

Ivan Nikolai Barkow Castilho

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM SOLO POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Bernhard
Welz

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Castilho, Ivan Nikolai Barkow

Desenvolvimento de métodos para a determinação de selênio em solo por espectrometria de absorção atômica / Ivan Nikolai Barkow Castilho ; orientador, Bernhard Welz - Florianópolis, SC, 2016.

84 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Selênio. 3. Espectrometria de absorção atômica. 4. Solo. I. Welz, Bernhard. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Agradeço ao professor Dr. Bernhard Welz pela orientação neste trabalho, sempre auxiliando, quando foi preciso, com bom humor e dedicação.

Agradeço aos professores Andreas Marten e Irland B. Gonzaga Martens pelas amostras de solo fornecidas. Sem essas pessoas, o trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço a todos os membros da banca por terem aceito o convite de examinar este trabalho.

Devo também agradecimentos aos companheiros e amigos do laboratório CroMaas que proporcionaram um agradável ambiente de trabalho em todos esses anos.

Agradeço também ao professor Dr. Eduardo Carasek da Rocha por toda a ajuda que foi oferecida.

A todos meus amigos, que me acompanharam ao longo do curso, como também aos de outrora.

À CAPES, ao CNPq, à Analytik Jena e ao INCT de Energia e Meio Ambiente pelo auxílio e suporte financeiro.

À minha família: à minha mãe, sempre que precisei esteve do meu lado e sem ela não estaria aqui hoje. E à Caroline, minha namorada, que tornou minha vida infinitamente feliz.

Agradeço a Deus, por todas as preces atendidas.

.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Selênio.....	1
1.2. Espectrometria de absorção atômica (AAS).....	3
1.3. Análise direta de sólidos utilizando GF AAS.....	4
1.4. Preparo de amostras para HG-AAS.....	5
1.5. Determinação de Se via espectrometria de absorção atômica.....	7
1.6. Se em solo: conceitos gerais.....	9
1.7. Se em solo: determinação e análise de especiação.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivos gerais.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Parte 1: desenvolvimento de método para a determinação de Se via análise direta de sólidos e análise das amostras.....	16
3.1.1. Instrumentação.....	16
3.1.2. Reagentes.....	17
3.1.3. Preparação das amostras.....	19
3.2. Parte 2: determinação de Se em solo por HG-GF AAS e extração alcalina.....	20
3.2.1. Instrumentação.....	20
3.2.2. Reagentes.....	22
3.2.3. Preparação das amostras.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Parte 1: desenvolvimento de método para a determinação de Se com análise direta de sólidos.....	25
4.1.1. Curvas de pirólise e atomização.....	25
4.1.2. Correção de fundo.....	27
4.1.3. Parâmetros de mérito.....	29
4.1.4. Análises das amostras de solo e de CRM.....	30
4.1.5. Limites da técnica proposta.....	32

4.2.	Parte 2: determinação de Se em todas as amostras de solo disponíveis.....	34
4.3.	Parte 3: determinação de Se em solo por HG-GF AAS após extração alcalina.....	44
4.3.1.	Recobrimento do forno de grafite.....	44
4.3.2.	Temperaturas de aprisionamento e atomização.....	44
4.3.3.	Otimização da solução alcalina extratora.....	45
4.3.4.	Otimização da geração de hidreto.....	47
4.3.5.	Influência do tempo de repouso e com agitação.....	49
4.3.6.	Parâmetros de mérito.....	50
4.3.7.	Análises e fracionamento das amostras.....	51
5.	CONCLUSÕES.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotos do forno de grafite em um espectrômetro de absorção atômica com o sistema manual de injeção de amostra (Analytik Jena, Jena, Alemanha).....5
- Figura 2.** Foto do amostrador automático para espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Analytik Jena).....5
- Figura 3.** Visão geral das espécies de Se, caminhos e transformações em solo, água, atmosfera e suas interfaces. Fluxos bióticos e abióticos, assim como suas transformações, estão indicados com flechas correspondentes.....11
- Figura 4.** Diagramas de Eh/pH para o sistema Se-O-H. O presente diagrama foi obtido por uma concentração de Se 10^{-10} mol kg⁻¹ a uma pressão normal 10^5 Pa.....13
- Figura 5.** Estados onde ocorreram as coletas de amostras de solo.....19
- Figura 6.** Sistema de amostragem realizado nas áreas de coleta de amostras de solo e exemplos de profundidade.....20
- Figura 7.** Curvas de pirólise (símbolos preenchidos) e atomização (símbolos vazios) obtidas com HR-CS GF AAS para o padrão de Se 50 µg g⁻¹ em solução aquosa com os modificadores Ru (■, □), Zr (▲, Δ), Ir (●, ○), Pd (★, ☆) e Pd + Mg em solução (◀, ◁). Temperatura de atomização, $T_{at} = 2.100$ °C para a pirólise e temperatura de pirólise, $T_{pyr} = 1.400$ °C para a atomização, exceto para o Pd, $T_{pyr} = 900$ °C.....25
- Figura 8.** Curvas de pirólise e atomização obtidas por HR-CS GF AAS para o Se, em uma amostra sólida de solo S08, com os modificadores Ru (■, □) e Pd+Mg em solução (▲, Δ) com $T_{at} = 2.100$ °C para a pirólise e $T_{pir} = 1.400$ °C para a atomização.....26
- Figura 9.** Curvas de pirólise (■) e atomização (□) obtidas por HR-CS SS-GF AAS para o Se, na amostra de solo S08, usando Ru como

modificador permanente e também adicionando solução sobre a amostra sólida; $T_{at} = 2.100 \text{ }^\circ\text{C}$ para a pirólise e $T_{pir} = 1.400 \text{ }^\circ\text{C}$ para a atomização.....27

Figura 10. Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o Se em uma amostra de solo, utilizando modificador permanente Ru e também injetando-o em solução, nas vizinhanças da linha analítica em 196,026 nm, $T_{pir} = 1.400 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{at} = 2.100 \text{ }^\circ\text{C}$. Apenas a correção para eventos contínuos está aplicada.....28

