE et al., 2002).

As Equações 6, 7 e 8 mostram as reações de geração dos radicais hidrogênio, e as equações 8 e 9 exemplificam o mecanismo de atomização do hidreto de Se (JIN; YIXIANG DUAN; OLIVARES, 1997).



(8)



3.6 INTERFERÊNCIAS

A geração de vapor tende a ser um método de introdução de amostra que minimiza interferências já que há uma separação do analito e da matriz. Mas, elas

podem ser encontradas na etapa de formação e liberação dos hidretos da solução, no transporte dos mesmos ao sistema de atomização. Durante a atomização pode também haver interferências espectrais (DEDINA, TSALEV, 1995; TAKASE et al., 2002; VIEIRA; RIBEIRO; CURTIUS, 2004).

3.6.1 Interferências na etapa de formação dos hidretos voláteis

As Interferências na fase líquida podem ser causadas pelo efeito da matriz ou pela presença de elementos que apresentam diferentes estados de oxidação. As interferências devido aos componentes da matriz tendem a ocorrer quando estes interferem na liberação do hidreto. Alguns metais de transição como Co, Cu e Ni, por exemplo, podem ser reduzidos com NaBH_4 e formar precipitado dificultando o processo de expansão gás gerado e, conseqüentemente, redução do sinal do analito (DEDINA, TSALEV, 1995; TAKASE et al., 2002).

Os ácidos inorgânicos oxidantes tais como HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4 , comumente empregados em processos de decomposição oxidativa de amostras, também podem interferir na geração do hidreto de interesse já que conduz a oxidação do elemento a seu estado de oxidação mais elevado (As(III)/As(V), Sb(III)/Sb(V), Se(IV)/Se(VI) e Te(IV)/Te(VI), por exemplo), que apresenta velocidade de redução mais lenta ou não é derivatizado. Além do mais, durante a etapa de geração do hidreto, espécies NO_x voláteis oriundas do HNO_3 podem interferir no processo de atomização dos hidretos (KUMAR; RIYAZUDDIN, 2010; YAN; NI, 1994).

Algumas alternativas têm sido empregadas com o objetivo de eliminar ou minimizar interferências que ocorrem na fase líquida, como, por exemplo, o aumento da acidez da solução e/ou do controle da concentração do reagente redutor; a adição de agentes mascarantes (sulfanilamida, ácido sulfâmico, ácido amidossulfúrico e tioureia); e métodos de separação de interferentes (precipitação, troca iônica, coprecipitação) (TAKASE et al., 2002).

3.6.2 Interferências na fase de vapor

As interferências na fase de vapor estão propensas a ocorrer no volume morto da célula de reação, na linha de transporte do hidreto do analito ou no atomizador. Estas se manifestam imediatamente, uma vez observadas simultaneamente com a

geração do interferente, ou pelo chamado efeito de memória, caso persista após cessar a geração do interferente. As "interferências de transporte" ocorrem ao longo da linha de transporte, causando atraso, interferência na cinética de transporte e/ou perdas do analito (DEDINA; TSALEV, 1995; TAKASE et al., 2002).

As interferências que ocorrem no processo de atomização podem ocorrer quando o excesso de um outro elemento também formador de hidreto venha a causar redução do sinal analítico seja por da redução da concentração dos radicais hidrogênio no interior do sistema de atomização ou por acelerar o decaimento dos átomos livres do analito no atomizador via reação analito-interferente que pode resultar na formação de moléculas diatômicas (DEDINA; TSALEV, 1995; TAKASE et al., 2002; WANG; ZHANG, 2011).

3.6.3 Interferências espectrais

A interferência espectral ocorre quando o detector interpreta o sinal da espécie interferente como se fosse do analito, podendo ser ocasionada pela presença de espécies atômicas que absorvam ou emitam radiação no mesmo comprimento de onda que o analito. Este tipo interferência é bastante minimizado em geração química de vapor já que o analito é separado da matriz (DEDINA; TSALEV, 1995; TAKASE et al, 2002).

3.7 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS COM GERAÇÃO DE HIDRETO (HG-MIP OES)

A espectrometria de emissão óptica consiste em converter os elementos contidos em uma determinada amostra em átomos ou íons livres e, em seguida, excitar seus elétrons para maiores níveis de energia. Quando os elétrons retornam ao estado menos energético (estado fundamental), essas transições eletrônicas liberam energia na forma de radiação produzindo linhas espectrais nas regiões do ultravioleta e visível que são essenciais na análise elementar qualitativa e quantitativa (KRUG et al., 2001).

Desde a sua descrição como fonte de excitação para a espectrometria atômica em 1964, por Green e colaboradores, e em 1965, por Wendt e Fassel, o plasma indutivamente acoplado (ICP) tornou-se uma fonte de

atomização/excitação/ionização popular e apropriada para a análise elementar (GONCALVES; MCSWEENEYB;

DONATI, 2016). Por outro lado, o plasma induzido por micro-ondas (MIP's) evoluiu nas últimas duas décadas como fonte de excitação para espectrometria de emissão óptica e como fonte de ionização para técnicas de espectrometria de massa (JANKOWSKI; RESZKE, 2010; JIN, YIXIANG DUAN, OLIVARES 1997; LI et al., 2013; NIEDZIELSKI et al., 2015; ROSENKRANZ; BETTMER, 2000; WEI et al., 2013).

Um plasma induzido por micro-ondas de alta potência que poderia ser utilizado com micro-ondas de até 1,5 Kw e ser mantido com nitrogênio, ar e hélio à pressão atmosférica foi desenvolvido por Okamoto et al. (1990). Esta fonte produzia um plasma bem semelhante ao ICP, permitindo assim, a introdução da amostra na forma de aerossol no plasma com auxílio de um nebulizador pneumático convencional sem que houvesse a necessidade de dessolvatação. A partir desse advento, o uso de nitrogênio e ar comprimido como gás de plasma foi mais estudado em relação ao plasma de argônio e hélio (MAEDA; WAGATSUMA, 2004; ZHAG; WAGATSUMA, 2002).

No entanto, alguns inconvenientes como, por exemplo, baixa tolerância para a carga de água e o curto tempo de vida da tocha em decorrência da erosão provocada pelo plasma foram alguns dos obstáculos superados. Fatores como potências de MIP altas e baixas, posições da tocha radial e axial, diferentes tipos de nebulizadores, além de outros aspectos, foram também considerados com o objetivo principal de melhorar o desempenho do espectrômetro (JANKOWSKI et al., 1999; GONCALVES; MCSWEENEYB; DONATI, 2016).

Algumas das principais vantagens associadas ao MIP OES estão relacionadas à capacidade de detecção multielementar, sensibilidade relativamente alta, ampla gama de resposta linear e baixo nível de ruído, em relação a algumas outras técnicas, além de permitir a detecção de um grande número de elementos químicos, tais como: metais alcalinos, de transição, terras raras, e alguns não-metals (JANKOWSKI et al., 1999). Por outro lado, a utilização de nitrogênio como gás de plasma é uma importante conquista, pois favorece um custo de funcionamento significativamente reduzido em comparação às fontes tradicionais de ICP que utilizam plasmas de argônio (MACHADO, 2017). Em alguns estudos de comparação

entre o MIP OES e outras técnicas para análise elementar os resultados foram positivos.

Teodoro et al. (2013) determinaram Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em amostras de solo utilizando a espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas empregando extração com DTPA. Os limites de detecção obtidos foram comparáveis aos obtidos no ICP OES e melhores que os obtidos tipicamente no F AAS.

Estudos de comparação entre MIP OES e ICP-MS para a análise de oligoelementos de girassol foram realizados para Ca, K, Mg e Na, Al, Fe e Mn, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, V e Zn, após digestão por micro-ondas. Os limites de detecção foram na faixa baixa $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos os metais foram determinados com sucesso com o MIP OES e forneceram resultados quase idênticos com o ICP-MS (KARLSSON; SJOBERG; OGAR, 2015).

Li et al. (2013) determinaram Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de ração animal e fertilizante, digeridos por ácido nítrico e clorídrico, respectivamente, e constataram que o MP-AES e o ICP OES mostraram sensibilidade semelhante, sendo ambos superiores ao FAAS.

A Figura 3 mostra os principais componentes de um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-onda que utiliza plasma de nitrogênio (N_2) que pode ser obtido a partir de um compressor de ar conectado a um gerador N_2 . Trata-se do modelo MP AES 4200 da Agilent Technologies, a qual, possivelmente, é a única detentora dessa tecnologia na atualidade.



Figura 3 – Componentes de um espectrômetro com plasma de micro-ondas gerado por N_2 (MP-AES 4200, Agilent Technologies).

Fonte: (YOSHIDA, 2013), Adaptada.

Um sistema típico de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas consiste em três componentes principais: uma fonte de excitação acoplada a um sistema de introdução de amostras e um sistema de alimentação de gás de plasma; um sistema de detecção; um espectrômetro e um sistema eletrônico para processamento de sinal aquisição de dados e controle do instrumento (JANKOWSKI; RESZKE, 2010).

O sistema de introdução de amostra é composto por uma bomba peristáltica (0 - 80 rpm); um nebulizador OneNeb e uma câmara de nebulização ciclônica (GONÇALVES, 2016).

O conjunto de excitação micro-ondas dispõe de uma fonte de alimentação de estado sólido e um magnetron resfriado a ar que opera a 2450 MHz. A potência do plasma é fixa (1kW). O plasma atua com configuração axial para melhor sensibilidade das medições e melhores limites de detecção (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014).

A configuração óptica é formada por um sistema de rápida varredura óptica de alta resolução para medições rápidas usando um designer compacto. Monocromador Czerny-Turner com 600 milímetros de comprimento. A rede de difração holográfica contém 2400 linhas/mm. Faixa de comprimento de onda de 178 - 780 nanômetros. Um dispositivo de carga acoplada - CCD (charge-coupled device) sensível a UV (532 x 128 pixels) (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014).

Alternativamente, ao MIP OES pode ser acoplado um Sistema de Introdução de Amostra Multimodal (MSIS), como mostrado na Figura 4, que consiste em uma câmara de nebulização ciclônica equipada com tubos verticalmente opostos no centro. O acessório MSIS fornece meios convenientes para determinação de elementos por nebulização convencional ou por geração de vapor químico, ou simultaneamente no mesmo dispositivo (BRINDLE, 2007; LOPES et al., 2009; MECLAUGHLIN; BRINDLE, 2005; POHL; JAMROZ, 2011; SLACHCINSKI, 2014).

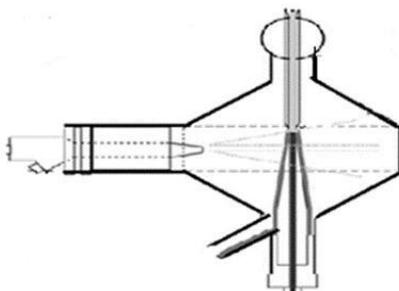


Figura 4 – Sistema de introdução de amostra multimodal (MSIS) Fonte: Agilent Technologies, 2014.

No modo geração de vapor, o MSIS exibe um desempenho significativamente melhor para a determinação de Selênio, além de outros elementos formadores de hidretos, em comparação ao respectivo desempenho oferecido pela nebulização convencional (BRINDLE, 2007; LOPES et al., 2009; MECLAUGHLIN; BRINDLE, 2005; POHL; JAMROZ, 2011; SLACHCINSKI, 2014).

Como já mencionado, a introdução do analito na forma de vapor elimina e/ou minimiza possíveis efeitos causados pelos concomitantes no processo de nebulização, implicando numa atomização e excitação mais eficiente, podendo, ainda, reduzir e/ou eliminar possíveis interferências espectrais e não espectrais (AFONSO; BAYTAK; ARSLAN, 2010; MECLAUGHLIN; BRINDLE, 2005; TYBURSKA et al., 2010). Uma vez que os estágios de dessolvatação e evaporação do solvente se tornam desnecessários, a energia consumida nesta fase fica disponível para as fases de atomização e excitação, desta forma, há um aumento do sinal de emissão e, portanto, melhor limite de detecção (OZAKI, 1990). Alguns trabalhos empregaram o acessório MISIS para a geração de hidretos de selênio, além de outros elementos, e os resultados foram promissores.

Barrientos et al. (2016) fizeram a determinação de selenometionina (SeMet) e Se (IV) em leveduras biofortificadas por HPLC-HG-MIP-OES. Os limites de quantificação na coluna avaliados foram 59 ng mL^{-1} para Se (IV) e $0,52 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para SeMet. O procedimento foi capaz de detectar diferenças na concentração de selênio entre culturas e os resultados foram consistentes com os obtidos ao acoplar a separação por HPLC diretamente à detecção por ICP-MS.

Matusiewwicz e Slachciński (2010) usaram um método de amostragem de suspensão para a determinação simultânea de As, Sb, Se, Sn e Hg em materiais de referência biológicos e ambientais (LUTS-1, DOLT-2 e PACS-1). Para isso,

utilizaram o sistema comercial de introdução de amostras multimodal (MSIS) acoplado ao MIP

OES. Concentração de suspensão até 3,6% m/v (partículas <100 µm) preparada em 10% HCL contendo 100 µL de decanol, por aplicação de agitação ultra-sônica. Limites de detecção de 0,06, 0,08, 0,15, 0,12 e 0,10 µg⁻¹ foram obtidos para As, Sb, Se, Sn e Hg, respectivamente. A validação do método foi confirmada por meio da análise dos três materiais de referência certificados. Estes mesmos autores utilizaram o método de amostragem de suspensão para a determinação simultânea de elementos formadores de hidretos (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn e Hg) e não formadores (Ca, Fe, Mg, Mn, Zn) em materiais de referência biológicos e ambientais e amostras reais. Para este procedimento, foi utilizado o MSIS acoplado ao MIP OES. Concentração de suspensão até 4% m/v (partículas <100 µm) preparada em 10% de HNO₃ contendo 100 µL de decanol, por aplicação de agitação ultra-sônica. Foram obtidos limites de detecção de 0,07, 0,29, 0,25, 0,10, 0,12, 0,14, 0,11, 0,28, 0,42, 0,02, 0,21 e 0,34 µg g⁻¹ para As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn, Hg, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn, respectivamente. A exatidão do método foi confirmada por meio da análise dos materiais de referência LUTS-1, DOLT-2, PACS-1, GWB 07302, NIST 2710) (MATUSIEWWICZ; SLACHCIŃKI, 2007).

3.8 ESTUDO DOS FATORES EXPERIMENTAIS PARA A GERAÇÃO DE HIDRETOS

A eficiência da geração de hidretos voláteis na fase líquida é determinada pelos seguintes fatores (SLACHCINSKI, 2014):

- Estado de oxidação do elemento na solução;
- Concentração e tipo de ácido;
- Concentração e tipo de agente redutor;
- pH da solução;
- Tipo de material e design da célula de reação;
- Presença e concentração de elementos interferentes;
- Natureza e reatividade dos elementos formadores de hidreto;
- Influência da matriz;
- Fluxo do gás de purga;
- A solução alcalina para estabilização do borohidreto de sódio.

3.8.1 Agente redutor

Os agentes redutores são classificados como redutores metálicos em meio ácido, tais como Zn/HCl, SnCl₂/HCl-KI e MgHCl/TiCl₃, e tetraidroborato de sódio, (NaBH₄). Este último tem sido o mais empregado em geração de hidretos visto ao excelente desempenho para converter um número relativamente grande de analitos (Se, As, Sn, Sb, Te, Bi, além de outros) às suas formas voláteis correspondentes (DEDINA; TSALEV, 1995; SLACHCINSKI, 2014; TAKASE et al., 2002), quando comparado aos redutores metálicos. Além disso, torna a reação mais rápida, eficiente, o meio reacional mais homogêneo e confere valores de branco analítico menores (BARRA et al., 2000; BRAMAN, JUSTEN, FORBRACK, 1972; DEDINA; TSALEV, 1995; MOLLO, FERREIRA, MOISÉS, 2013; NAKAHARA, 1995; POHL; JAMROZ, 2011; SLACHCINSKI, 2014; TAKASE et al., 2002).

No entanto, quando este reagente é preparado em meio aquoso é muito instável, por isso é recomendado que o seu preparo seja em meio hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH), que podem introduzir contaminantes no meio e até causar supressão do sinal analítico, se usados com displicência (MENEGARIO, GINÉ, 2000; STURGEON; MESTE, 2002).

Greco (2016) observou que as absorvâncias de Se reduziu quando a solução de 1,0% (m/v) NaBH₄ preparada no dia anterior era usada. Concluiu que a degradação desta solução estava associada ao aumento da evolução do hidrogênio proveniente da hidrólise do íon BH₄⁻ e, por isso, as soluções NaBH₄ em meio NaOH 0,5% (m/v) foram preparadas diariamente e minutos antes das análises.