Figura 11. Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o Se em uma amostra de solo, utilizando modificador permanente Ru e também injetando-o em solução, nas vizinhanças da linha analítica em 196,026 nm, $T_{pir} = 1.400 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{at} = 2.100 \text{ }^\circ\text{C}$. A correção para eventos contínuos está aplicada, assim como a LSBC com os espectros de NO e PO.....29

Figura 12. Mapa do Brasil com a indicação das regiões analisadas e as concentrações médias encontradas (valores absolutos) de Se em seus respectivos solos.....41

Figura 13. Gráficos com a média e o desvio padrão das análises de Se em cada nível de profundidade (A, B e C) das amostras de solo. Exceto AL, todos os outros estados apresentaram variação significativa nos valores.....43

Figura 14. Curvas de temperaturas de aprisionamento e atomização usando 0,2 μg de Se (solução de padrão aquoso) aplicadas a tubo de grafite recoberto com 200 μg de Ir como modificador permanente. Para o aprisionamento, $T_{atom} = 2.100 \text{ }^\circ\text{C}$; para a atomização, $T_{apri} = 300 \text{ }^\circ\text{C}$45

Figura 15. Curva de otimização para a extração alcalina de uma suspensão feita com 0,6 g do CRM MURST-ISS-A1 (cerca de 0,2 μg de Se) e 20 mL de solução extratora de NaOH; após 24 h de repouso em temperatura ambiente e 20 min em banho ultrassom.....46

Figura 16. Influência da concentração da solução redutora (NaBH_4) no sinal de Se usando uma suspensão de 0,3 g de CRM MURST-ISS-A1

(cerca de 0,2 µg de Se). Condições: 20 mL de 0,5 mol L⁻¹ de NaOH após 24 h de repouso em temperatura ambiente e 20 min de banho ultrassom. Concentração de NaOH 0,5% (m/v); HCl 3,0 mol L⁻¹47

Figura 17. Otimização da concentração de HCl para a determinação de Se em solo via suspensão usando 0,6 g de CRM MURST-ISS-A1 (cerca de 0,2 µg de Se). Condições: 20 mL de 0,5 mol L⁻¹ de NaOH após 24 h de repouso em temperatura ambiente e 20 min de banho ultrassom. Concentração de NaBH₄ / NaOH de 10 g L⁻¹ / 0,5 % (m/v).....48

Figura 18. Influência do repouso e da agitação na extração de Se comparado a banho de ultrassom; realizado com 0,6 g de CRM MURST-ISS-A1 (cerca de 0,2 µg de Se). Condições: 20 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Após 0, 6 e 24 h de repouso (●) ou com agitação (▲). Concentração para NaBH₄ / NaOH de 10 g L⁻¹ / 0,5 % m/v. Concentração de HCl de 3,0 mol L⁻¹49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa de temperatura para a determinação de Se nas amostras de solo; vazão de gás argônio $2,0 \text{ L min}^{-1}$ em todas as etapas exceto na atomização, durante a qual a vazão foi desligada.....	17
Tabela 2. Programa de temperatura utilizado para a deposição permanente do modificador rutênio na plataforma SS. Vazão de gás: $2,0 \text{ L min}^{-1}$ em todas as etapas.....	18
Tabela 3. Programa de temperatura do forno de grafite para a deposição do modificador permanente irídio no tubo de grafite. Vazão de gás: $2,0 \text{ L min}^{-1}$	21
Tabela 4. Programa de temperatura do forno de grafite para o sequestro do seleneto de hidrogênio e a atomização do Se. Vazão de gás de arraste: $0,3 \text{ L min}^{-1}$	22
Tabela 5. Condições para as amostras de solo em forno de micro-ondas TOPwave.....	23
Tabela 6. Parâmetros de mérito para a determinação de Se com HR-CS SS-GF AAS.....	30
Tabela 7. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$	32
Tabela 8. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$	35
Tabela 9. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$	36

- Tabela 10.** Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$37
- Tabela 11.** Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$38
- Tabela 12.** Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$39
- Tabela 13.** Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$40
- Tabela 14.** Parâmetros de mérito para a determinação de Se com HG-GF AAS.....50
- Tabela 15.** Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: Espectrometria de absorção atômica (atomic absorption spectrometry)

CCD: Dispositivo de carga acoplada (charge coupled device)

CRM: Material de referência certificado (certified reference material)

CV-AAS: Espectrometria de absorção atômica com vapor a frio (cold vapor atomic absorption spectrometry)

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (gas chromatography–mass spectrometry)

GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (graphite furnace atomic absorption spectrometry)

HG-AAS: Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (hydride generation atomic absorption spectrometry)

HG-GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e atomização em forno de grafite (hydride generation atomic absorption spectrometry with atomization in a graphite furnace)

HPLC-ICP-MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry)

HR-CS AAS: Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry)

HR-CS GF AAS: Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry)

HR-CS SS-GF AAS: Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite e análise direta de sólidos (high-resolution continuum source solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry)

ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma mass spectrometry)

LOD: Limite de detecção (limit of detection)

LOQ: Limite de quantificação (limit of quantification)

LS AAS: Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (line source atomic absorption spectrometry)

LS GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha e forno de grafite (line-source graphite furnace atomic absorption spectrometry)

RSD: Desvio padrão relativo (relative standard deviation)

SS: análise direta de amostras sólidas (solid sampling)

SS GF AAS: espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise direta de sólidos (solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry)

T_{pir}: Temperatura de pirólise

T_{at}: Temperatura de atomização

RESUMO

A primeira parte deste trabalho descreve o desenvolvimento de método para a determinação de Se em amostras de solo usando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite e análise direta de sólidos. A linha de absorção mais sensível em 196,026 nm foi usada para todas as determinações. Rutênio, além de ser depositado na plataforma como modificador permanente, também foi adicionado em solução em cada amostra sólida. Todas as amostras sólidas mostraram um fundo estruturado causado pelas moléculas de NO e PO. Espectros de referência dessas moléculas foram gravados usando ácido nítrico e fosfórico, respectivamente, que em seguida foram utilizados para a correção de fundo por mínimos quadrados. Os limites de detecção e quantificação foram $30 \text{ ng g}^{-1} \text{ Se}$ e $100 \text{ ng g}^{-1} \text{ Se}$, respectivamente. As amostras de solo foram coletadas em áreas rurais experimentais não-tratadas (sem a adição de fertilizantes) a fim de obter valores representativos da distribuição natural de Se. Regiões apropriadas para amostragem foram selecionadas em 12 dos 27 Estados brasileiros, cobrindo 61% da área total do país. Os resultados dos materiais de referência certificados MURST-ISS-A1, MESS-3 e PACS-2 (todos de sedimentos marinhos) confirmaram a exatidão do método proposto. O Se encontrado nas amostras variou entre $130 \pm 10 \text{ ng g}^{-1}$ e $630 \pm 15 \text{ ng g}^{-1}$. A repetitividade das medidas foi entre 3 e 10% ($n = 5$).

Uma segunda parte deste trabalho apresenta valores de Se em todas as amostras de solo que foram coletadas na amostragem de 12 dos 27 Estados brasileiros. A campanha se baseou em áreas rurais experimentais não-tratadas, com 10 pontos de coleta em cada área, cada um deles dividido em três níveis de profundidade. O Se encontrado nas amostras variou entre $0,1 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e $19,0 \pm 3,0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. A repetitividade das medidas foi entre 3 e 10% ($n = 3$). O valor de Se diminuiu conforme a profundidade das amostras coletadas.

Finalmente, a terceira parte deste trabalho é a proposta de um simples procedimento para a determinação de espécies de Se em amostras de solo usando extração alcalina com banho de ultrassom e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, conhecida por ser uma determinação específica de apenas Se(IV). O hidreto foi aprisionado e atomizado em um tubo de forno de grafite recoberto por irídio como modificador químico permanente. Os limites de detecção e

quantificação para o método desenvolvido foram de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV), respectivamente. O conteúdo total de Se nas amostras com extração alcalina foi determinado aplicando o método desenvolvido anteriormente com a espectrometria de absorção atômica de alta resolução e com fonte contínua. O conteúdo de Se(VI) foi calculado pela diferença entre o Se total e Se(IV). A eficiência de extração foi verificada comparando os resultados obtidos pela extração alcalina e por análise direta de sólidos. A exatidão do método para Se total foi verificada usando tanto digestão ácida por micro-ondas, quanto análise direta de sólidos, em um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com os materiais certificados de referência MURST-ISS-A1 e BCR 142R, assim como as amostras de solo de diferentes regiões do Brasil.

ABSTRACT

The first part of this work presents a method developed for the determination of Se in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. The most sensitive absorption line at 196.026 nm has been used for all determinations. Ruthenium, apart from being deposited on the platform as permanent modifier, was also added in solution on top of each solid sample. All soil samples exhibited a fine structured background caused primarily by the NO and PO molecules. Reference spectra of these molecules were recorded using nitric and phosphoric acid, respectively, which were used for least squares background correction. The limits of detection and quantification were 30 ng g^{-1} and 100 ng g^{-1} Se, respectively. Soil samples were collected from untreated experimental farming areas (without addition of fertilizers) in order to obtain representative values of natural Se distribution. Appropriate areas for sampling were selected in 12 of the 27 Brazilian States, covering 61% of the total area of the country. The results of the Certified Reference Materials MURST-ISS-A1, MESS-3 and PACS-2 Marine Sediments confirmed the validity of the proposed method. The Se content found in the soil samples varied between $130 \pm 10 \text{ ng g}^{-1}$ and $630 \pm 15 \text{ ng g}^{-1}$. The repeatability of the measurements was between 3% and 10% ($n = 5$).

The second part of this work shows values of Se on all soil samples that were available from the collecting campaign in 12 Brazilian States. The campaign was based on untreated experimental farming areas, 10 sampling points on each area, where each point was divided on three different levels of depth. The Se content found in the soil samples varied between $0.1 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ and $19.0 \pm 3.0 \mu\text{g g}^{-1}$. The repeatability of the measurements was between 3% and 10% ($n = 3$). The Se content was lower for samples collected from deeper levels.

Finally, the third part of this work is the proposal of a simple procedure for the determination of Se species in soil samples using an ultrasound-assisted alkaline extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry, which is known to be specific for the determination of Se(IV) only. The hydride was trapped and atomized in a graphite tube furnace coated with iridium as a permanent chemical modifier. The limits of detection and quantification for the developed method were $6 \mu\text{g L}^{-1}$ and $20 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV), respectively. The total Se

content in the samples was determined in the alkaline extract using the same method developed previously with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, and the content of Se(VI) was determined by difference between the total Se and the content of Se(IV). The extraction efficiency was verified by comparing the results obtained by the alkaline extraction and by direct solid sample analysis. The accuracy of the method for total Se determination was ascertained using microwave-assisted acid digestion, as well direct solid sample analysis of the certified reference materials MURST-ISS-A1 and BCR 142R, and soil samples from different regions of Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Selênio

Em 1817, ao pesquisar o sedimento de câmaras de chumbo em uma fábrica de ácido sulfúrico em Gripsholm, Suécia, uma coloração marrom-avermelhada inusitada nessa lama chamou a atenção de Jöns Jakob Berzelius (o 'pai da química sueca'), levando-o à descoberta de um elemento que ele denominou de selênio. Esse elemento foi considerado à época - e por mais de um século - como sendo tóxico [1]. Cento e quarenta anos se passaram entre a descoberta do Se e o seu reconhecimento como essencial para as funções celulares na maior parte dos mamíferos, com a publicação de Schwarz e Foltz [2] em 1957, na qual aventaram a hipótese de o selênio ser um elemento essencial. Outra etapa importante para essa mudança de paradigma ocorreu em 1975, depois da descoberta chinesa da ação do Se para curar a doença de Keshan, uma cardiopatia infantil. Essa enfermidade estava relacionada à deficiência de Se na alimentação em decorrência da falta desse elemento no solo daquela região na China [3].