Menegário e Giné (2000) observaram que os sinais de As e Se reduziram respectivamente 5,0 e 3,5% após três horas. Concluíram que este decréscimo ocorreu em decorrência da degradação da solução de NaBH₄ a qual foi preparada em meio não alcalino.

Lee e Choi (1996) verificaram a influência da concentração do HCl na geração dos hidretos de As, Bi, Ge, Sb e Sn em um sistema de fluxo contínuo com um ICP OES. Observaram que a faixa de 0,3 a 0,4 mol L⁻¹ de HCl em NaOH 0,1% proporcionou melhor resposta para todos os hidretos em questão. E quando se usava NaOH 2,5%, a faixa aumentava de 0,6 a 0,8 mol L⁻¹. Logo, chegaram as seguintes conclusões: a quantidade de hidróxido de sódio na solução redutora é importante e que a neutralização da mesma pelo ácido é a reação preferencial para

a geração dos hidretos; e que melhor eficiência na formação dos hidretos é alcançada após a quantidade de milimols de HCl exceder a soma dos milimols do NaBH_4 mais o NaOH.

3.8.2 Concentração do redutor e concentração do ácido

A concentração dos reagentes é um fator de extrema relevância em geração de hidretos, uma vez que influencia diretamente a eficiência e a estabilidade da reação química. A presença de íons H^+ no meio reacional é necessário para a formação da espécie volátil e neutralização dos íons hidróxidos (OH^-). Sendo que as concentrações podem variar conforme o tipo de analito ou grupo de analitos e do tipo de sistema empregado (CADORE; BACCAN, 1997; CASTILHO, 2016; DEDINA; TSALEV, 1995; SHALTOUT et al., 2011).

Concentrações relativamente altas de ácido clorídrico podem ser vantajosas uma vez que podem reduzir significativamente algumas interferências causadas pela fase líquida (DEDINA; TSALEV, 1995), por metais de transição (SCHRAMEL, 1991) e, além disso, pode auxiliar na redução de Se (VI) a Se (IV), espécie que tem maior afinidade para gerar hidreto (DEDINA E TSALEV, 1995).

Tal e Sturgeon (1999) estudaram os efeitos de interferências de metais de transição sobre a resposta analítica de selênio por ICP OES variando a concentração de NaBH_4 . Concluíram que 0,5% de NaBH_4 e HCl $4,8 \text{ mol L}^{-1}$ reduziam estas interferências.

Apesar de o ácido clorídrico ser mais frequentemente utilizado em geração de hidretos, há relatos na literatura de que outros ácidos também foram empregados como meio reacional para este propósito (MATUSIEWICZ; SLACHCINSKI, 2007; MATUSIEWICZ; SLACHCINSKI, 2010).

Thompson et al. (1978) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de HCl, H_2SO_4 , HClO_4 , HBr e HNO_3 na formação dos hidretos dos analitos As, Sb, Bi, Se e Te. Concluíram que o HCl 5 mol L^{-1} foi o que apresentou melhores condições para desenvolver a reação química de geração dos hidretos voláteis, e que o sinal analítico obtido com o uso do H_2SO_4 e do H_3PO_4 foi bem menor quando comparado ao obtido com o HCl.

Concentrações relativamente altas de NaBH_4 melhoram significativamente o sinal analítico da espécie envolvida, por outro lado, podem gerar uma quantidade

excessiva de hidrogênio que pode comprometer o desempenho de alguns sistemas de detecção como do ICP OES, por exemplo, que conseqüentemente pode tornar as medidas pouco reprodutivas, devido à alta evolução de hidrogênio na célula de reação (THOMPSON et al.,1974).

Thompson et al. (1974) determinando As, Sb, Se, Bi e Te simultaneamente por ICP OES, observaram que, quando a concentração de NaBH_4 estava próximo de 1%, a resposta para estes analitos era maior, mas acima deste valor o sinal reduzia significativamente, provavelmente, devido a diluição do analito ou mudanças nas condições do plasma causadas pela introdução de grande quantidade de subprodutos gerados na reação química. Em concentrações maiores que 1,5% o plasma se tornava altamente instável e se extinguia com muita facilidade.

Greco (2016) observou que quando a concentração do NaBH_4 era superior a 1,0% (m/v), o sinal analítico do Se aumentou, porém houve uma falta de repetitividade entre as medidas, que, provavelmente, foi conseqüência da reação para a geração do hidreto ter sido turbulenta em decorrência do excesso de H_2 gerado no meio reacional.

Coelho e Baccan (2004) determinaram selênio em urina e observaram que o sinal analítico aumentava gradativamente até 0,5% (m/v) de NaBH_4 na concentração de HCl $1,00 \text{ mol L}^{-1}$. Porém, aumentando a concentração de HCl para valores de $2,00 \text{ mol L}^{-1}$ o sinal analítico permaneceu quase constante. E aumentando a concentração de NaBH_4 , observaram que além da geração do hidreto de selênio, ocorria a formação excessiva de hidrogênio, que, provavelmente, provocava uma menor repetitividade dos sinais do analito.

Por tais motivos, principalmente, a concentração de NaBH_4 deve ser otimizada conforme o elemento ou grupos de elementos que formam hidretos, o tipo de amostra, o tipo de separador gás-líquido e o equipamento de medição (MATUSIEWICZ; SLACHCIŃSK, 2014).

3.8.3 Agente pré-redutor

A geração de vapor químico, na maioria das vezes, é substancialmente mais bem conduzida quando os elementos estão presentes em seus menores estados de oxidação. Pode-se inferir que, na prática, o estado de oxidação do analito é influenciado principalmente pelo tipo de preparo de amostra empregado. Em preparo

de amostras envolvendo decomposição oxidativa com o uso de ácidos inorgânicos concentrados, o elemento formador de hidreto tende a ser oxidado ao respectivo estado de oxidação mais elevado que, como já mencionado, apresenta velocidade de redução mais lenta, sendo necessário proceder uma redução prévia ao estado de oxidação mais baixo com o auxílio de um agente pré-redutor antes da reação química de geração de vapor (OLIVEIRA, MALAREN, BERMAN, 1982). No processo de geração do hidreto de selênio utilizando borohidreto de sódio, por exemplo, o Se (IV) tem maior afinidade para formar hidreto (H_2Se), mas caso o Se (VI) for reduzido a Se (IV) é possível determinar a concentração de Se total na amostra, isso pode ser conseguido mediante uma etapa de pré-redução de Se (VI) para Se (IV) (BYE, 1989), o que convencionalmente pode ser feito com auxílio de algum agente pre-redutor como tiourea, L-cisteína, ácido clorídrico (HCl), ácido bromídrico (HBr), a mistura de HCl com HBr e mistura de HCl com brometo de potássio (KBr) (GALLIGNANI, 2000).

Também é muito comum o emprego de HCl, em concentrações relativamente elevadas associado à temperatura para converter selênio hexavalente em selênio tetravalente. Este procedimento é vantajoso pelo fato do HCl já ser utilizado na reação de geração de hidretos e não há a necessidade de reagentes adicionais que pode causar algum tipo de interferência. Ademais, cuidados são necessários quanto ao controle da temperatura empregada, independentemente do tipo de aquecimento, já que pode haver perdas de analito na forma de cloreto. Concentração relativamente elevada deste reagente também pode influenciar o processo de re-oxidação de Se (IV) a Se (VI), uma vez que pode ocorrer formação excessiva de Cl_2 em decorrência da reação química entre HCl e o H_2O_2 presentes no meio (DEDINA e TSALEV, 1995).

Portanto, devido aos diferentes sistemas de geração hidretos, e pela dificuldade em se obter uma descrição precisa de como os fatores experimentais envolvidos no processo de geração de vapor podem influenciar na sensibilidade das medições, é imperativo promover um procedimento de otimização de tais fatores em cada sistema particular, desta forma, melhores resultados podem ser alcançados.

A Tabela 2 apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura. Ela apresenta as condições experimentais utilizadas para a geração de vapor químico de selênio, assim como outros elementos, o tipo de preparo de amostra empregado e a técnica analítica de detecção.

Tabela 2 – Condições experimentais empregados na geração de vapor de selênio, e outros elementos, o preparo de amostra e técnica analítica de detecção.

Analito/matriz	Concentração de de determinação	Pré-redutor	Tipo de preparo de amostra:	Referência ácido/concentração do redutor	método
Se/sedimentos, partículas em suspensão, tecido biológico	HCl: 50% (v/v) NaBH ₄ : 0,6% (m / v) em L ⁻¹	HCl a 6 mol L ⁻¹ e NaOH 0,45 mol L ⁻¹	ID-HG-ICP-MS: aquecimento em banho-maria a 90°C/30min	digestão/autoclave	Kleckner; Kakouros; Stewart, 2017
Se/Telúrio em pó de alta pureza	HCl: 5% (v/v) KBH ₄ : 1% (m/v) em NaOH 0,5% (m/v)		HCl a 6 mol L ⁻¹ e aquecimento em chapa a 100°C/10 min	HG-AFS: dissolução/chapa de aquecimento	Tong; Ying; Jinyong, 2016
Se/NRCC DOLT-2 e NIST 2710	HCl: 1,0 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 2.0% (m/v) em m/v		Tiourea a 1,0 mol L ⁻¹	μ-USN/QCS-HG-MIP OES digestão/micro-ondas	Matusiewicz; Ślachciński, 2017
Se/vinho, cerveja, fermento e alho/Se	HCl: 12,0% (v/v) NaOH (m/v)	NaBH ₄ : 1,5% m/v em 0,05%	KI a 0,5% em NaOH a 0,2%	RP-HPLC-HG-AFS: digestão	Castro; Fiorentini; Wuilloud, 2017
As, Bi, Sb, Se, Sn e Te/Ligas de chumbo	HCl: 6,0 mol L ⁻¹ (As, Bi, Se e Te) e 0,1 mol L ⁻¹ (Sb e Sn) NaBH ₄ : 0,60% (m/v) em (m/v)		n	FI-HG-ICP-MS: solubilização/ chapa de aquecimento	Nunes; Flores; Paniz, 2016
As, Sb e Se/suco de cenoura	HCl: 3,0 mol L ⁻¹ (As, Sb) e 6,0 mol L ⁻¹ (Se) NaBH ₄ : 1% em NaOH 0,1 mol L ⁻¹		As e Sb (ácido ascórbico 0,5% (m/v) e KI 0,5% (m/v) em HCl 3 mol L ⁻¹ Se HCl 6 mol L ⁻¹	HG-ICP OES: digestão/chapa de aquecimento	Welna; SzymczychaMadeja; Pohl, 2014

n/As, Sb e Se	HCl: 3 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 0,75 % (m/v) em NaOH 0,5% (m/v)	KBr a 0,5% em HCl a 7,5 HG-MIP OES: mol L ⁻¹ digestão/reator aquecido
---------------	--	---

Bulska; Tschopel,
1993

Continuação Tabela 2 - Condições experimentais empregados na geração de vapor de selênio, e outros elementos, o preparo de amostra e técnica analítica de detecção.

Analito/matriz	Concentração de de determinação	Pré-redutor	Tipo de preparo de amostra:	Referência ácido/concentração do redutor	método
As, Bi, Ge, Sb, Se e Hg/PACS-1, CTA- OTL-1, SRM 1566, SRM SRM 2711	Se/Ovos (clara e gema) Se/solo HCl: 1 mol L ⁻¹		HNO ₃ : 1,5 mol L ⁻¹ NaBH ₄ :1,0% (m/v) em NaOH 0,1%(m/v)	Tioureia a 10% (m/v)	
As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn e Hg/DOLT-2, SRM 2710, CRM GBW 07302, SRM 1643e	NaBH ₄ : 1% em NaOH 0,1% (m/v)		HCl: 5,3 mol L ⁻¹ (3,0 a NaBH ₄ : 2,6 % (m/v) em NaOH .	Tioureia a 10% (m/v)	
As, Sb, Se, Sn e Hg/ LUTS1, DOLT-2 e PACS-1	HCl: 2,5 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 1,5% em NaOH 0,1% (m/v)		HCl: 3 mol L ⁻¹ / 1% NaBH ₄ : 1% (m/v) em NaOH 0,5% (m/v)	Tioureia a 1 mol L ⁻¹	
As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn e Hg /LUTS-1, PACS-1, DOLT-2, GBW 07302 SRM 1633b e SRM 2710	HCl:10% (v/v) NaBH ₄ :1,5% em NaOH 0,1%		n	KBr a 10 % (m/v) e HCl a 6 mol L ⁻¹ n	
As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn e Hg/ NRCC DOLT-2 CRM GBW 07302 SRM 2710 e SRM 1643e	HNO ₃ : 10%/ NaBH ₄ 1,5 em NaOH 0,1%		Tioureia a 1 mol L ⁻¹		

HG-ETV-MIP digestão/micro- Matusiewicz; Kopras, 2003	OES: ondas	
USN/MSIS-MIP de suspensão	OES: amostragem	Matusiewicz; Slachcinski, 2014
SS-HG-MIP amostragem de suspensão	OES:	Matusiewicz; Slachcinski, 2006
SS-MSIS-MIP de suspensão	OES: amostragem	Matusiewicz; Slachcinski, 2007
USN-HG-MIP ondas	OES: digestão/micro- ondas	Matusiewicz; Slachcinski, 2010
HG- AFS: digestão/ digestor	bloco	Cavalcante, 2014
HG-GF ultrassônico	AAS: extração/banho	Schneider et al.,2016

Continuação Tabela 2 - Condições experimentais empregados na geração de vapor de selênio, e outros elementos, o preparo de amostra e técnica analítica de detecção.

Analito/matriz	Concentração de ácido/concentração do redutor	Pré-redutor	Tipo de preparo de amostra: método de determinação	Referência
Se Sb e Se/água, alimentos e suco de polpas de frutas	HCl: 6 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 0,4%(m/v) em NaOH 0,05%(m/v)	L-cisteína + ácido tartárico aquecimento em ultrassônico a 80 °C/10 min	HG-AAS: digestão/banho ultrassônico banho	Altunay; Gürkan, 2016
Se/água residual	HCl: 3 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 3%(m/v) em NaOH 0,06 mol L ⁻¹	HCl a 6 mol L ⁻¹	HG-AFS digestão/chapa de aquecimento	Ezoe et al., 2016
As e Se /Sedimentos e lama industrial	HCl: 2,5 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 2,0% (m/v) em NaOH 0,5 (m/v)	n	HG-ICP OES: extração/micro-ondas	Lopes, 2006
Se/castanhas	HCl: 0,6 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 1,0% (m/v) em NaOH 0,5" (m/v)	KI a 10% e HCl a 6 mol L ⁻¹	HG-AAS digestão/bloco digestor e extração/ultrassom	Greco, 2016
Se/solo	HCl: 6 mol L ⁻¹ NaBH ₄ : 4 % (m/v) em NaOH 0,5% (m/v)	HCl a 6,0 mol L ⁻¹	HG-AAS: digestão/micro-ondas	Matos, 2017

n= não especificado.

3.9 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

A análise estatística univariada refere-se a métodos de estatística descritiva que permitem a análise de variáveis individualmente e, também, a métodos de estatística inferencial para determinada variável, podendo esta ser medida para uma ou mais amostras independentes (FERREIRA et al., 2007, TARLEY et al., 2009).

O processo de otimização univariado normalmente envolve um grande número de experimentos que pode fornecer condições que permitem um valor otimizado da resposta. Mas, por não levar em conta a interação entre os fatores envolvidos no sistema em estudo, o resultado obtido nem sempre é indício das condições que proporciona a condição ótima verdadeira. Isso acontece porque nos sistemas químicos, as variáveis tendem a interagir entre si via mecanismos que proporcionam efeitos sinérgicos e antagônicos. Uma vez ignorado este fato, pouco valor é atribuído a otimização (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Nos últimos anos, os sistemas multivariados de otimização têm ganhado bastante atenção, demonstrando utilidade para a otimização de parâmetros de grande relevância associados a métodos nos mais variados campos do conhecimento. Estes sistemas de otimização tendem a proporcionar eficiência, redução do número de experimentos, o que resulta em menor consumo de reagentes e menor tempo de execução, e, ainda, permite uma avaliação da interação entre os fatores envolvidos no sistema em estudo (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

3.9.1 Planejamento fatorial completo

Um planejamento fatorial completo é uma das ferramentas quimiométricas mais empregadas para otimização de experimentos, sendo utilizado, principalmente, em investigações preliminares, ou seja, quando se deseja saber se determinadas fatores tem ou não influência sobre a resposta do sistema experimental desenvolvido. Neste planejamento, é possível combinar todos os níveis dos fatores. No entanto, deve-se selecionar entre 2 e 4 fatores para serem testados em dois níveis, sendo o número de experimentos (N) calculado pela expressão $N=2^k$, onde k é o número de variáveis (FILHO, 2015). Nos planejamentos de dois níveis, um nível

superior é representado por um sinal positivo (+) e um nível inferior é representado por um sinal negativo (-).