Selênio é um elemento pertencente ao grupo 16, o mesmo grupo do enxofre, possuindo comportamento semelhante a esse. De modo similar ao enxofre, o Se pode ser encontrado em quatro estados de oxidação: selenetos Se (-II), selênio elementar Se (0), selenito Se (IV) e selenato Se (VI). É um elemento que ocorre de forma ubiqüitária. Na natureza inanimada e em processos industriais, especialmente os compostos inorgânicos desempenham uma função; já na natureza animada, os compostos orgânicos têm a dominância. Em plantas, Se ocorre principalmente em forma de selenometionina; os animais, por sua vez, formam selenocisteína, o componente catalítico específico das enzimas dependentes de Se. São essas as principais formas orgânicas do Se em solo e plantas [4].

Em locais redutores, como, por exemplo, em solos e sedimentos, pode ocorrer a formação de complexos metálicos de seleneto, sendo estes altamente imóveis. Em ambientes suavemente oxidantes, como em alguns solos e em partículas de ar, o Se pode ser encontrado na forma de selenito. Já em ambientes mais oxidantes, o selenato é a espécie mais presente, com alta mobilidade em solos, e biodisponível para as plantas. Em condições neutras para ácidas, o Se pode ser encontrado na forma elementar, já que é facilmente reduzido a Se0 pelo ácido ascórbico ou pelo dióxido de enxofre, em ambientes onde houve acidificação via microorganismos [5].

Paralelamente ao conteúdo total de Se em fontes alimentícias, é importante ter-se conhecimento de sua forma química, ou seja, de sua especiação, pois essa afeta a biodisponibilidade e os valores nutricionais de Se. As várias formas químicas de Se exibem diferentes propriedades em relação à sorção, mobilidade e toxicidade [6-9].

O Se, embora faça parte dos elementos essenciais, apresenta a menor variação entre deficiência e toxicidade dentre todos eles. Portanto, o conhecimento sobre sua distribuição natural é uma pré-condição fundamental na tentativa de evitar danos à saúde humana e de animais e para desenvolver uma prevenção apropriada [10]. Podendo ser encontrado no solo e em rochas, o Se acaba por se acumular nas plantas, forma pela qual é introduzido na cadeia alimentar. Presente na maioria dos alimentos, podemos encontrar boas fontes desse elemento em frutos secos (especialmente na castanha do Pará), peixes, mariscos, vísceras (rins ou fígado) e nas carnes. Os cereais, verduras e outros alimentos vegetais também contêm Se; contudo, o seu teor varia de acordo com o tipo de solo a partir do qual se desenvolvem [11].

Em vários países, mapas de Se estão disponíveis e foram reunidos em um “Selenium World Atlas” [12]. Infelizmente, esse atlas contém poucos dados sobre a América do Sul e nenhum a respeito do Brasil. Em 2001/2002, iniciou-se um projeto a fim de coletar amostras de solos, plantas e carnes em 12 Estados brasileiros, desde o Amazonas e Pará até o Rio Grande do Sul [13]. Apesar de a campanha de amostragem ter sido um sucesso, a determinação final de Se nas amostras coletadas mostrou-se extremamente difícil (via espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, HG AAS) ou de alto custo (via espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS). Todavia, as amostras da campanha ainda estão disponíveis e algumas delas já foram usadas para auxiliar no desenvolvimento de um método confiável [14] para a determinação total de Se. Porém, o método, ainda que confiável, é demorado, pois usa uma digestão ácida em forno de micro-ondas, uma redução de Se(VI) para Se(IV), geração de SeH_2 coletado em um tubo de grafite antes de atomização eletrotérmica. Uma determinação em triplicata é lenta - e, como existiam centenas de amostras a serem analisadas, não seria adequado para os fins desta investigação, porém pode ser utilizado como método comparativo.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento rotineiro rápido, preciso, sensível e robusto para a

determinação de Se em uma quantidade significativa de amostras de solos e sedimentos, que possa ser usado para estabelecer o nível total de Se nas amostras representativas por todo o Brasil. A espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF AAS) foi a técnica escolhida para a determinação final devido à sua alta sensibilidade, rapidez, sua tolerância a matrizes complexas, sua robustez, sua fácil operação e porque essa técnica está disponível em vários laboratórios de rotina.

1.2. Espectrometria de absorção atômica (AAS)

A técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) parte do princípio de que átomos livres no estado gasoso, gerados em um atomizador, são capazes de absorver radiação de frequência específica para o analito. Com isso, a quantificação do analito se torna possível na amostra. A AAS é largamente difundida e empregada para a determinação de elementos traço nas mais diversas amostras [15]. Os instrumentos de AAS consistem em uma fonte de radiação, um atomizador, um seletor de comprimento de onda (monocromador), um detector e um processador de sinais.

A técnica adotada neste trabalho é a GF AAS. Durante a análise, quatro etapas de aquecimento são seguidas: secagem, pirólise, atomização e limpeza, cada qual com o seu tempo e temperatura. Uma otimização do programa de temperatura pode ser feita com curvas de pirólise e atomização [16].

Em 1989, Gary M. Hieftje [17] escreveu um artigo provocativo que dizia que "claramente, para a AAS se manter viável devido à forte competição de técnicas alternativas, será necessário uma nova instrumentação ou abordagem". O primeiro instrumento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), cuja configuração é a mais próxima da atualmente utilizada, foi descrito em 1996 por Heitmann *et al.* [18].

O equipamento de HR-CS AAS consiste em uma lâmpada de arco curto de xenônio que serve como fonte de radiação contínua para o comprimento de onda entre 185 e 900 nm, espelhos elipsoidais, atomizador (chama ou forno de grafite), um monocromador duplo de alta resolução composto por um prisma Littrow e uma rede echelle e um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) [19].

Dentre as diversas vantagens da HR-CS AAS está a correção do fundo. Além da correção automática via software para todos os eventos que são contínuos em relação à faixa espectral observada (200 pixels do detector), também se pode efetuar a correção através de uma subtração de um espectro de referência, ao remover do espectro da medida apenas o espectro do fundo. Nesse último caso, o qual é realizado através de um algoritmo de mínimos quadrados, é possível corrigir o chamado fundo estruturado (causado por moléculas diatômicas), como NO e PO [19].

1.3. Análise direta de sólidos utilizando GF AAS

Uma das grandes vantagens da GF AAS é a possibilidade de trabalhar com amostras sólidas e, conseqüentemente, diminuir ao mínimo a etapa de preparo de amostra – uma etapa crítica em qualquer análise. Para tanto, a amostra deve ser moída ou macerada e inserida de forma manual ou automática no forno de grafite [20]. Essa alternativa se torna atraente ao se trabalhar com amostras de difícil solução, como solo, carvão e outras.

Há diversas vantagens, tais como: (i) minimizar a manipulação da amostra (dispensando inclusive equipamentos como micro-ondas); (ii) obtenção rápida de resultados; (iii) uso de pequena quantidade de amostra; (iv) evitar uso de reagentes tóxicos e/ou corrosivos; (v) diminuição de contaminação e (vi) por não ter diluição, há um provável aumento na detecção da técnica. Porém, há desvantagens, tais como: (i) dificuldade de manuseio e conseqüente introdução de amostra no atomizador (requer o uso de acessórios manuais ou automáticos, ilustrados nas Figuras 1 e 2); (ii) eventual dificuldade de calibração do método (pode ser realizada com padrão aquoso, porém há casos que necessitam de material de referência certificado) e (iii) não homogeneidade das amostras, resultando em um desvio padrão relativo (RSD) alto (acima de 20%) [20].



Figura 1. Fotos do forno de grafite em um espectrômetro de absorção atômica com o sistema manual de introdução de amostra sólida (Analytik Jena, Jena, Alemanha).



Figura 2. Foto do amostrador automático para espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Analytik Jena).

Quando utilizada em conjunto com a HR-CS AAS, a técnica de análise direta de sólidos apresenta menor risco de interferências espectrais que possam impedir a realização da análise. Isso ocorre devido à eficácia apresentada pela correção de fundo da HR-CS AAS.

1.4. Preparo de amostras para HG AAS

O preparo da amostra para posterior análise é um fator determinante para o método a ser desenvolvido. Para determinações em

instrumentos que trabalham apenas com amostras aquosas, a digestão em forno de micro-ondas é um dos meios mais utilizados. Em matrizes complexas, a digestão da amostra pode eliminar interferências na análise, além de permitir a inserção da amostra nos casos em quais a suspensão ou a amostragem sólida não podem ser aplicadas. Quando feita a digestão ácida em frascos abertos, elementos voláteis como As, Hg e Se podem ser perdidos durante o processo [21].

Os resultados obtidos pela técnica de HG AAS são dependentes da espécie de Se. Considerando que a digestão em forno de micro-ondas permite a conversão completa de Se para a forma inorgânica [14], ela se torna o método mais adequado de preparo de amostra. Ela também permite o uso de geração de hidretos em fluxo, que é muito mais rápido e tem mais flexibilidade no volume de amostra aplicada quando comparada com o sistema em batelada. Contudo, a digestão, tanto aberta quanto em forno de micro-ondas, utiliza grandes quantidades de ácidos. Há casos em que até mesmo HF, ácido de difícil manuseio e alta toxicidade, é sugerido para a digestão de matrizes ricas em silicato.

O preparo de amostras em extração é amplamente empregado junto à geração química de vapor, sendo utilizado integralmente ou centrifugado e usado apenas o sobrenadante, dependendo do grau de extração do analito para a fase aquosa. Embora o método mais usual para o preparo de amostras contendo Se ainda seja a digestão em micro-ondas, é bem estabelecido o emprego de água régia para a extração do Se da matriz para o meio aquoso [22], sendo o HCl um ácido redutor que, associado ao aquecimento, é capaz de converter todo o Se (VI) a Se(IV), única espécie a gerar hidretos [23].

O uso de suspensões como método de preparo de amostras facilita o preparo e a execução das análises. Isso não exige aparelhos especiais, não há perigo de perdas de analito devido ao calor como numa digestão ácida ou numa fusão alcalina, e a contaminação da amostra é minimizada. Para o sistema em batelada do HG AAS ainda é possível utilizar suspensões em grânulos de diâmetros maiores que no sistema em fluxo; para esse último, devem-se usar grânulos mínimos a fim de evitar o entupimento dos capilares, o que pode se tornar uma limitação da técnica. Haswell *et al.* [24] reportaram pela primeira vez o uso da técnica de suspensão em determinações por HG AAS e, desde então, essa técnica se consolidou.

O Se forma complexos por mecanismos de esfera externa (ligações eletrostáticas) e o pH alcalino afeta essas ligações, facilitando

a extração [25]. Alguns trabalhos sugerem o uso de meio básico para a extração. O uso de bases moderadas como NaOH em concentrações baixas, além de economicamente viável, é menos poluente, mais seguro e não exige um descarte especial, já que pode ser facilmente neutralizado sem gerar sais tóxicos.

1.5. Determinação de Se via espectrometria de absorção atômica

Existem diversos trabalhos sobre determinação de Se nas mais diferentes matrizes. Esses trabalhos exploram as mais variadas técnicas, atingindo limites de detecção em níveis de ultra-traço. Técnicas cromatográficas também podem ser empregadas para a determinação de Se. Wang *et al.* [26] desenvolveram um método de determinação de selenometionina e metilselenocisteína em amostras de chá verde por cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência. A técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) também pode ser utilizada para a determinação de Se. Guo *et al.* [27] determinaram Se em amostras biológicas utilizando uma mistura de gás metano e argônio no plasma, que reduz consideravelmente os interferentes.