Sendo que um ponto central (o) pode ser inserido com o valor médio dos níveis, e suas réplicas normalmente é utilizada para estimar o erro experimental (GALVÃO, 2011; LUNDSTEDT et al., 1998; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MASSART; DIJKAstra; KAUFMAN, 1978). A Tabela 3 mostra a matriz de um planejamento fatorial completo de dois níveis com o conjunto de combinações entre os fatores.

Tabela 3 – Matriz codificada para um planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: Galvão, 2011.

Os resultados obtidos do planejamento fatorial são, geralmente, explicitados através de gráfico de Pareto, que exhibe ou não a significância dos fatores envolvidos e suas interações no processo estudado, mediante a apresentação dos valores dos efeitos principais padronizados de todas as variáveis e suas possíveis interações.

Desta forma, o efeito dos fatores serão tanto maior quanto maior for número correspondente aos mesmos. Sendo que um efeito positivo é um indicativo de que a o sinal analítico deve aumentar conforme o aumento do fator do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), por outro lado, um efeito negativo sugere que a resposta deve aumentar à medida que o fator diminui do nível superior (+1) para o nível inferior (-1) (FERREIRA, 2015).

3.9.2 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A MSR é um conjunto de técnicas de otimização de experimentos que foi desenvolvida na década de 50 pelo inglês George Edward Pelham Box. Trata-se de um grupo de técnicas matemático-estatísticas utilizado para análise e modelagem de

problemas, onde uma determinada resposta é função de diversas variáveis com o intuito de otimizar esta resposta, principalmente. Dentre as metodologias de superfície de resposta mais comuns estão: o planejamento composto central, o planejamento Box Behnken e matriz de Doehlert (GALVÃO, 2011).

As metodologias de superfícies de respostas podem ser usadas de duas formas distintas: por modelagem e deslocamento. A primeira pode ser feita por ajuste de modelos simples, lineares ou quadráticos, às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. No entanto, o deslocamento segue o caminho da máxima inclinação de um determinado modelo, onde há indício de máxima resposta (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2004; GALVÃO, 2011; MONTGOMERY, 1996; PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

3.9.3 Matriz de Doehlert

O planejamento por matriz de Doehlert foi desenvolvido por David Doehlert em 1970. Trata-se de um sistema de otimização de experimentos de segunda ordem que apresenta seus pontos distribuídos de forma uniforme por toda região experimental. Para duas variáveis, por exemplo, o desenho Doehlert consiste de um ponto central e seis pontos formando um hexágono regular, como mostrado na Figura 5. No entanto, uma variável é variada em cinco níveis enquanto a outra em três níveis. Geralmente, a variável escolhida para variar em cinco níveis é aquela que exerce maior influência sobre o sistema estudado, desta forma maiores informações podem ser obtidas a respeito do mesmo. Sendo o número de experimentos (N) determinado pela equação $N = k^2 + k + C_0$, onde: k é o número de variáveis e C_0 é o número de pontos centrais (BEZERRA, 2003; BEZERRA, et al., 2008; BRERETON, 1996; DEMING; MORGAN, 1988; DOEHLERT, 1970; FERREIRA et al., 2004; GALVÃO, 2011; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

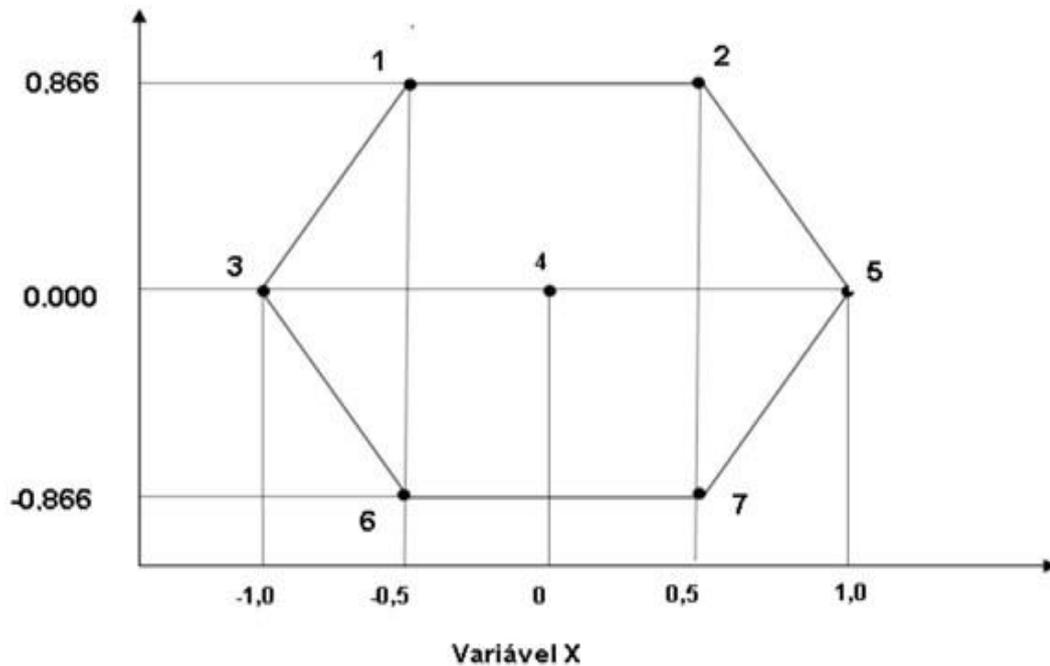


Figura 5 – Desenho de um planejamento Doehlert, representado por um hexágono regular com as coordenadas normalizadas, para duas variáveis. Fonte: Cavalcante, 2014.

O desenho é definido considerando-se o número de variáveis e os valores codificados (C_i) da matriz experimental. A relação entre o valor codificado e o valor real normalmente é dada pela equação 11:

$$C_i = \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \cdot K \quad (11)$$

Onde:

C_i – é o valor codificado para o fator i ;

X_i – é o valor real no experimento;

X_i^0 – é o valor real no ponto central no domínio experimental;

ΔX_i – é o passo de variação (valor central – valor mínimo);

K – é o limite do valor codificado para cada fator (1 e 0,866 para o primeiro e segundo fator, respectivamente).

A Tabela 4 apresenta uma matriz Doehlert para dois fatores (CAVALCANTE, 2014; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Tabela 4 – Matriz de Doehlert para duas variáveis (A e B) com um ponto central.

Experimentos	Fatores	
	A	B
1	0	0
2	1	0
3	0,5	0,866
4	-1	0
5	-0,5	-0,866
6	0,5	-0,866
7	-0,5	0,866

3.9.4 Planejamento Box Behnken

O desenho Box Behnken é uma ferramenta bastante eficiente para obtenção de modelos quadráticos. Dentre as suas principais características estão: aplicação para um número de fatores igual ou superior a três, os intervalos entre os níveis dos fatores estudados são uniformes e todos os fatores são estudados a três níveis (-1, 0, +1). O número de experimentos (N) necessários à aplicação do planejamento é dado por $N = 2k^{(k-1)} + C$ (k é o número de variáveis e C é o número de replicatas do ponto central). O desenho Box Behnken para três fatores pode ser visto de duas formas diferentes: como um cubo, com as coordenadas da matriz sendo estabelecidas pelos pontos médios dos três eixos e o ponto central, a outra forma envolve a interligação de três planejamentos fatoriais completos de dois níveis, sendo um em cada eixo cartesiano, e o ponto central, totalizando os 13 experimentos, como mostrado na Figura 6 (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA, 2015; MASSART, 1997; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

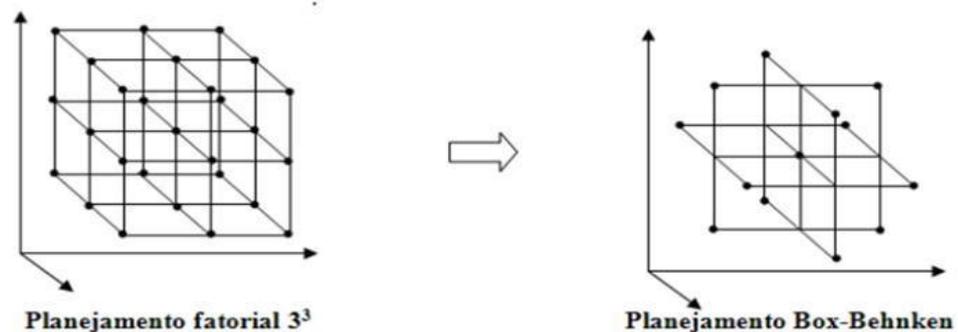


Figura 6 – Obtenção dos pontos experimentais para a matriz Box-Behnken a partir de um planejamento fatorial de três níveis para três fatores. Fonte: Galvão, 2011.

4 EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de selênio foi realizada usando um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MP-AES 4200, *Agilent Technologies*) equipado com um sistema de introdução de amostra multimodal (MSIS), configurado para geração de hidretos. A otimização das condições de operação do equipamento foi realizada com padrão de Se a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. O software MP Expert realiza a otimização da pressão de nebulização e a altura de visualização do plasma automaticamente para o analito. As condições selecionadas para condução dos experimentos foram as que apresentaram maior sinal analítico (intensidade) para selênio, e são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições operacionais do MIP OES para a determinação de selênio.

Parâmetros instrumentais	Condições de operação
Comprimento de onda (nm)	196,026
Velocidade de bomba peristáltica (rpm)	15
Tempo de leitura (seg)	3
Número de replicatas	3
Tempo de estabilização (s)	5
uptake (s)	0
Fluxo de nebulização (L/min)	0,45
Posição de visualização do plasma	-10

4.2 MATERIAL E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

- Borohidreto de sódio (NaBH_4), 65% (Merck, Alemanha)
- Ácido clorídrico concentrado (HCl) 37% (Merck, Alemanha)
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma-Aldrich);
- Água deionizada com resistividade 18Ω foi utilizada no preparo de todas as soluções. Todos os materiais utilizados nos experimentos foram

previamente lavados e descontaminados com HNO_3 (10% v/v) durante 24 horas e, então, enxaguados com água deionizada;

- Uma solução padrão de 1000 mg L^{-1} de Se (IV) foi preparada por dissolução de quantidade adequada do óxido de selênio (IV) (99,9%) em água deionizada;
- Soluções de ácido clorídrico 1,2; 1,8, 2,5 mol L^{-1} foram preparadas a partir do ácido clorídrico concentrado;
- Soluções aquosas de tetraidroborato foram preparadas diariamente por dissolução de quantidade adequada de NaBH_4 em 0,5% (m/v) NaOH;
- Material certificado *Oyster Tissue* (NIST 1566b, Instituto Nacional de Tecnologia e Tecnologia, EUA);
- Balança analítica (SHIMADZU) modelo AY 220; □ Banho-maria (ACB LABOR).

4.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA A DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR HG-MIP OES

No sistema de introdução de amostra multimodal, o nebulizador foi mantido na posição horizontal, enquanto a tubulação para o fluxo de amostra para o nebulizador foi temporariamente bloqueada. Então, as soluções de borohidreto de sódio e da amostra acidificada foram transportadas continuamente, em linhas opostas, com o auxílio da bomba peristáltica, e então misturados em uma fina película formada na convergência dos fluxos no interior da câmara de nebulização ciclônica. Os produtos gasosos formados, (hidretos, hidrogênio e etc.), foram retirados da mistura e levadas ao plasma através do fluxo de gás de nebulização (nitrogênio), enquanto o líquido residual que saía pelo tubo de vidro era continuamente bombeado para o descarte. Os sinais analíticos foram as intensidades. A Figura 7 ilustra o procedimento desenvolvido.

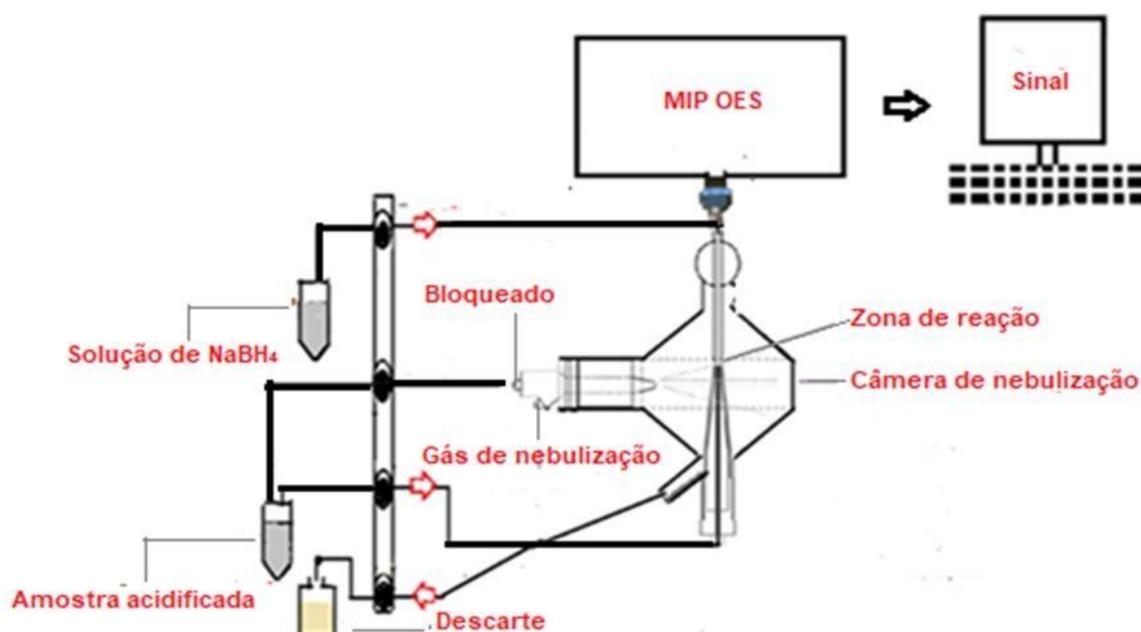


Figura 7 – Esquema geral do procedimento utilizado para a determinação de selênio por HG-MIP OES. Fonte: próprio autor.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A GERAÇÃO DE VAPOR DE SELÊNIO (IV)

Para a otimização das condições de geração de vapor de Se (IV) usando a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas com geração de hidretos (HG-MIP OES) foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 e um planejamento *Box Behnken*. O planejamento fatorial foi aplicado para avaliar os efeitos de três fatores: concentração de ácido clorídrico ([HCl]), concentração de borohidreto de sódio ([NaBH₄]) e a vazão dos reagentes amostra/NaBH₄. (V.R). As variáveis experimentais e os seus respectivos níveis estudados no planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 6. Sendo que os valores foram escolhidos com base em dados fornecidos pela literatura, e os ensaios foram conduzidos utilizando-se 10,0 mL de uma solução 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se (IV).

Tabela 6 – Fatores independentes e níveis no planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de geração de vapor químico de Se (IV) por HG-MIP OES.

Fatores	Níveis estudados		
	(-1)	(0)	(+)
Concentração de HCl (mol L^{-1})	1,2	2,4	3,6

Concentração de NaBH ₄ (%)	0,3	0,6	0,9
Vazão dos reagentes amostra/NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	1,5	2,0	2,5

Os resultados obtidos através do planejamento fatorial foram avaliados, e as variáveis estatisticamente significativas foram determinadas e otimizadas pela metodologia de superfície de resposta aplicando o planejamento Box-Behnken. As variáveis experimentais e os seus respectivos níveis estudados no planejamento Box-Behnken estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Fatores e níveis estudados no planejamento Box-Behnken para otimização das condições de geração de vapor químico de Se (IV) por HG-MIP OES.