Dadfarnia *et al.* [28] utilizaram espectrofotometria indireta para determinação de Se, usando iodo, o qual, ao ser reduzido pelo Se (IV), forma o íon I^{3-} , que é pré-concentrado em fase orgânica por microextração direta líquido-líquido, extraído e analisado via espectrofotometria. Limites de detecção na faixa dos $16 \mu\text{g L}^{-1}$ foram encontrados para essa técnica. Tyburska e Jankowski [29] utilizaram ICP OES para determinar via microextração em fase sólida os hidretos de Se gerados após tratamento alcalino das amostras de suplementos alimentares. Trabalhos com Se também estão bem estabelecidos via absorção atômica. A agência americana de proteção ambiental utiliza um método de GF AAS para determinar níveis-traço de Se em água potável [30].

Por causa da baixa concentração de Se em amostras biológicas e de solo e devido à matriz habitualmente complexa, é necessário aplicar uma técnica analítica sensível e seletiva para sua determinação. A GF AAS e a HG AAS são seguidamente usadas para esse propósito. Apesar de a resposta da HG AAS ser fortemente dependente da espécie de Se presente, a GF AAS é adequada para a determinação de ambos os compostos de Se, orgânico e inorgânico [31]. Mesmo assim, a

determinação exata de Se em materiais biológicos e no solo ainda é um grande desafio [32, 33]. Em HG AAS, a mineralização incompleta de compostos orgânicos refratários de Se, como a selenometionina, é um dos maiores problemas.

A combinação de geração de hidretos com aprisionamento de hidreto e atomização em forno de grafite (HG-GF AAS) parece ser a solução ideal para a determinação de Se. Shuttler *et al.* [34] propuseram o uso de Ir como um modificador permanente para o aprisionamento de Se e outros elementos formadores de hidretos no tubo de grafite, uma prática que foi posteriormente adotada com sucesso por outros [35-37]. O Ir aplicado como um modificador permanente é uma alternativa, pois os tubos podem ser reutilizados centenas de vezes sem realizar o recobrimento novamente. O uso de Ir também melhora significativamente a sensibilidade do método e a eficiência da deposição de hidreto em comparação àqueles métodos obtidos por outros tipos de modificadores [38].

Entretanto, a primeira etapa dessa técnica combinada de HG-GF AAS é a geração química de hidretos. No caso de Se é indispensável que esteja presente em sua forma inorgânica, estado de oxidação Se(IV), ou seja, selenita. Isso significa que qualquer composto orgânico de Se precisa ser completamente mineralizado, o que pode necessitar condições extremas [39], e todo Se(VI) deve ser reduzido a Se(IV) antes da geração de hidreto. Diferentes métodos de oxidação foram sugeridos para converter totalmente o Se orgânico nos materiais biológicos para o Se inorgânico. A digestão com ácido nítrico, sulfúrico e perclórico na temperatura máxima de 310 °C sob refluxo gera recuperação de 97 a 104% [39, 40]. A comparação de diversos métodos de digestão para a determinação de Se em amostras biológicas mostraram que somente a mistura de $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ ou $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ geram a completa recuperação de Se [39]. A digestão por forno de micro-ondas com uma mistura de $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, seguida de irradiação UV, conseguiu, com sucesso, recuperar o conteúdo total de Se em amostras de peixes [41], mas falhou para amostras de moluscos. Após a digestão, aquecer a solução com 5 ou 6 mol L⁻¹ de ácido clorídrico sob refluxo por 15 a 30 min foi o suficiente para reduzir todo o Se hexavalente para tetravalente [40-43].

Sturgeon e Grinberg [44] mostram em um artigo a proposta de trabalhar com geração fotoquímica de vapor, inclusive para Se(IV). No caso, Se reage com um ácido orgânico gerando radicais ligados ao Se e,

em seguida, pode ser determinado por técnicas como CV-AAS ou GC-MS.

Além disso, há três linhas do Fe em 195,950 nm, 196,061 nm e 196,147 nm, que podem causar interferência espectral na linha mais sensível do Se em 196,026 nm quando a AAS convencional com fonte de linha (LS AAS) é utilizada [19]. Nessa região ainda se observa bandas de absorção molecular de NO e de PO com estrutura fina, que podem causar interferência espectral devido à correção com valores inferiores ou superiores ao verdadeiro em LS GF AAS [19]. Houve estudos que tentaram minimizar esses efeitos [45] usando molibdato de amônio, mas com o advento da HR-CS AAS, esse tipo de interferência pode ser eliminado.

Becker-Ross *et al.* [46] fizeram parte dos pioneiros na determinação de Se por HR-CS AAS. Na ocasião, usando o equipamento protótipo da técnica, foi determinado Se (assim como As) em urina humana. Como previsto, bandas de NO e PO apareceram nas medidas realizadas e foram corrigidas pelo algoritmo de mínimos quadrados. Os espectros de referência de PO e NO foram criados a partir de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, respectivamente.

Apesar de todos esses desafios, há um número relativamente grande de publicações sobre a determinação de Se em diferentes matrizes. A maioria dos casos utiliza uma amostra digerida, seja ela carne bovina [47], tecido biológico [48] ou até mesmo o próprio solo [14]. Mas há outros trabalhos que utilizam a amostra diretamente, como sangue [49, 50].

1.6. Se em solo: conceitos gerais

De forma geral, Se em solos possui origem tanto de fontes locais quanto regionais. Fontes locais seriam rochas (fontes geogênicas) das quais Se pode se mover através do intemperismo e da lixiviação, além das fontes antropogênicas, como fertilizantes. Fontes que adicionam Se aos solos em distâncias de médio a longo alcance incluem deposição atmosférica tanto de forma seca quanto úmida, derivada de ações antropogênicas (queima de combustíveis fósseis, fundições de metais, emissões de navios, entre outros) e fontes naturais (como a atividade vulcânica) [51].

A estratégia de biofortificação de Se em alimentos cultivados é praticada em regiões deficientes de Se adicionando aos solos fertilizantes que contêm Se inorgânico. Isso ocorre na Finlândia [52,

53], no Reino Unido [54, 55] e na Nova Zelândia [56]. Já nos EUA, por exemplo, há adição de Se orgânico ao solo [57]. Apesar de a deficiência de Se ocorrer com frequência, alguns solos, depósitos de minerais e águas são naturalmente ricos em Se. A exploração desses recursos na prática da agricultura pode levar a um acúmulo de Se em tecidos vegetais. Bañuelos [58] observou o aumento de acumulação de Se em brócolis e canola irrigados com água contendo altos níveis naturais de Se. Além disso, Bañuelos e Freeman [59] demonstraram que vegetais enriquecidos com Se acumularam cerca de 3 a 9 mg kg⁻¹ de Se quando cultivados em solos que possuem um alto nível do elemento. Dessa forma, usar solos naturalmente ricos em Se para cultivo pode ser uma estratégia viável e de baixo custo para a biofortificação natural. Vale ressaltar que neste trabalho foram estudadas amostras com abundância natural de Se.

O fator determinante da biodisponibilidade de Se é a especiação [60]. Apesar de a possibilidade de Se estar presente em suas formas inorgânicas no solo e nos alimentos cultivados, a forma predominante de Se é geralmente orgânica como selenometionina (SeMet) [61], metilselenocisteína (MeSeCys) [57, 62, 63] e γ -glutamil-Se-selenometil-selenocisteína (γ -Glu-MeSeCys) [62, 63].

Nas últimas décadas, processos químicos que afetam a mobilidade de Se foram muito bem caracterizados [64]. No ambiente, Se pode existir em diferentes estados de oxidação (-II, -I, 0, IV e VI) e, de forma geral, a solubilidade de Se, e consequentemente sua mobilidade, aumenta conforme o seu potencial redox (ou seja, em condições oxidantes). O Se orgânico em solo pode estar presente em forma de complexos com material orgânico e incorporado em colóides orgânicos ou organo-minerais [64-67], como ilustrado na Figura 3.

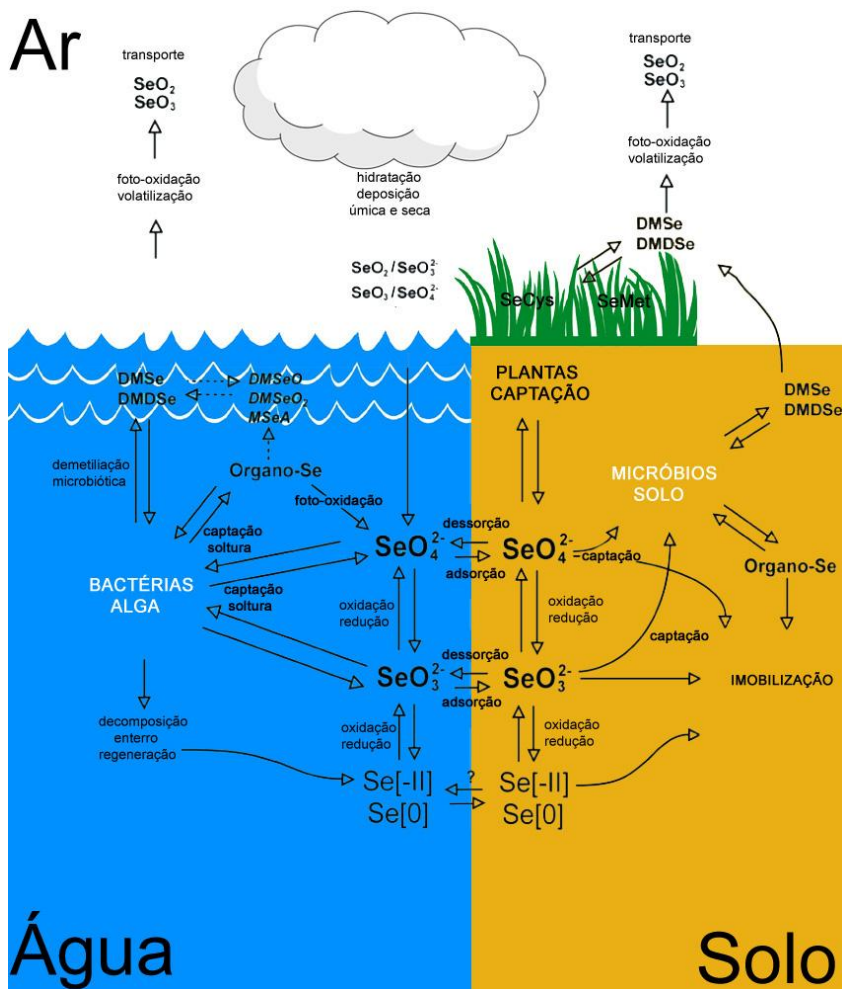


Figura 3. Visão geral das espécies de Se, caminhos e transformações em solo, água, atmosfera e suas interfaces. Fluxos bióticos e abióticos, assim como suas transformações, estão indicados com flechas correspondentes (adaptado de [51]).

Baseado nas constantes de dissociação de ácido (pKa), o ácido selenioso (H_2SeO_3) e o ácido selênico (H_2SeO_4) são aniônicos sob condições ambientais comuns [68], em forma de selenito e selenato. Se em estado de oxidação (-II), existe como seleneto de hidrogênio gasoso,

por exemplo. Vários estudos reportam que as bactérias presentes no solo podem formar $\text{Se}(0)$ em tamanho nano a partir de selenato e selenito [69-73], mas não se sabe a importância disso nos ambientes naturais. Além disso, formas orgânicas voláteis de Se, como dimetil seleneto (DMSe) e dimetil diseleneto (DMDSe) podem estar presentes nos solos [74].