Fatores	Níveis estudados		
	(-1)	(0)	(+)
Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	1,2	1,8	2,4
Concentração de NaBH ₄ (%)	0,3	0,6	0,9
Vazão dos reagentes amostra/NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	1,5	2,0	2,5

4.5 AMOSTRAGEM

Cerca de 20 unidades de moapem (*Tagelus plebeius*) e lambreta (*Anodontites trapesialis*) foram coletados na margem esquerda de Coroa do Meio, durante a baixamar, quando a faixa do mesolitoral, onde a população ocorre fica descoberta pela maré. Já os sururus (*Mytella guyanensis*) foram encontrados soterrados na lama do manguezal entre as raízes da vegetação próxima à margem direita. Os organismos foram transferidos para sacos plásticos limpos e conduzidos ao laboratório, onde foram removidos das conchas com uma pinça, lavados com água deionizada e, então, congelados. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas, moídas em moinho de bolas e armazenadas em dessecador à temperatura ambiente.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo de das amostras foi realizada em bloco digestor com “dedo frio”. Para a digestão das amostras dos moluscos e do material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b), aproximadamente 0,1000 g de cada amostra, em triplicata, foi pesada diretamente no tubo de digestão, em seguida, foi adicionado 2

mL de ácido nítrico a 14 mol L^{-1} e mantidas em *over night* por 12 horas. Então, 1 mL de peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) foi adicionado. A cada tubo de digestão foi acoplado um condensador, denominado “dedo-frio”, na parte superior. A digestão foi realizada em aproximadamente 4 horas, numa faixa de temperatura compreendida entre $120\text{-}140^\circ\text{C}$, aumentada de forma gradual. Após a etapa de digestão, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aferidos com água deionizada e acondicionados em geladeira até o momento das análises. Esta metodologia de preparo de amostra foi adaptada de Santos et al., 2014.

4.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-REDUÇÃO DE SE (VI) A SE (IV) SOB AQUECIMENTO

Antes de dar início as análises das amostras previamente preparadas, estas foram submetidas a uma etapa de pré-redução, tendo em vista que após o processo de digestão, normalmente, toda a espécie de Se contida na amostra é oxidada a Se^{6+} , espécie esta que não tende a gerar hidreto, havendo a necessidade, portanto, da redução do Se (VI) a Se (IV) antes da reação química de geração de vapor.

Para o processo de pré-redução de selênio foi utilizado ácido clorídrico a $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ e aquecimento em banho-maria. Uma vez que a temperatura e o tempo de aquecimento influenciam a eficiência deste processo, independentemente do tipo de aquecimento, estes dois fatores foram otimizados por meio de uma matriz Dohelert. Sendo o tempo de pré-redução variado em três níveis e a temperatura em cinco níveis. As variáveis experimentais e os respectivos níveis estudados no planejamento estão apresentados na Tabela 8. Sendo que os valores foram escolhidos com base em dados fornecidos pela literatura. As condições para a geração do hidreto de selênio foram as estabelecidas na etapa de otimização das condições experimentais do item 4.4

Tabela 8 – Fatores e níveis estudados no planejamento Dohelert para otimização das condições de pré-redução de Se sob aquecimento.

Fatores	Níveis estudados
Tempo de pré-redução (min)	10** (-0,866)*; 30 (0) e 50 (+0,866)
Temperatura de pré-redução ($^\circ\text{C}$)	25** (-1)*; 30 (-0,5); 60 (0); 90 (0) e 120 (1)

*valor codificado, **valor real

Para a otimização das condições de pré-redução de Se foi adicionado $20,0 \mu\text{L}$ da amostra do CRM em $2,0 \text{ mL}$ de HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ em tubos de ensaio de vidro. Após a adição dos reagentes, os tubos foram tampados e alocados em um banho-

maria. Após o tempo de pré-redução, na temperatura estabelecida, os tubos foram retirados e mantidos em repouso por 2 minutos, adicionando, em seguida, um volume de água deionizada para concentração final de HCl $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ e posterior análise por HG-MIP OES.

4.8 PROCEDIMENTO GERAL PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Após estabelecidas as condições geração de vapor e pré-redução de selênio, procedeu-se com a análise das amostras e do material de referência certificado da seguinte forma: para cada análise (em triplica), 1mL da amostra foi adicionada em um tubo de ensaio, então, foi adicionado ácido clorídrico concentrado, vagarosamente, para uma concentração final de HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, o tubo foi tampado e aquecido ($70^{\circ}\text{C}/30\text{min}$) para a pré-redução do selênio, e, após a etapa de repouso, 2 min, foi adicionado um volume água deionizada para uma concentração final de HCl $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ e posterior análise da amostra por HG-MIP OES.

4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A pós a obtenção das condições ótimas para a geração de vapor e pré-redução de selênio, procedeu-se com a validação do método analítico através dos seguintes parâmetros de confiabilidade analítica: Linearidade, limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e acurácia.

4.9.1 Linearidade

A linearidade consiste na capacidade de um determinado método analítico produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003).

A linearidade da curva analítica pode ser calculada a partir da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Através do valor do coeficiente de correlação (R) obtido é possível fazer uma estimativa da qualidade da curva. Sendo que um valor maior que 0,90 é requerido, pois menor é a dispersão do

conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza do coeficiente de regressão estimado (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003). Logo, para verificar a linearidade do método analítico foram preparados padrões de selênio em uma faixa de concentração de 070 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.9.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção pode ser obtido através da Equação 12 (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003).

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{\text{Br}}}{b} \quad (12)$$

Onde S_{Br} é o desvio padrão da resposta analítica correspondente ao branco e b é o coeficiente angular da curva analítica correspondente ao analito.

Para a determinação do limite de detecção do método analítico foi realizada 10 medidas da solução do branco correspondente a amostra.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, conforme as condições experimentais adotadas. Matematicamente é expresso como dez vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003), como mostra a Equação 13.

$$\text{LOD} = \frac{10 \times S_{\text{Br}}}{b} \quad (13)$$

4.9.3 Precisão

A precisão de um método analítico avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Matematicamente, a precisão pode ser expressa pelo desvio padrão relativo, RSD%, sendo o mesmo calculado pela razão entre o desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S) e a

média dessas medidas (\bar{x}), geralmente em porcentagem (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003), como mostra a Equação 14.

$$\text{RSD}\% = \frac{S}{\bar{x}_c} \times 100 \quad (14)$$

Para verificar a precisão do método analítico realizou-se 9 medidas da solução da amostra preparadas nas mesmas condições, no mesmo dia.

4.9.4 Acurácia do método analítico

A acurácia, definida como a concordância entre o valor mais provável do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico desenvolvido, constitui a chave para o propósito da validação. Um dos métodos principais para o estudo da acurácia é baseado no uso de material de referência certificado (MRC). Neste método, réplicas do CRM é analisada e os resultados obtidos são comparados com o valor certificado. (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003).

Para avaliar a acurácia do método analítico, o material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) foi analisado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS E QUÍMICA PARA

GERAÇÃO DE VAPOR

5.1.1 Planejamento fatorial

A otimização preliminar das condições experimentais envolvidas na geração de vapor de Se (IV) foi feita através do planejamento fatorial completo 2^3 . A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento (com a inclusão de seis pontos centrais para avaliar o erro experimental), com seus valores reais e codificados, e os sinais analítico (intensidades). O software Statística 7.0 foi utilizado para o tratamento dos dados.

Tabela 9 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial completo 2^3 utilizada para a avaliação preliminar dos parâmetros experimentais de geração de vapor químico de Se (IV).

Experimento	[HCL] (mol L ⁻¹)	[NaBH ₄] (%)	V.R (mL min ⁻¹)	Intensidade
-------------	------------------------------	--------------------------	-----------------------------	-------------

1	+ (3,6)*	+ (0,9)	+ (2,5)	12632,92
2	+ (3,6)	+ (0,9)	- (1,5)	14596,21
3	+ (3,6)	- (0,3)	+ (2,5)	16517,87
4	+ (3,6)	- (0,3)	- (1,5)	16871,10
5	- (1,2)	+ (0,9)	+ (2,5)	13282,57
6	- (1,2)	+ (0,9)	- (1,5)	15456,43
7	- (1,2)	- (0,3)	+ (2,5)	16997,65
8	- (1,2)	- (0,3)	- (1,5)	16650,09
9	0 (2,4)	0 (0,6)	0 (2,0)	16441,98
10	0 (2,4)	0 (0,6)	0 (2,0)	16776,21
11	0 (2,4)	0 (0,6)	0 (2,0)	16785,09
12	0 (2,4)	0 (0,6)	0 (2,0)	16769,65
13	0 (2,4)	0 (0,6)	0 (2,0)	16844,21
14	0 (2,4)	0 (0,6)	0 (2,0)	16851,32

*Valor real.

O gráfico de Pareto referente a otimização preliminar dos fatores envolvidas no processo de geração de vapor de selênio está representado na Figura 8. O teste t , para um nível de confiança de 95%, está representado por uma linha vertical neste gráfico, definindo assim quais as variáveis e suas combinações são significativas na determinação de selênio por HG-MIP OES.

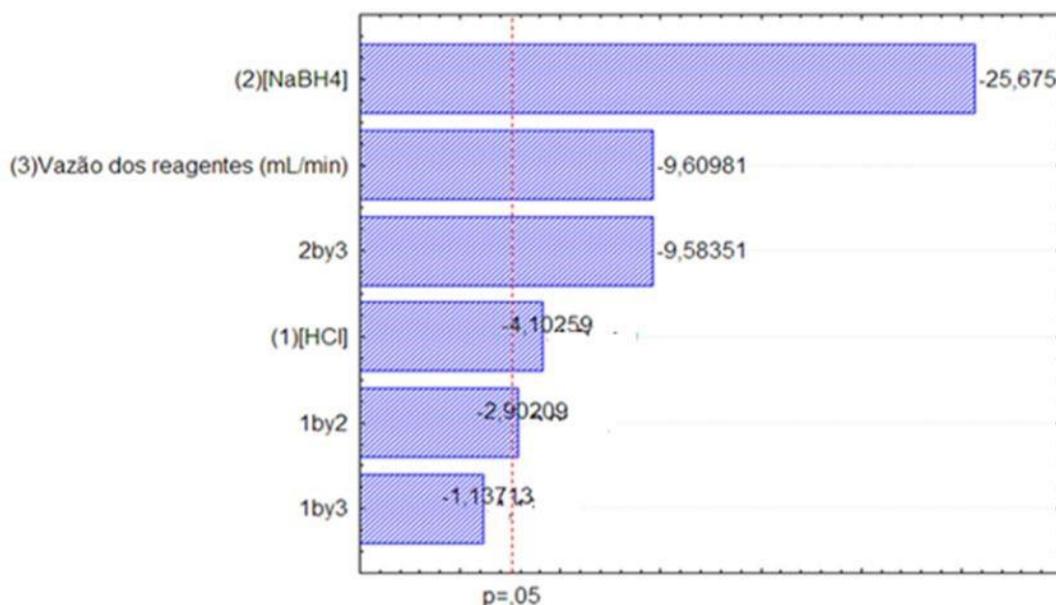


Figura 8 – Diagrama de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo 2^3 Nota: intervalo de confiança em 95%.

Através da análise deste gráfico é possível observar que os fatores, quando analisadas de forma independente, apresentam efeito significativo ao nível de 95 %

de confiança no método avaliado, sendo a concentração de NaBH_4 (2) a variável que apresentou maior significância na resposta do sistema, seguida das variáveis V.R (3) e concentração de HCl (1), respectivamente.

A significância dos fatores [HCl] e V.R no sistema estudado está condizente com o que a literatura abordada a respeito da influência dos mesmos para a eficiente formação do hidrogênio atômico e conseqüentemente geração dos hidretos voláteis.

Segundo Cadore e Baccan (1997), quando a amostra é preparada com água deionizada em vez de HCl, a intensidade dos sinais pode diminuir acentuadamente, mostrando que a presença de íons hidrônio (H^+) é necessário para liberar o hidrogênio que reagirá com as espécies químicas que formam hidretos.

A efetiva interação entre NaBH_4 e HCl é muito importante para a eficiência da geração de hidretos e estabilidade da reação química. Em sistemas em fluxo, além dos fatores influência da matriz, design da célula de reação, presença e concentração de elementos interferentes; dentre outros fatores, o aumento da sensibilidade está diretamente relacionado com o controle da concentração e do aumento proporcional destes reagentes. Durante as análises, foi observado uma maior turbulência no meio reacional para as maiores taxas de fluxo e maiores concentrações de NaBH_4 e HCl, a qual foi evidenciada pela impregnação de grande quantidade de água condensada nas paredes da célula de reação, dificultando a inspeção visual da reação química em seu interior. Além disso, foi observado uma falta de repetitividade entre as medidas e redução no sinal do analito.

Portanto, o que, provavelmente, pode ter ocorrido foi a formação excessiva de hidrogênio, que, segundo a literatura, tende a comprometer o desempenho do plasma, e conseqüentemente tornar as medidas poucas reprodutivas, e causar perdas nas determinações do analito por diluição, devido à alta evolução de hidrogênio na célula de reação (THOMPSON et al., 1974).

As interações significativas com efeito negativo demonstram que a combinação dos níveis dos fatores envolvidos em cada interação não favorece as melhores respostas no sistema desenvolvido, provavelmente, por duas razões: não tende a favorecer a formação quantitativa dos hidretos voláteis, devido a baixa formação de hidrogênio atômico; ou tende a favorecer a formação excessiva de hidrogênio, cujas conseqüências foram relatadas anteriormente. No entanto, as melhores respostas são observadas quando um fator é usado em seu nível superior

e outro fator em seu nível inferior, pois, assim, maior é a eficiência para a geração dos hidretos e estabilidade da reação química.

Para verificar a viabilidade do modelo para descrever a região estudada do sistema e verificar se realmente pode ser empregado para fazer estimativas para deslocamento e extrair conclusões precisas à respeito da região ótima, é necessário fazer uma avaliação prévia do ajuste deste modelo através da chamada “análise de variância”, a qual faz as seguintes considerações: a maior parte da variação total das observações em torno da média deve ser descrita pela equação de regressão e o restante ficará como resíduos. Destes, espera-se que a maior parte fique com o erro puro, que está relacionado ao erro experimental, e não com a falta de ajuste, que está relacionado ao modelo. Logo, um modelo visto como ideal deve apresentar uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa (BEZERA, 2006; PIMENTEL; NETO, 1996).

Desta forma, para avaliar a qualidade do modelo é necessário verificar o valor F da falta de ajuste. Se o modelo estiver bem ajustado aos dados experimentais, a média quadrática referente a falta de ajuste, MQfaj, deve refletir somente os erros aleatórios associados ao sistema. Além disso, a média quadrática relacionada ao erro puro (MQep) também deve consistir em uma estimativa de tais erros, e considera-se que estes dois valores não sejam consideravelmente distintos estatisticamente. Se a razão entre a MQfaj/MQep for inferior ao valor de F tabelado, o ajuste do modelo obtido é considerado satisfatório (PIMENTEL; NETO, 1996).

A ANOVA, obtida através do programa Statistica 7, referente ao modelo linear obtido é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise da variância referente ao modelo linear.

	SQ	gl	MQ	F	P
(1)HCl	391011	1	391011	16,8313	0,009331
(2)NaBH ₄	15314183	1	15314183	659,2065	0,000002
Flux. R (3)	2145370	1	2145370	92,3485	0,000207
1by2	195656	1	195656	8,4221	0,033709
1by3	30039	1	30039	1,2931	0,307026
2by3	2133641	1	2133641	91,8436	0,000210
Falta de ajuste	103822	1	103822	4,4691	0,088171
Erro puro	116156	5	23231		
SQ Total	26856872	13			

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática, P = nível de probabilidade.

De acordo a ANOVA, a falta de ajuste do modelo linear não é significativa, pois o valor da razão da MQfaj/MQep é (4,469) inferior ao valor de F tabelado (6,608) para 1 e 5 graus de liberdade, respectivamente, a 95% de confiança. Portanto, o modelo está bem ajustado aos dados obtidos, podendo ser utilizado como representação dos dados experimentais.

5.1.2 Planejamento Box-Behnken

Com base nos resultados obtidos no planejamento fatorial, um planejamento Box-Behnken foi realizado a fim de ajustar um modelo quadrático para os dados e identificar as melhores condições para o procedimento de geração de hidretos de Se por HG-MIP OES e obtenção do modelo matemático para modelar o experimento analítico. Uma vez que os três fatores estudados (NaBH_4 , HCl e vazão dos reagentes) no planejamento fatorial foram estatisticamente significativos com 95% de confiança, logo foram avaliadas através do planejamento Box-Behnken. A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento (com a inclusão de seis pontos centrais para avaliar o erro experimental) com seus valores reais e codificados, e as respostas (intensidades) obtidas.

Tabela 11 – Matriz de experimentos do planejamento Box-Behnken utilizada para estabelecer as melhores condições de geração de vapor de Se (IV) por HG-MIP OES.

Experimento	[NaBH_4] (%)	[HCl] (mol L ⁻¹)	V.R (mL min ⁻¹)	Intensidade
1	- (0,3)*	- (1,2)	0 (2,0)	10113,59
2	+ (0,9)	- (1,2)	0 (2,0)	10386,04
3	- (0,3)	+ (2,4)	0 (2,0)	12395,81
4	+ (0,9)	+ (2,4)	0 (2,0)	12338,92
5	- (0,3)	0 (1,8)	- (1,5)	14117,76
6	+ (0,9)	0 (1,8)	- (1,5)	14478,98
7	- (0,3)	0 (1,8)	+ (2,5)	14048,43
8	+ (0,9)	0 (1,8)	+ (2,5)	14551,76
9	0 (0,6)	- (1,2)	- (1,5)	14393,87
10	0 (0,6)	+ (2,4)	- (1,5)	14699,32
11	0 (0,6)	- (1,2)	+ (2,5)	14693,87
12	0 (0,6)	+ (2,4)	+ (2,5)	15061,21
13	0 (0,6)	0 (1,8)	0 (2,0)	13469,65
14	0 (0,6)	0 (1,8)	0 (2,0)	13857,98
15	0 (0,6)	0 (1,8)	0 (2,0)	14165,65
16	0 (0,6)	0 (1,8)	0 (2,0)	14447,09
17	0 (0,6)	0 (1,8)	0 (2,0)	14359,87

18

0 (0,6)

0 (1,8)

0 (2,0)

14670,76

*Valor real.

Os dados obtidos foram tratados no software Statistica e geraram as superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

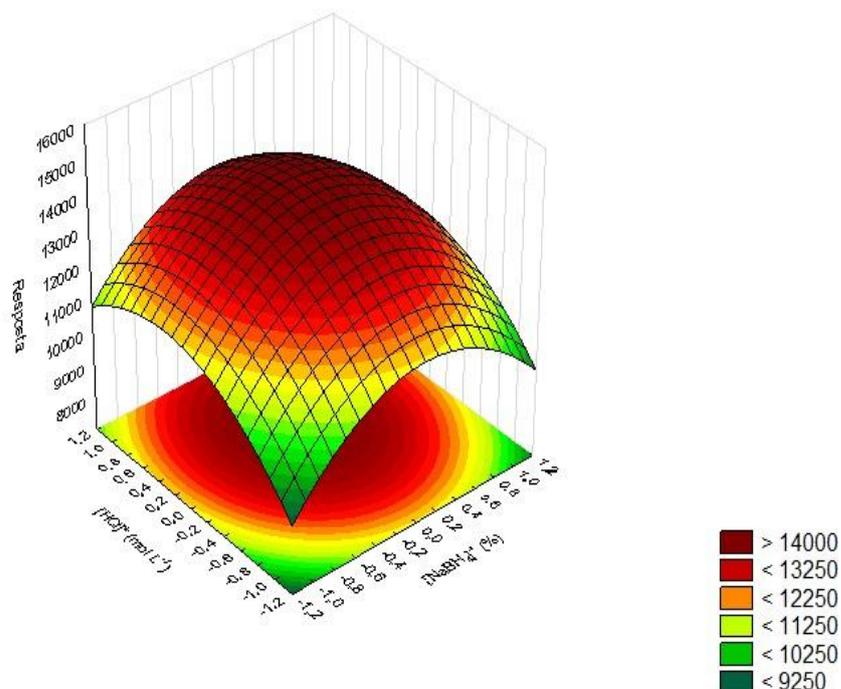


Figura 9 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores concentração de NaBH_4 e concentração de HCl .

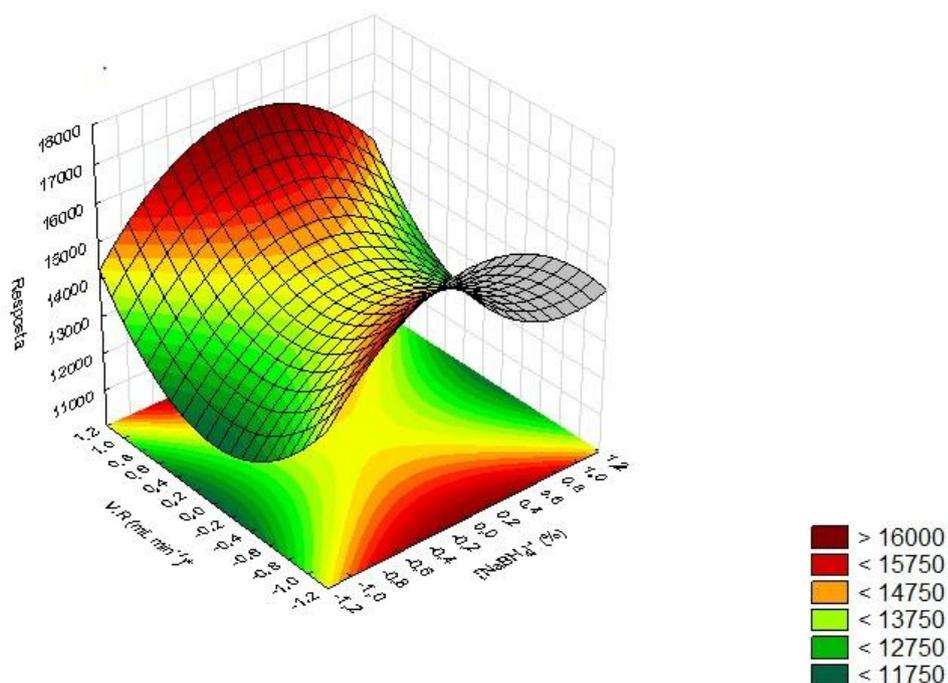


Figura 10 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Box-Behnken para otimização dos fatores V.R. e concentração de NaBH_4 .

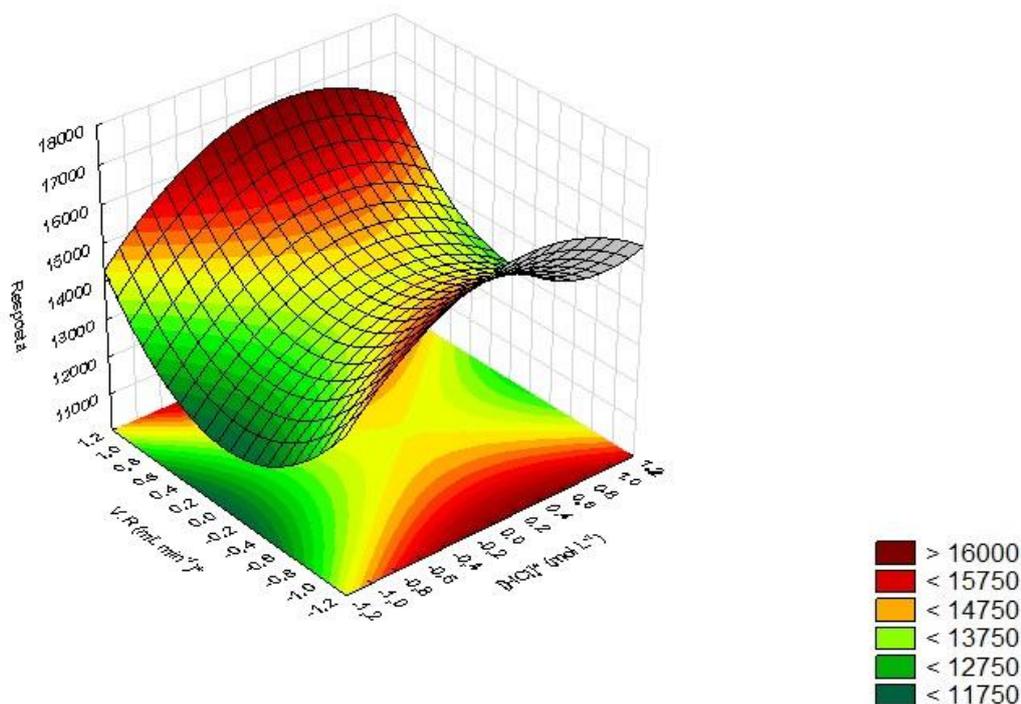


Figura 11 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Box-Bhenken para otimização dos fatores V.R e concentração de HCl.

Analisando a superfície de resposta da Figura 9 é possível perceber a existência de uma região de máxima intensidade tanto para a concentração de ácido clorídrico como para concentração de borohidreto de sódio, região de cor vermelha mais intensa na superfície. Mas, as superfícies obtidas envolvendo a vazão dos reagentes, Figuras 10 e 11, indicam a existência de ponto de sela. Este ponto indica a probabilidade de existência de pontos de máximo em mais de uma região do domínio experimental (FERREIRA, 2015). Isto pode ser melhor esclarecido por meio do estudo univariado desta variável, desta forma, pode-se visualizar apenas a relação de dois fatores.

A Equação 15 ilustra a relação entre os três fatores estudados (concentração de ácido clorídrico ([HCl]) e de borohidreto de sódio ([NaBH₄]) e a vazão dos reagentes (V.R), com o sinal analítico (intensidade), considerando os valores reais. Essa equação revela os pontos críticos das superfícies de resposta para cada fator. Os valores obtidos através da equação estão apresentados na Tabela 12.

$$R = 14161,83_{\pm 178,05} - 1633,04_{\pm 208,78} [HCl]^2 + 613,49_{\pm 154,20} [NaBH_4] - 1220,20^2_{\pm 208,78} + 1770,44_{\pm 208,78} (V.R)^2$$

(15)

Tabela 12 – Valores críticos obtidos para os fatores [HCl] e [NaBH₄].

Variável	Mínimo	Crítico	Máximo
[HCl] (mol L ⁻¹)	1,2	1,82	2,4
[NaBH ₄] (%)	0,3	0,68	0,9

Uma análise de variância, apresentada na Tabela 13, mostrou que o modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor da razão da MQfaj/MQep (2,9671) é inferior ao valor de F tabelado (5,309) para os respectivos graus de liberdade 3 e 5, a 95% de confiança. Desta forma, o modelo matemático está bem ajustado aos dados obtidos, podendo ser utilizado como representação dos dados experimentais.

Tabela 13 – Análise da variância do modelo quadrático.

	SQ	gl	MQ	F	P
(1)[HCl](L)	145830	1	145830	0,76667	0,421313
[HCl](Q)	11637019	1	11637019	61,17950	0,000548
(2)[NaBH ₄](L)	3010923	1	3010923	15,82938	0,010545
[NaBH ₄](Q)	6497010	1	6497010	34,15684	0,002076
(3)Vazão(L)	55335	1	55335	0,29091	0,612778
Vazão (Q)	13677608	1	13677608	71,90752	0,000375
1 e 2	27116	1	27116	0,14256	0,721247
1 e 3	5049	1	5049	0,02654	0,876961
2 e 3	958	1	958	0,00503	0,946185
Falta de ajuste	1693098	3	564366	2,96705	0,136078
Erro puro	951055	5	190211		
Total SS	35571128	17			

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática, P = nível de probabilidade.

O ajuste do modelo também foi avaliado através da análise do gráfico de valores preditos vs valores observados, apresentado na Figura 12, e através da análise do gráfico de resíduos, apresentado na Figura 13.

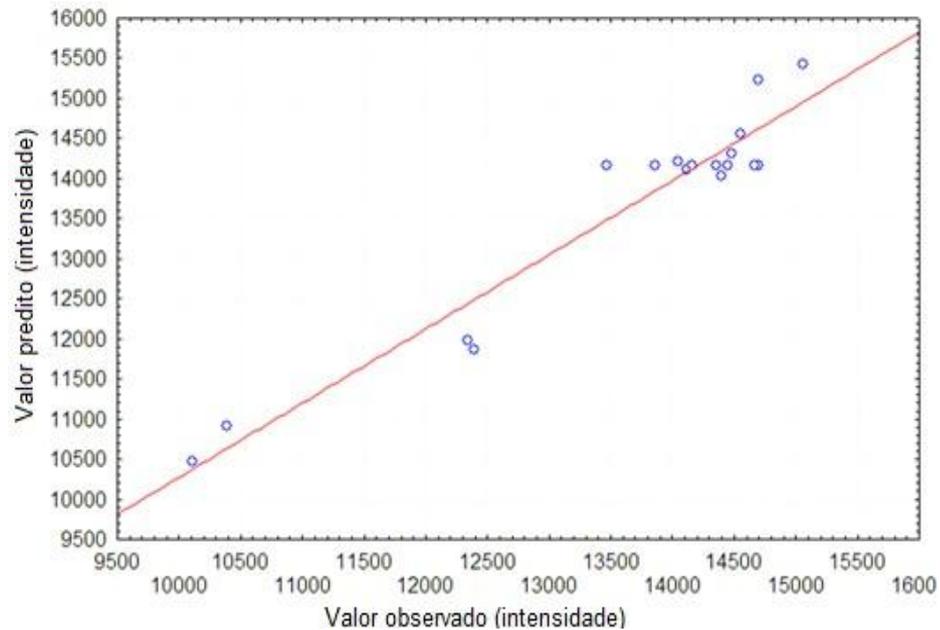


Figura 12 – Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido do planejamento Box-Behnken (R^2 0,9257).

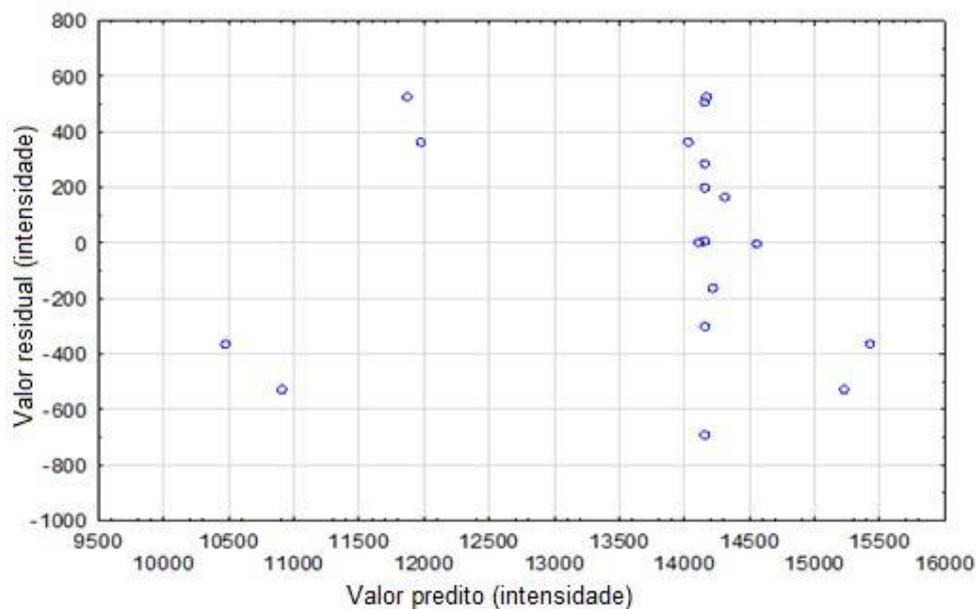


Figura 13 – Gráfico de valores preditos vs resíduos obtido do planejamento Box-Behnken.

A avaliação do modelo considerando o coeficiente de determinação no valor de 0,9257 revela uma boa correlação entre os valores experimentais e os valores preditos, como pode ser observado no gráfico da Figura 12.

Em um modelo bem ajustado, os resíduos devem dar a impressão de terem sido produzidos por uma distribuição aleatória, sem apresentar um padrão geométrico. Se um modelo deixar resíduos tendenciosos ele não é muito adequado

para fazer inferências precisas sobre o comportamento destes dados no campo experimental em questão (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010, PASSARI, SOARES; BRUNS, 2011, PIMENTEL, NETO, 1996). Pode-se observar na Figura 13 que existe uma tendência para a distribuição normal, em que os valores dos resíduos se distribuem aleatoriamente, e não há indícios de que a sua variância não seja constante.

Portanto, pôde-se ter a confiança de que os valores ótimos calculados nessa etapa para as variáveis estudadas ([HCl] e [NaBH₄]) foram válidos, pois os mesmos foram obtidos de um modelo matemático bem ajustado, além do mais estão coerentes com valores sugeridos pela literatura para sistemas em fluxo (VIEIRA, 2007).

Para a vazão, foi feito um estudo univariado aplicando os mesmos níveis (1,5; 2,0 e 2,5 mL min⁻¹, respectivamente) estudados no planejamento Box-Behnken, sob as condições otimizadas desses fatores. Os resultados obtidos neste estudo foram expressos na forma de gráfico como mostrado abaixo na Figura 14.

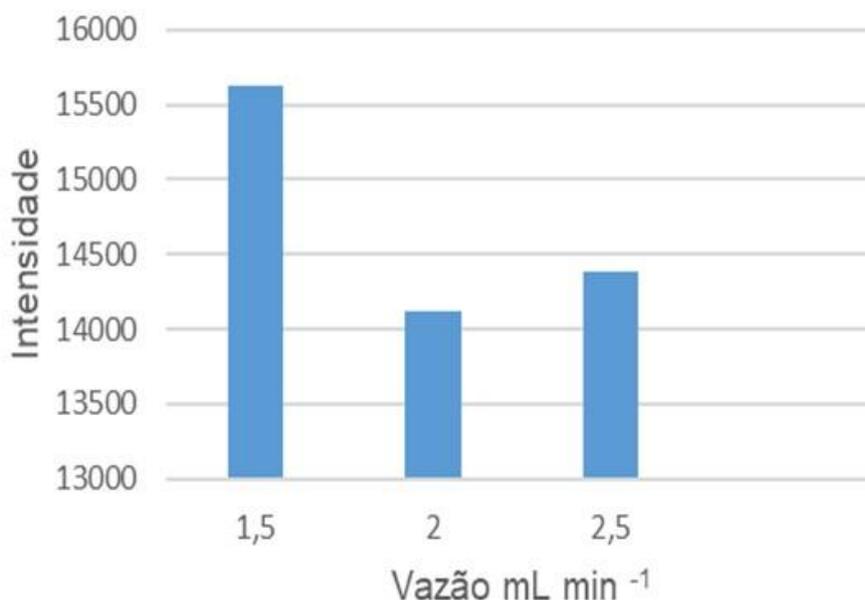


Figura 14 – Estudo univariado da V.R (amostra/NaBH₄) para a geração de vapor de Se (IV). Condições: Se (IV) 10,0 µg L⁻¹, HCl 1,8 mol L⁻¹, NaBH₄ 0,7% (m/v) e determinação por HG-MIP OES.

Pela análise do gráfico é possível perceber o que já tinha sido evidenciado pelas superfícies de resposta em relação a este fator, ou seja, a ocorrência de dois pontos de máxima intensidade, um para menor vazão e outro para maior vazão, respectivamente. No entanto, para maiores vazões, o sinal analítico diminuiu; quimicamente, uma maior intensidade líquida tende a favorecer a formação

excessiva de hidrogênio no meio reacional. E este excesso pode causar perdas na determinação do analito por diluição, e conseqüentemente redução do sinal analítico, e, ainda, pode afetar o desempenho do plasma, tornando-o instável (CRISPINO, 2005; NÉRI, 2014; PASSOS et al., 2012; VILARINHO; BACCAN, 2001).

Vale ressaltar que teria a possibilidade de um novo deslocamento do domínio experimental do planejamento Box-Bhenken para menores vazões. Mas, abaixo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ a frequência analítica é relativamente baixa, por isso, considerou-se esta como vazão mínima para o estudo, a qual também proporcionou a melhor resposta analítica para o analito no estudo univariado.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-REDUÇÃO DE SE (VI) A SE (IV) SOB AQUECIMENTO

5.2.1 Planejamento Doehlert

A matriz Doehlert foi aplicada com objetivo de otimizar o tempo e a temperatura de pré-redução de selênio em banho-maria. A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 14, com seus valores reais e codificados, e as respostas como intensidades.

Tabela 14 – Planejamento Doehlert referente ao estudo da temperatura e tempo de pré-redução de Se em banho-maria.

Tempo de pré-redução (minutos)	Temperatura de pré-redução (°C)	Intensidade do sinal
*(30) 0	(90°C) 0	14949,62
(30) 0	(120°C)1	14307,83
(50) 0,866	(90°C) 0,5	14203,67
(30) 0	(25°C) -1	14019,32
(10) -0,866	(30) -0,5	13632,7
(10) -0,866	(90°C) 0,5	13541,31
(50) 0,866	(30°C) -0,5	13194,29
(30) 0	(60°C) 0	14714,87
(30) 0	(60°C) 0	15396,65
(30) 0	(60°C) 0	15082,87

*valor real

A equação 16 ilustra a relação entre as duas variáveis estudadas (tempo de pré-redução (Tempo.P.R) e temperatura de pré-redução (temperatura P.R), com o

sinal analítico (intensidade), considerando os valores reais. Essa equação revela os pontos críticos da superfície de resposta para cada variável.

$$R = 15036_{\pm 142,26} - 1566,73_{\pm 246,4}(Tempo P. R.)^2 - 872,43_{\pm 246,40}(Temperatura P. R.)^2 \quad (16)$$

Os valores obtidos através da equação estão apresentados na Tabela 15. E a superfície de resposta correspondente está apresentada na Figura 15, na qual pode ser observado uma região de máxima intensidade.

Tabela 15 – Valores críticos obtidos para as variáveis tempo de pré-redução e temperatura de pré-produção de Se em banho-maria.

Variável	Mínimo	Crítico	Máximo
Tempo de pré-redução (min)	10 (-0,866)	31,07 (0,0535)	50 (0,866)
Temperatura de pré-redução (°C)	25 (-1)	70 (0,1623)	120 (1)

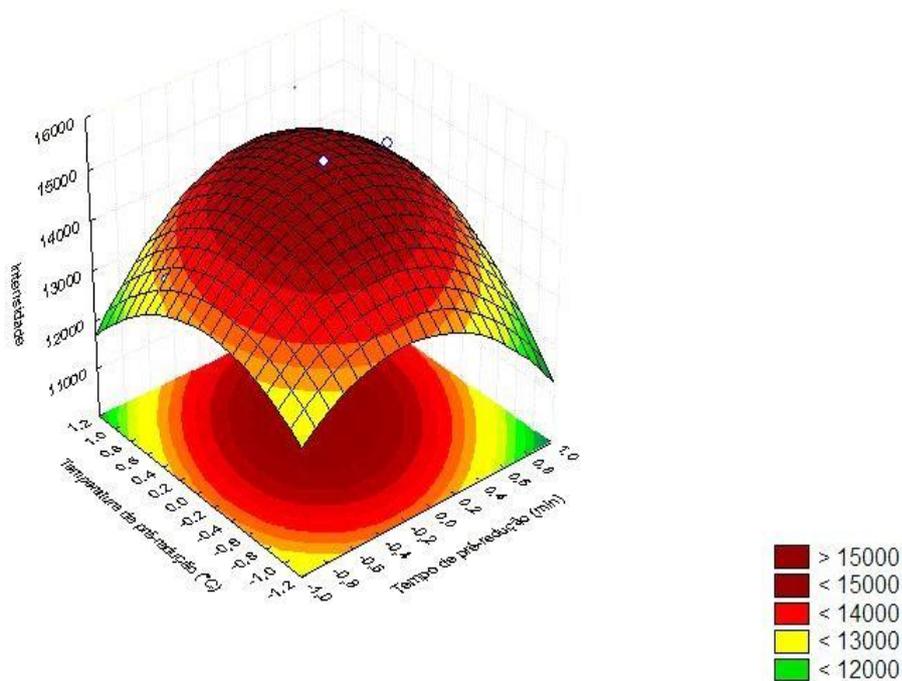


Figura 15 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento Dohelert referente a otimização das variáveis tempo de pré-redução e temperatura de pré-redução de Se sob aquecimento.

A ANOVA referente ao modelo quadrático é apresentada abaixo na Tabela 16.

Tabela 16 – Análise de variância do modelo quadrático obtido.

	SQ	gl	MQ	F	P
(1)Tempo de pré-redução (min)(L)	12538	1	12538	0,15489	0,720209
Tempo de pré-redução (min)(Q)	3272053	1	3272053	40,42047	0,007874
(2)Temperatura de pré-redução (°C)(L)	186255	1	186255	2,30085	0,226577
Temperatura de pré-redução (°C)(Q)	1014840	1	1014840	12,53656	0,038344
1L by 2L	302924	1	302924	3,74209	0,148517
Falta de ajuste	66041	1	66041	0,81582	0,432983
Erro puro	242851	3	80950		
Total SS	4741080	9			

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática, P = nível de probabilidade

A análise de variância mostrou que o modelo não apresenta falta de ajuste, já que o valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} (0,81) é inferior ao valor de F tabelado (10,13) para os respectivos graus de liberdade 1 e 3, a 95% de confiança.

O ajuste do modelo também foi avaliado através da análise do gráfico de valores preditos vs valores observados, representado na Figura 16, e através da análise do gráfico de resíduos, representado na Figura 17.

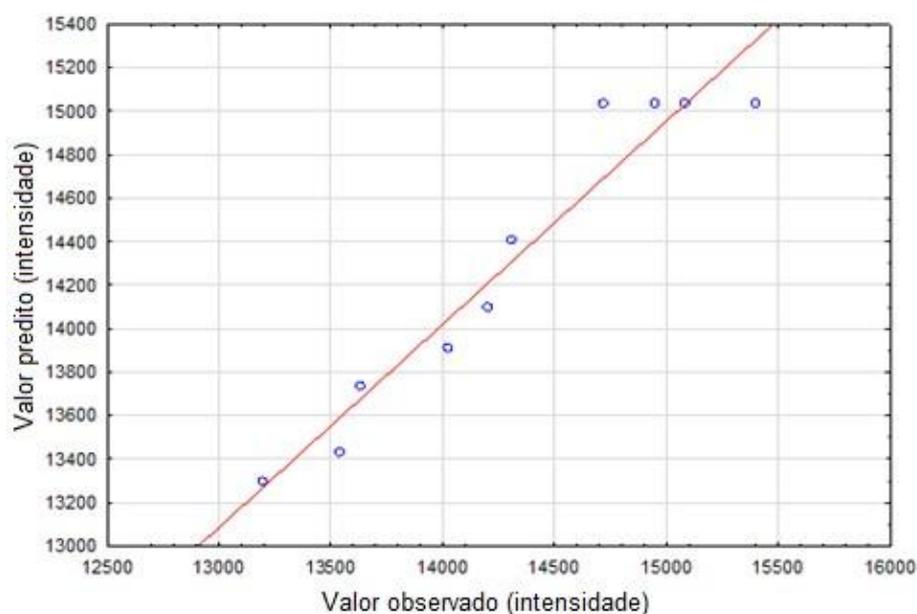


Figura 16 - Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido do planejamento Dohelert (R^2 0,9349).

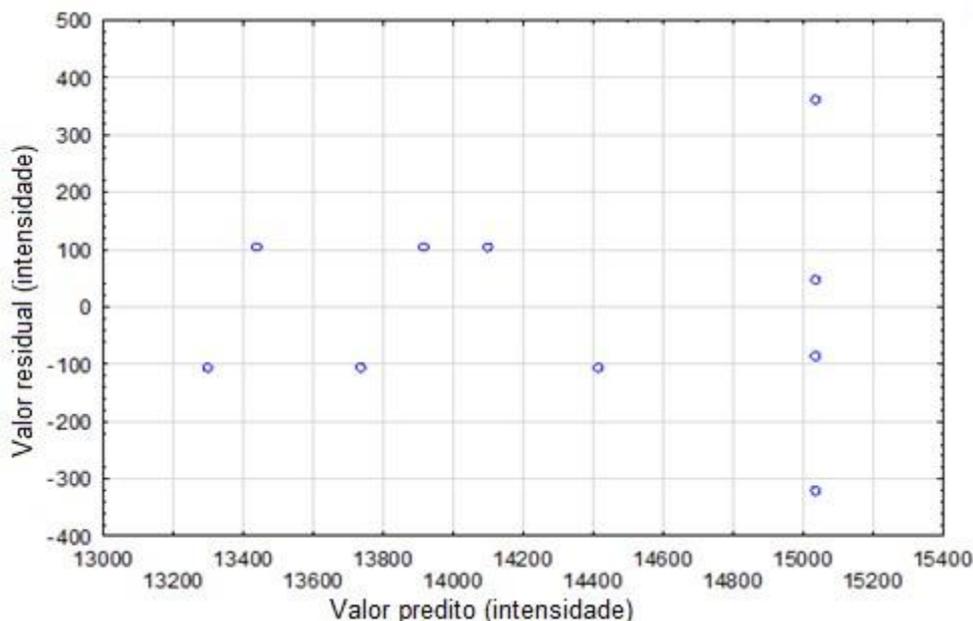


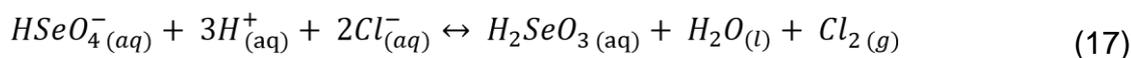
Figura 17 - Gráfico de valores preditos vs resíduos obtido do planejamento Dohelert.

A avaliação do modelo considerando o coeficiente de determinação no valor de 0,9349 revela uma boa correlação entre os valores experimentais e os valores preditos, como pode ser observado no gráfico da Figura 16.

Pode-se observar na Figura 17 que existe uma tendência para a distribuição normal, em que os valores dos resíduos se distribuem aleatoriamente, e não há indícios de que a sua variância não seja constante.

Portanto, pôde-se ter a confiança de que os valores ótimos calculados nessa etapa para os fatores temperatura de pré-redução e tempo de pré-redução foram válidos, pois os mesmos foram obtidos de um modelo matemático bem ajustado, além do mais estão em concordância com os valores sugeridos pela literatura para procedimentos de pré-redução de selênio, em meio ácido, sob aquecimento.

Segundo Krivan et al. (1985), 97% do selênio permanece na forma de Se (VI) em HCl 5 mol L⁻¹ à temperatura ambiente, sendo a reação endotérmica da esquerda para a direita, e que o equilíbrio da reação pode ser deslocado para a direita conforme o aumento da temperatura. A equação 17 representa a reação redox de Se (VI) a Se (IV) pelo íon cloreto (DEDINA; TSALEV, 1995).



Onde:

$$K = 7,1 \times 10^{-11} \text{ Kg}^{-4} \text{ mol}^4$$

$$\Delta H = +144,9 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ à } 25^{\circ}\text{C}$$

Após os resultados obtidos com a análise estatística multivariada, as melhores condições para a pré-redução de selênio em meio HCl 6 mol L⁻¹ sob aquecimento foram: Tempo de pré-redução de 31 minutos e temperatura de pré-redução de 70 °C.

Portanto, diante dos resultados obtidos com a avaliação estatística multivariada e univariada, as melhores condições de geração de vapor (HCl 1,8 mol L⁻¹, NaBH₄ 0,7% e vazão de 1,5 mL min⁻¹) e pré-redução de selênio (31 min/70°C) foram usadas para validar o método através dos seguintes parâmetros de confiabilidade analítica: Linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e acurácia. Para posterior determinação de Se em amostras de moluscos bivalves coletados em “coroa do meio”, região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.3.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método analítico soluções padrão contendo de 0 a 70,0 µg L⁻¹ de Se foram preparadas. A curva de resposta obtidas está ilustrada abaixo na Figura 15, onde pode ser observado uma boa linearidade dentro da faixa estipulada.

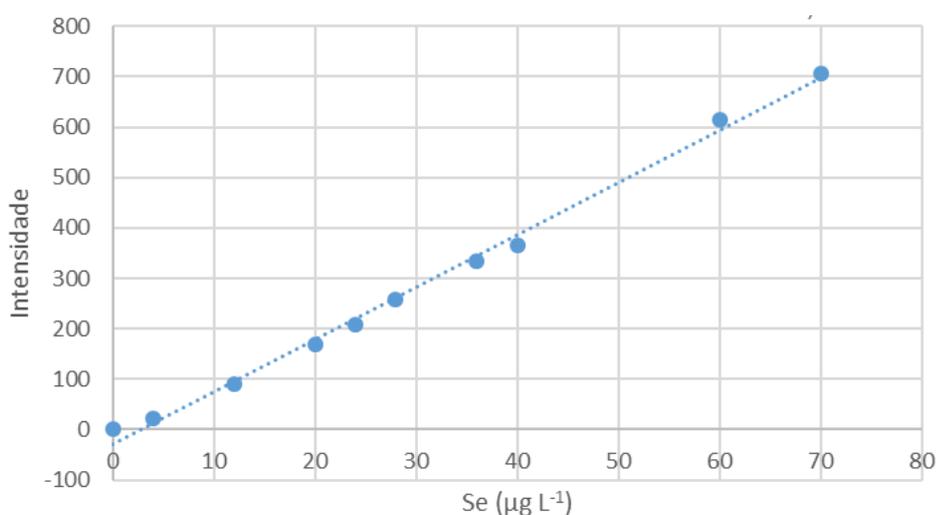


Figura 18 – Curva de resposta obtida para a determinação de Se em amostras de moluscos bivalves por HG-MIP OES utilizando as condições experimentais estabelecidas.

Tabela 17 – Parâmetros relativos à curva de resposta.

Analito	Equação da curva de resposta	R ²
Se	$y = 61,91 (\pm 0,2425)x + 36,868 (\pm 8,851)$	0,9956

5.3.2 Limite de detecção e quantificação

Para a determinação do limite de detecção e quantificação uma curva analítica foi preparada com padrões de selênio na faixa de concentração de 0,5-12 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18– Parâmetros de confiabilidade analítica relativos à determinação de Se em amostras de moluscos bivalves por HG-MIP OES.

Analito	Curva Analítica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da curva analítica	R ²	LD (mg kg^{-1})	LQ (mg kg^{-1})	RSD (%)
Se	0,5-12	$y = 61,91 (\pm 2,507)x + 36,868 (\pm 19,011)$	0,9935	0,30	1,02	3,55

A Tabela 19 mostra o limite de detecção obtido para a determinação de selênio em amostras ambientais, empregando métodos analíticos distintos. Como pode ser constatado, o limite de detecção obtido pelo método proposto foi melhor que o obtido por GF AAS para determinação deste analito em amostras de moluscos bivalves e peixes.

Tabela 19– Métodos analíticos para a determinação de selênio em amostras ambientais.

Técnica	Amostra	LD	Referência
HG IA-FAAS	Água	0,2 ng mL^{-1}	MATUSIEWICZ; KRAWCZYK, 2006
HG AFS	moluscos bivalves peixes	6,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	SANTOS et al., 2014
GF-AAS	moluscos bivalves e peixes	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	SEIXAS, 2007
HG-MIP OES	moluscos bivalves	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	ESTE TRABALHO

5.3.3 Precisão

Para verificar a precisão do método analítico, realizou-se no mesmo dia 9 medidas de uma mesma amostra preparadas nas mesmas condições. E, desta forma, o desvio padrão relativo encontrado foi de 7,8%.

Métodos analíticos para quantificar o analito em escala macro requerem um %RSD de 1 a 2%. Mas, para análises de traço, é aceitável um %RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (BRITO; JUNIOR; POLESSE, 2003).

5.3.4 Acurácia do método analítico

Para avaliar a acurácia do método analítico, o material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) foi analisado, o resultado obtido está apresentado na Tabela 20. Como pode ser observado, o valor encontrado está de acordo com o valor certificado.

Tabela 20– Resultado da análise do material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) empregando o método desenvolvido para a determinação de selênio (n= 3) por HG MIP OES.

CRM	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	RSD%
NIST 1566b	2,08 ± 0,15	2,06 ± 0,15	3,0%

Depois da análise do material de referência certificado, o valor absoluto da diferença entre o valor medido médio e o valor certificado pode ser determinado de acordo com a Equação 18:

$$\Delta m = [C_m - C_{CRM}] \quad (18)$$

Onde:

Δm = valor absoluto da diferença entre o valor medido médio e o valor certificado;

C_m = valor medido médio; C_{CRM}
= valor certificado.

Cada medição é afetada de uma incerteza, desta forma, o resultado de uma medição só pode ser conhecido dentro dos limites dessa incerteza. Analogamente, ao valor certificado de um material de referência certificado está sempre associada a uma incerteza U_{CRM} (LINSINGER, 2005).

A incerteza U_{Δ} de Δ_m é calculada a partir da incerteza do valor certificado e da incerteza do resultado da medição, de acordo com a Equação 19.

$$U_{\Delta} = \sqrt{U_m^2 + U_{CRM}^2} \quad (19)$$

U_{Δ} = incerteza combinada do resultado da medição e do valor certificado (= incerteza de Δm);

U_m = incerteza do resultado da medição; U_{CRM}
= Incerteza do valor certificado.

A incerteza expandida, U_{Δ} , correspondente a um intervalo de confiança de aproximadamente 95%, é obtida multiplicando-se U_{Δ} por um fator de expansão (k), geralmente igual a 2.

Logo, para avaliar o desempenho do método, compara-se Δ_m com U_{Δ} :

Se $\Delta_m \leq U_{\Delta}$, a diferença entre o resultado da medição e o valor certificado não será significativa.

Portanto, o valor Δ_m encontrado (0,02) foi menor que o valor de U_{Δ} (0,37), desta forma, não existiu diferença significativa entre o valor experimental e o valor certificado ao nível de significância de 5%.

5.3.5 Aplicação do método analítico desenvolvido

5.3.5.1 Determinação de Se em moluscos bivalves por HG-MIP OES

O método analítico desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação de

Se total em moluscos bivalves coletados em "coroa do meio". Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados (média \pm intervalo de confiança e desvio padrão relativo; n=3) da determinação da concentração de Se total nas amostras de moluscos bivalves coletados em "coroa do meio" por HG MIP OES.

Amostras	Se (mg kg ⁻¹)	%RSD
Lambreta (<i>Anodontites trapesialis</i>)	2,62 \pm 0,33	5,20
Moapen (<i>Tagelus plebeius</i>)	2,76 \pm 0,15	2,17
Sururu (<i>Mytella guyanensis</i>)	2,60 \pm 0,42	6,50

A Tabela 22 mostra a concentração de selênio encontrada em espécies de moluscos bivalves coletados em diferentes locais do Brasil, para grau comparativo com a concentração encontrada nas espécies em estudo. Como pode ser observado, as concentrações de selênio encontradas nas três espécies de bivalves

não diferiram significativamente e ficaram dentro da faixa encontrada em amostras de mariscos (ostras, mariscos e mexilhões) coletadas ao longo Baía de todos os Santos, na Bahia, e de ostra coletada na Baía de Sepetiba, no Rio de Janeiro. Entretanto, as concentrações foram similares à concentração de selênio encontrada em Ostra, coletada em Temadre, Bahia de Todos os Santos/Ba.

Tabela 22 – Concentrações de selênio total em moluscos bivalves coletados em diferentes locais do Brasil.

Amostras	Local de coleta	Concentração de selênio encontrado	Referência
Mexilhão (<i>Mytella guyanensis</i>)	*Barra Grande/Itaparica Misericórdia-Itaparica	1,60 ± 0,16 mg kg ⁻¹ 3,29 ± 0,04 mg kg ⁻¹	SANTOS et al, 2014.
Ostra (<i>Crassostrea rhizophorae</i>)	*BarraGrande/Itaparica *Misericórdia/Itaparica *Temadre	3,12 ± 0,23 mg kg ⁻¹ 3,02 ± 0,58 mg kg ⁻¹ 2,87 ± 0,42 mg kg ⁻¹	SANTOS et al. 2014
Mexilhão (<i>Brachidontes exustus</i>)	*Aratu	0,32 ± 0,02 mg kg ⁻¹	SANTOS et al. 2014
Vôngole	**Baía de Sepetiba	0,88-0,90 µg g ⁻¹	KEHRIG et al. 2006
Mexilhão Ostra	**Baía de Sepetiba	3,0-3,6 µg g ⁻¹	
	**Baía de Sepetiba	1,5-5,1 µg g ⁻¹	
Mexilhão	**baía de Guanabara	0,1-0,3 µg g ⁻¹	SEIXAS et al. 2007

**Rio de Janeiro; * Bahia (Baía de todos os Santos).

As concentrações de selênio nas espécies ficaram dentro da faixa das concentrações encontradas em amostras de moluscos bivalves de ambientes da Austrália considerados não poluídos, que estão na faixa de 1,3 a 11 µg g⁻¹ em peso seco. No entanto, ficaram acima do valor recomendado pela legislação brasileira para alimentos sólidos, 0,3 mg kg⁻¹ em geral (LOBEL et al., 1991).

6 CONCLUSÕES

A otimização multivariada aplicada aos dados experimentais para a geração do hidreto volátil de Se (IV) é uma ferramenta bastante útil e permitiu reduzir a quantidade de experimentos necessários para a otimização dos parâmetros selecionados, além disso, permitiu avaliar a interação entre os fatores envolvidos no processo.

O método de determinação de selênio pela espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas com geração de hidretos apresentou limites de detecção e quantificação relativamente baixos e ampla faixa dinâmica linear, e precisão satisfatória.

A pré-redução do selênio é um procedimento necessário quando o preparo de amostra envolve decomposição oxidativa com uso de ácidos concentrados, pois o selênio presente na amostra tende a ser convertido ao seu maior estado de oxidação (VI), que não tem afinidade para gerar hidreto, na etapa de digestão. Neste sentido, a pré-redução de selênio com ácido clorídrico e auxílio de aquecimento foi eficiente para tal objetivo.

Ademais, este trabalho foi pioneiro para a determinação de selênio em moluscos bivalves utilizando a otimização multivariada e o HG-MIP OES como método analítico. O método é simples e relativamente econômico, sendo por isso uma boa alternativa para a determinação de selênio em moluscos bivalves.

As concentrações de selênio (2,60-2,76 mg kg⁻¹) encontradas nas três espécies de moluscos bivalves coletados em “Coroa do Meio” estão acima do valor recomendado pela legislação brasileira para alimentos sólidos (0,30 mg kg⁻¹), sendo assim, cuidados são necessários quanto ao consumo contínuo destes alimentos.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, D. D; BAYTAK, S; ARSLAN, Z. J. Simultaneous generation of hydrides of bismuth, lead and tin in the presence of ferricyanide and application to determination in biominerals by ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, n. 25, p. 726–729, 2010.
- AGILENT TECHNOLOGIES. **MP-AES Agilent 4200**. Agilent Technologies, Inc. 2014.
- AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; BELLA, Z.; BOLLA, S.; SZAKÁL, P.; BENCS, L. Determination of total selenium content in cereals and bakery products by flow injection hydride generation graphite furnace atomic absorption spectrometry applying in-situ trapping on iridium-treated graphite platforms. **Microchimica Acta**, v. 150, n. 1, p. 1-8, 2005.
- ALLANDER, E. Kashin-Beck disease: an analysis of research and public health activities based on a bibliography. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 1992, n. 23, p. 1849-1992, 1994.
- ALMEIDA et al. Crustáceos decápodos estuarinos de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Biota Neotrop**, v. 6 n. 2, 2006.
- ALTUNAY, N; GÜRKAN, R. Separation/preconcentration of ultra-trace levels of inorganic Sb and Se from different sample matrices by charge transfer sensitized ion-pairing using ultrasonic-assisted cloud point extraction prior to their speciation and determination by hydride generation AAS. **Talanta**, n. 159, p. 344-355, 2016.
- AMWEG, E. L.; STUART, D. L; WESTON, D. P. Comparative bioavailability of selenium to aquatic organisms after treatment of agricultural drainage water. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 13-25, 2003.
- AONO, T.; NAKAGUCHI, Y.; HIRAKI, K. Vertical profiles of dissolved selenium in the North Pacific. **Geochemical Journal**, v. 25, p. 45-55, 1991.
- BALDWIN, S; MAHER, W. Spatial and temporal variation of selenium concentration in five species of intertidal molluscs from Jervis Bay, Australia. **Marine Environmental Research**, v.44, p. 243-262, 1997.
- BARRA, C. M. et al. Arsenic speciation – A review. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 5870, 2000.
- BARRIENTOS, E. Y. et al. Determination of SeMet and Se(IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC-HG-MP-AES). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 203-211, 2016.
- BAX, D.; VAN ELTEREN, J. T. **Spectrochimica. Acta Part B** v. 41, n. 1007, 1986.

- BEZERRA, M. A. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama**. 2003. Dissertação de mestrado. UFBA, Salvador-BA, 2003.
- BEZERRA, M. A. **Determinação de metais traço em efluentes de refinaria, vegetais digeridos e em vinhos por espectrometria atômica, após préconcentração por extração no ponto nuvem e otimização multivariada**. 2006. Tese de Doutorado. UFBA, Salvador-BA, 2006.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, n. 76, p. 965-977, 2008.
- BRAMAN, R. S; JUSTEN, I. I; FOREBACK, C. C. Direct volatilization-spectral emission type detection system for nanogram amounts of arsenic and antimony, **Analytical Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2195-1972, 1972.
- BRANCH, C. H., HUTCHISON, D. Simultaneous determination of arsenic and selenium in geochemical samples by hydride evolution and atomic-absorption spectrometry - success and failure, **Analyst**, v. 110, p. 163-167, 1985.
- BRASIL. **Resolução ANVISA RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 09 de abril de 1965.
- BRASIL. Resolução ANVISA, Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 09 de abril de 1965.
- BREWER, P. W. R. G. Experimentals designs II. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 63, 1996.
- BRINDLE, I. D. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 735-741, 2007.
- BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESSE, L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, 2003.
- BULSKA, E; TSCHOPEL, P. Different sample introduction systems for the simultaneous determination of As, Sb and Se by microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 271, p. 171-181, 1993.
- BYE, R. Generation of selenium hydride from alkaline solutions: a new concept of the hydride generation-atomic absorption technique. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 156-158, 1989.
- CADORE, S; BACCAN, N. Continuous hydride generation system for the determination of trace amounts of bismuth in metallurgical materials by atomic absorption spectrometry using an on-line stripping-type generator/gas-liquid separator. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, p. 637, 1997.

CASTILHO, I. N. B. **Desenvolvimento de métodos para a determinação de selênio em solo por espectrometria de absorção atômica**. 2016. 84 f. Tese (doutorado em química). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Florianópolis, 2016.

CASTRO, A. G; FIORENTINI, E. F; WUILLOUD, R. G. Ionic liquid-assisted separation and determination of selenium species in food and beverage samples by liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1491, p. 117–125, 2017.

CAVALCANTE, D. D. **Estratégias analíticas para determinação de arsênio e selênio em amostras de alimentos empregando a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos**. Tese de Doutorado. UFBA, Salvador-BA, 2014.

CEUTA; BOEHS. Reproductive cycle of *Tagelus plebeius* (Mollusca: Bivalvia) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 569-576, 2012.

CHATTERIEE, A, BHATTACHARVA, B; DAS, R. Temporal and specific evaluation of selenium in organ of marine organisms of the east coast of India. **Science Direct**, v.5, p. 167-174, 2001.

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

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

D'ULIVO, A. et al. Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 6, p. 1283-1340, 2011.

D'ULIVO, A. Chemical vapor generation by tetrahydroborate (III) and other borane complexes in aqueous media. A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, n. 6, p. 793-825, 2004.

D'ULIVO, A. Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes: Towards the clarification of most controversial aspects. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 65, p. 360-375, 2010.

DEDINA, J., TSALEV, D. L. **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**, John Wiley, Chichester, 1995.

DEMING, S. N.; MORGAN, S. L. **Chemometrics: A textbook**. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1988.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. **Applied Statistics**, v 19, p. 231-239, 1970.

EZOE, K. et al. Automated determinations of selenium in thermal power plant wastewater by sequential hydride generation and chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 148, p. 609-616, 2016.

Ferreira et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, p. 179–186, 2007.

FERREIRA et al. **Contaminação por metais traço em mexilhões Perna da costa brasileira**. ISSN 0103-8478, 2012.

FERREIRA, S. L. C. et al. Application of Doehlert Matrix and Fatorial desings in optimization of experimental variables associated with Preconcentration and determination of Molybdenum in Sea-Water by Inductively coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, p. 1-7, 2002.

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

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador, Vento Leste, 1º Ed, 2015, 190p.

FILHO, E. R. P. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos, EduFSCAR, 2015, 88p.

FOOD AND NUTRITION BOARD USA. Institute of Medicine. **Dietary References Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids**. Washington: National Academy Press, 2000.

GALLIGNANI, M. et al. Sequential determination of Se (IV) and Se (VI) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry with HCl/HBr microwave aided pre-reduction of Se (VI) to Se (IV). **Talanta**, v. 52, v. 1015, 2000.

GALVÃO, C.N. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais**. 2011. Tese de Doutorado. UFBA, Salvador-BA, 2011.

GONÇALVES, D. A. **Desenvolvimento de métodos analíticos empregando à espectrometria de emissão óptica para avaliação dos níveis de contaminantes elementares em amostras de diversas origens**. Tese de doutorado, Unesp, Ilha Solteira – SP, 2016.

GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. L. Characteristics of a resonant

iris microwave-induced nitrogen plasma. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 5, p.1097-1104, 2016.

GRECO, A. S. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de selênio em castanhas do Cerrado por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos**. Dissertação de mestrado. UFG, Dourados- MG, 2016.

HOLAK, W. Gas-Sampling Technique for Arsenic Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, v. 41, p. 1712-1719, 1969.

HOLBEN, D. H; SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 836-843, 1990.

IEGLI, C. V. S.; BOHRER, D.; NOREMBERG, S.; DO NASCIMENTO, P. C.; DE CARVALHO, L. M.; VIEIRA, S. L.; REIS, R. N. Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 605-609, 2009.

JACQUES, K.A. Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (Eds) Science and Technology in the Feed Industry. 2001. Proceeding Nottingham University Press, p.319-348, 2001. JHCI - Joint Health Claims Initiative to the Food Standards Agency. Final Technical Report; p.36-47, 2003.

JANKOWSKI, J.; RESZKE, E. **Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry**. 1 ed. RSC Publishing, Cambridge, 2010.

JANKOWSKI, K. et al. Vertically positioned axially viewed aerosol cooled plasma - a new desing approach for microwave induced plasma optical spectrometry with solution nebulization. **Spectrochimica. Acta Part B**, v. 54, p. 515-525, 1999.

JIN, Q.; DUAN, Y.; OLIVARES, J. A. Development and investigation of microwave plasma techniques in analytical atomic spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 52, n.2, p. 131-161, 1997.

JUNIOR, A. G. **Determinação de selênio em água subterrânea utilizando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafita (GF AAS) e geração de hidretos (HG AAS)**. 2008. 115 f. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – UNESP, São Paulo, 2008.

KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements innitricacid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). **Talanta**, v. 135, p. 124-132, 2015.

KEHRIG, H.A.; SEIXAS, T.G.; MOREIRA, I.; MALM, O. 2006. Bioacumulação de metais pesados e metalóides por bivalvos. *In* : **Livro de resumos do III Encontro Nacional de Química Ambiental**, Cabo Frio, Rio de Janeiro. p. 112.

KLECKNER, A. E; KAKOUROS, E. A; STEWART, R. A practical method for the determination of total selenium in environmental samples using isotope dilution hydride generation inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 15, n. 4, p. 363-371, 2017.

KRIVAN, V. et al. Radiotracer error-diagnostic investigation of selenium determination by hydride-generation atomic absorption spectrometry involving treatment with hydrogen peroxide and hydrochloric acid. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 1703-1706, 1985.

KRUG, F. J. et al. **Guia prático de perguntas e respostas sobre ICP-OES, ICP-MS e preparo de amostras**. In: Curso em Análise Química, 2001. Plasma em química analítica e preparo de amostra. Sao Carlos: DQ/UFSCar, 2001.

KUMAR, A. Ramesh; RIYAZUDDIN, P. Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 166-176, 2010.

LAJUNEN, L. **Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission**. Royal Society of Chemistry, London, 1992.

LEE, D. K; CHOI, B. S. Effect of hydrochloric acid concentrations on the hydride generation efficiencies in ICP-AES. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 17, n. 10, p. 964-967, 1996.

LEMLY, A.D. Selenium Transport and Bioaccumulation in Aquatic Ecosystems: A proposal for Water Quality Criteria Based on Hydrological Units. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42, p.150-156, 1999.

Li, S. X.; ZHENG, F. Y.; CAI, S. J.; CAI, T. S. Determination of mercury and selenium in herbal medicines and hair by using a nanometer TiO₂- coated quartz tube atomizer and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of hazardous materials**, v. 189, n. 1, p. 609-613, 2011.

LI, W. et al. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. **Talanta**, v. 112, p. 43-48, 2013.

LIMA et al. Application of Factorial Design and Desirability Function to Develop a Single Analytical Procedure for the Determination of Metals in Different Tissues of Blue Crab (*Callinectes danae*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1-9, 2018.

LINSINGER, T. **Comparação do resultado de uma medição com o valor certificado. Instituto de Materiais e Medições de Referência (IRMM)**. Application Note1. Bélgica, v. 111, 2005.

LOBEL, et al. A Major Factor Contributing to the High Degree of Unexplained

Variability of Some Elements Concentrations in Biological Tissue: 27 Elements in 5 Organs of the Mussel *Mytilus* as a Mode. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 21, p. 118-125, 199.

LOPES, W, L. et al. Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1276-1282, 2009.

LOPES, W. L. **Determinação das concentrações biodisponíveis de arsênio e selênio em amostras de sedimentos por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma utilizando o CMA (Analisador Concomitantes de Metais) para geração de hidretos e para minimização de interferências**. Dissertação de mestrado. UFF, Niterói, 2006.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 42, n. 1, p. 3-40, 1998.

MACHADO et al, 2017. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 65, p. 4839-4842, 2017.

MAEDA, T.; WAGATSUMA, K.; Emission characteristics of high-powered microwave induced plasma optical emission spectrometry by using nitrogen–oxygen mixture gas. **Microchemical Journal**, v. 76, p. 53-60, 2004.

MARTINS et al. A dinâmica de metais-traço no solo. *Revista brasileira de agrociência*, v.17, n.3-4, p.383-391, 2011.

MARTINS et al. Compostos orgânicos e inorgânicos contendo selênio: revisão de métodos analíticos e perspectivas para análises químicas. **Química Nova**, v. 40, n. 10, p.1204-1214, 2017.

MASSART, D. L. et al. **Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A**. Elsevier Science Inc., 1997.

MASSART, D. L.; DIJKAstra, A.; KAUFMAN, L. **Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures, a survey of statistical and mathematical techniques**. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1978.

MATOS, R.P. **Determinação do teor total e biodisponível de selênio em diferentes classes de solos da região do Vale do Jequitinhonha-MG**. 2017. 104 f. Tese de Doutorado. UFMG, Minas Gerais, 2017.

MATUSIEWICZ, H.; KRAWCZYK, M. On-line hyphenation of hydride generation with in situ trapping flame atomic absorption spectrometry for arsenic and selenium determination. **Analytical sciences**, v. 22, n. 2, p. 249-253, 2006.

MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Method development for simultaneous multielement determination of hydride forming elements (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn) and Hg by microwave induced plasma-optical emission spectrometry using integrated continuous-microflow ultrasonic nebulizer-hydride generator sample introduction system. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 213-221, 2010.

MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Simultaneous determination of As, Bi, Sb, Se and Sn by microwave induced plasma spectrometry using a quadruple-mode microflow ultrasonic nebulizer for in situ hydride generation with internal standardization. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 70-78, 2017.

MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Simultaneous determination of hydride forming (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn) and Hg and non-hydride forming (Ca, Fe, Mg, Mn, Zn) elements in sonicate slurries of analytical samples by microwave induced plasma optical emission spectrometry with dual-mode sample introduction system. **Microchemical Journal**, v. 86, n. 1, p. 102-111, 2007.

MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Ultrasonic nebulization, multimode sample introduction system for simultaneous determination of hydride-forming, cold vapor, and non-hydride-forming elements by microwave-induced plasma spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v. 47, n. 6, p. 415-426, 2014.

MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES). **Microchemical journal**, v. 82, n. 1, p. 78-85, 2006.

MCLAUGHLIN, R. L. J.; BRINDLE, I. D. Multimode sample introduction system. U.S. Patent n. 6,891,605. 2005.

MENEGARIO, A. A.; GINÉ, M. F. Rapid sequential determination of arsenic and selenium in waters and plant digests by hydride generation inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 55, p.355, 2000.

MEUILLET, E.; STRATTON, S.; CHERUKURI, D. P.; GOULET, A.; KAGEY, J.; PORTERFIELD, B.; NELSON, M. A. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. *Journal of Cellular Biochemistry*, v, 91, p. 443-58, 2004.

MOLLO, A; FERREIRA, S. L. C.; MOISES, K. Sequential Injection Analysis in Selenium Determination by HG-AAS: Optimisation and Interference Study. **Current Analytical Chemistry**, v. 9, p. 296-304, 2013.

MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W. **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry**. 2 ed. Wiley-VCH, New York, 1992.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4 ed. New York: Wiley, 1996.

MORA, J. et al. Liquid-sample introduction in plasma spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 123-132, 2003.

MUNIZ-NAVEIRO et a. O. Selenium speciation in cow milk obtained after supplementation with different selenium forms to the cow feed using liquid chromatography coupled with hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1587-1593, 2007.

NÉRI, T.S. **Desenvolvimento de um método para determinação de Sb (III) e Sb total em amostras de interesse ambiental utilizando geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica com chama**. Dissertação de mestrado. 2014, 98 f. Dissertação de mestrado - Instituto de Química. Uberlândia, 2014.

NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, p. 2-14, 2007.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. ed.4. Porto Alegre: Bookman, 2010.

Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria, 4a ed. Editora Bookman. 2010. 414 p.

NIEDZIELSKI, P. et al. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP–OES) in 23 elements determination in geological samples. **Talanta**, v. 132, p. 591-599, 2015.

OKAMOTO, Y.; YASUDA, M.; MURAYAMA, S. High-power microwave-induced plasma source for trace element analysis. **Journal of Applied Physics Part 2**, v. 29, n. 4, 1990.

OLIVEIRA, E; MALAREN, J. W; BERMAN, S. S. Simultaneous determination of arsenic, antimony, and selenium in marine samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 55, n. 13, p. 2047-2050, 1983.

OZAKI, E. A. **Determinação simultânea de arsênio, selênio, bismuto, antimônio e estanho em aços e ligas de níquel por espectrometria de emissão com plasma de argônio induzido acoplado à geração de hidretos (ICP-HG)**. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo – USP, 1990.

Passari, L.M.G.Z.; Soares, P.K.; Bruns, R.E. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns, *Química Nova*, 34 (2011) 888-892.

PASSOS, A.S; NERI, T.S; MACIEL, M.V; ROMÃO, I.L.S; LEMOS, A.V. Determination of arsenic in chicken feed by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, p.1689-16955, 2012.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L; NAGATA, N. Why multivariate optimization?

Engenharia Sanitaria e Ambiental. v. 10, n. 2, p.106-110, 2005.

PERALTA-ZAMORA, P; MORAIS, J.L; NAGATA, N. Por que otimização multivariada. v.10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.

Pimentel, M.F.; Neto, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, 19 (1996) 268-277.

POHL, P.; JAMROZ, P. Recent achievements in chemical hydride generation inductively coupled and microwave induced plasmas with optical emission spectrometry detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 7, p. 1317-1337, 2011.

POLLOCK, E. N.; WEST, S. J.; At. **Absorption NewsI**, v. 11, n. 104, 1972.

RAYMAN, M. P. **The importance of selenium to human health**. *The Lancet*, v. 356, p. 233-241, 2000.

RIBEIRO, A. S; VIEIRA, M. A; CURTIUS, A. J. Determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in environmental reference materials as acid slurries by on-line hydride generation inductively coupled plasma spectrometry. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 59, n. 246, p. 243-253, 2004.

RIBEIRO, L. et al. Aplicação de SIG na visualização da contaminação por Selênio no Aquífero da região de Buena – Município de São Francisco do Itapoana/RJ. **Anais... XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, INPE, p. 3261-3267, 2005.

SANDE et al. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasi. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 190-196, 2010.

SANTOS, W. N. L.; CAVALCANTE, D.; MACEDO, S.M.; NOGUEIRA, J. S.; SILVA, E.G. P. Slurry Sampling and HG AFS for the Determination of Total Arsenic in Rice Samples. **Food Analytical Methods**, v. 1, p. 1-5, 2012.

SANTOS, W. N. L. et al. Evaluation of optimal conditions for determination of low selenium content in shellfish samples collected at Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil using HG-AFS. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 5027-5032, 2014.

SCHNEIDER, M. et al. A simple sample preparation procedure for the fast screening of selenium species in soil samples using alkaline extraction and hydride-generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 125, p. 50-55, 2016.

SCHRAMEL, P; XU, L.Q. Determination of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tin in biological and environmental samples by continuous flow hydride generation

ICP-AES without gas-liquid separator. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 340, n. 1, p. 41-47, 1991.

SCHRAUZER, G. N.; SACHER, J. Selenium in the maintenance and therapy of HIVinfected patients. **Chemico-Biological Interactions**, v. 91, p. 199-205, 1994.

SEIXAS et al. Distribuição de selênio em organismos da Baía de Guanabara/RJ. **Química Nova**, v. 30, n.º. 3, p. 554-559, 2007.

SEIXAS, T. G; KEHRIG, H. A. O selênio no meio ambiente. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 264-276, 2007.

SHALTOUT, A. A. et al. Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1350-1356, 2011.

SHRIVAS, K.; PATEL, D. K. Ultrasound assisted-hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of selenium in vegetable and fruit samples by using GF-AAS. **Food chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1673-1677, 2011.

ŚLACHCIŃSKI, M. Recent achievements in sample introduction systems for use in chemical vapor generation plasma optical emission and mass spectrometry: from macro-to microanalytics. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 49, n. 4, p. 271-321, 2014.

SOARES, J. et al. Simultaneous determination of As, Bi, Sb, Se, Sn and Te in lead alloy using flow injection-hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 37, p. 6805-6814, 2016.

STURGEON, R. E; MESTER, Z. Analytical applications of volatile metal derivatives. Aproximadamente 6.730.000 resultados (0,55 segundos) Resultados da pesquisa. **Applied Spectroscopy**, v.56, p 202, 2002.

TAKASE, I. et al. Geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, p. 1132-1144, 2002.

TAO, G.H.; STURGEON, R. E. Sample nebulization for minimization of transition metal interferences with selenium hydride generation ICP-AES. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 481-489, 1999.

Tarley et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58–67, 2009.

TARLEY, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical journal**, v. 92, n. 1, p. 58-67, 2009.

- TEMPLETON, D. M. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.
- TEODORO, M. S; SCHIAVO, D; ABREU, M. F. **Determinação de metais em solo por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas empregando extração com DTPA**. São Paulo, Agilent Technologies, 2013.
- THOMPSON, M. et al. Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tellurium in aqueous solution by introduction of the gaseous hydrides into an inductively coupled plasma source for emission spectrometry – Part I. Preliminary studies. **Analyst**, v. 103, n. 1227, p. 568579, 1978.
- TONG, W; YING, Z, JINYONG, X. Determination of trace selenium in high purity tellurium by hydride generation atomic fluorescence spectrometry after solid phase extraction of a diaminobenzidine-selenium chelate. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 123, p. 89-92, 2016.
- TSALEV, D. L. Hyphenated vapour generation atomic absorption spectrometric techniques. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 14, n. 2, p. 147-162, 1999.
- TYBURSKA, A. et al. Feasibility study of the determination of selenium, antimony and arsenic in drinking and mineral water by ICP-OES using a dual-flow ultrasonic nebulizer and direct hydride generation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2010.
- URE, T. A. M. et al. Terms related to chemical vapour generation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 14, p. 2021-2024, 1997.
- VALIRINHO, A.L; BACCAN, N. **Estudo dos parâmetros analíticos para a determinação de antimônio por AAS com geração de hidretos utilizando análise por injeção em fluxo**. Tese de doutorado. UNICAMP-SP, 2001.
- VIEIRA, M. A. **Estudos de geração de vapor para técnicas de espectrometria atômica para a determinação de elementos traço em materiais geológicos em suspensão e para a especiação de mercúrio em materiais biológicos**. 2007. 114 f. Tese de doutorado – Centro de Ciências Físicas e Matemática. Florianópolis, 2007.
- VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J. Geração química de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Revista analytica**, v. 3, n. 7, 2004.
- WACHOWICZ, B. ZBIKOWSKA, H.A; NOWAK, P. Selenium compounds in the environment: their effect on human health. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 6, n. 2, p. 375-381, 2001.

WAGEMANN, R. et al. Mercury species in the liver of ringed seals. **Science of the Total Environment**, v. 261, p. 21-32, 2000.

WANG, F.; ZHANG, G. Simultaneous quantitative analysis of arsenic, bismuth, selenium, and tellurium in soil samples using multi-channel hydride-generation atomic fluorescence spectrometry. **Applied spectroscopy**, v. 65, n. 3, p. 315-319, 2011.

WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. Optimization of sample preparation of carrot-fruit juice for determination of antimony, arsenic, and selenium by hydride generation-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Analytical Letters**, v. 47, n. 12, p. 2104-2119, 2014.

WELZ, B.; SPERLING M., **Atomic Absorption Spectrometry**, Wiley-VCH, ed. 3, p. 437-483, Weinheim, Germany, 1999.

YAN, Xiu-Ping; NI, Zhe-Ming. Vapour generation atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 291, n. 1-2, p. 89-105, 1994.

YOSHIDA, Y. **Analysis of aluminum in beverages using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer (MP-AES)**. Agilent Technologies, Hachioji-shi, Tokyo, 2013.

ZAPPELINI, A.I. **Desenvolvimento do método HG-ICP OES para determinação simultânea de arsênio e selênio**. 2014. 82 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

ZHANG, Ni et al. Simultaneous multi-channel hydride generation atomic fluorescence spectrometry determination of arsenic, bismuth, tellurium and selenium in tea leaves. **Food chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1185-1188, 2011.

ZHANG, Z.; WAGATSUMA, K. Matrix effects of easily ionizable elements and nitric acid in high-power microwave-induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 8, p. 1247-1257, 2002.