Devido à forma aniônica do Se, forças eletrostáticas predominam nas interações no solo [68]. A mobilidade e a biodisponibilidade de Se inorgânico no ambiente são maiores com o aumento do pH, assim como a diminuição de terra e óxido de ferro no solo [75]. Material orgânico de solo é conhecido por influenciar a retenção de Se nos solos [76]; entretanto, os mecanismos das interações entre ambos são praticamente desconhecidos. Há três hipóteses que explicam a retenção: (i) a matéria orgânica possui sítios de sorção, o que facilita a complexação direta com Se [76-78]; (ii) complexação indireta com complexos metálicos com material orgânico [76, 79]; ou (iii) redução microbiótica e incorporação em aminoácidos, proteínas e matéria orgânica natural [80, 81]. Dependendo do tipo de ligação, Se pode ser facilmente mobilizado (através do ajuste de pH, por exemplo) ou imobilizado (incorporação covalente ao material orgânico) [51].

O diagrama de Pourbaix, proposto pelo químico russo Marcel Pourbaix, também conhecido como diagrama potencial/pH ou Eh/pH, é uma representação gráfica das possíveis fases de equilíbrio estáveis de um sistema eletroquímico. As linhas representam as fronteiras entre as áreas de estabilidade das várias espécies iônicas de um determinado elemento, tal como deduzido a partir da equação de Nernst [82]. Partindo dos dados que a Figura 4 ilustra com o diagrama para o Se, $\text{Se}(\text{VI})$ é a espécie de maior presença em um ambiente com pH básico, $\text{Se}(\text{IV})$ com um pH neutro e $\text{Se}(-\text{II})$ com um pH ácido.

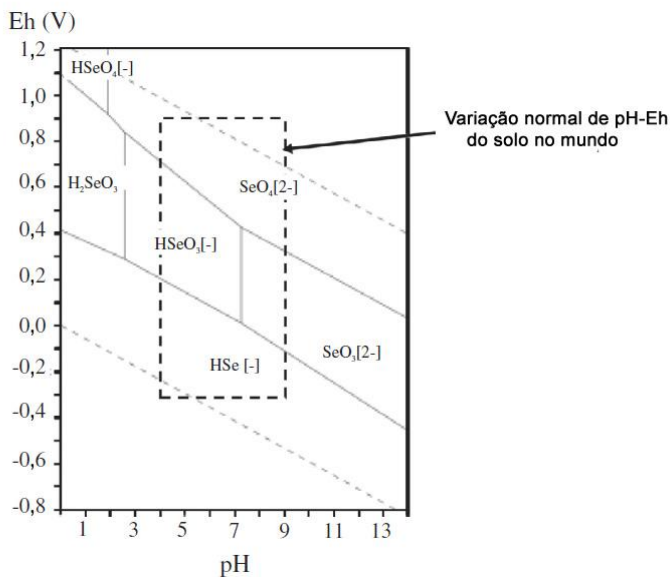


Figura 4. Diagramas de Eh/pH para o sistema Se-O-H. O presente diagrama foi obtido por uma concentração de Se 10^{-10} mol kg^{-1} a uma pressão normal 105 Pa (adaptado de [82]).

1.7. Se em solo: determinação e análise de especiação

De forma geral, Se em solo é determinado com técnicas que requerem um preparo de amostra. Supriatin *et al.* [83] extraíram, determinaram e realizaram a análise de especiação de Se em solos dos Países Baixos efetuando a extração via oxidação com NaOCl para o Se orgânico e com oxalato de amônio para o Se inorgânico. Para fazer a determinação do Se inorgânico, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) foi empregada e para o total, foi utilizado um balanço de massas. Tolu *et al.* [84] também usaram HPLC-ICP-MS para executar a análise de especiação. ICP-MS pode ser acoplada a outras técnicas para os mesmos fins, como a cromatografia líquida [85]

Já Ghasemi *et al.* [86] desenvolveram um método para a análise de especiação e pré-concentração que usa uma microextração em fase líquida com fibras ocas antes de inserir a amostra em um forno de grafite (GF AAS) e posterior determinação. Saygi *et al.* [87] também usaram GF AAS, porém realizaram a extração em fase sólida. Há inúmeros outros trabalhos com técnicas distintas, como eletroforese capilar com detecção UV [88], voltametria [89] e fluorimetria [90].

Todos esses métodos citados possuem bons valores de limites de detecção e quantificação. No entanto, existem desvantagens. A primeira delas é o tempo para as análises. Além de requerer um preparo, a amostra deve passar por dois sistemas distintos a fim de realizar a determinação e análise de especiação. Nesses casos, apesar de a técnica de ICP-MS ser rápida, a cromatografia torna-se a etapa lenta do processo. Outro ponto negativo é o custo. O equipamento de ICP-MS por si só já é caro, e o acoplamento a um cromatógrafo o encarece ainda mais. As técnicas de voltametria e fluorimetria se destacam neste caso, porém ainda permanece o ponto negativo de preparo de amostra para a fluorimetria.

Portanto, o objetivo deste trabalho é justamente desenvolver um método rápido, que requer um preparo mínimo de amostra e que, no fim, seja de custo moderado. Em outras palavras, determinação de Se por AAS com análise direta de sólidos. Não há trabalhos reportados na literatura que determinem Se em amostras de solo diretamente dessa forma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento e a otimização de métodos analíticos que possam ser aplicados rotineiramente na determinação de Se em amostras de solo, tanto por espectrometria de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua com forno de grafite, por análise direta de sólidos (HR-CS SS-GF AAS), como com extração alcalina e por HG AAS.

2.2. Objetivos específicos

Para a determinação de Se em solo via análise direta de sólidos:

- A otimização do programa de temperatura através de curvas de pirólise e atomização em padrões aquosos e na amostra;
- Realizar um estudo do uso de modificadores com mais curvas de pirólise e atomização nos padrões aquosos e na amostra;
- Correção do fundo estruturado devido à presença das moléculas de NO e PO;
- Avaliação da precisão e exatidão do método proposto utilizando materiais de referência certificados;
- Aplicação do método desenvolvido nas amostras.

Para a determinação de Se em solo via extração alcalina:

- Definir os parâmetros do programa de temperatura do espectrômetro de absorção atômica;
- Otimizar as concentrações dos reagentes envolvidos na etapa de geração de hidretos: NaBH_4 , NaOH e HCl;
- Encontrar as concentrações e condições ótimas para o preparo da amostra: solução extratora, agitação, ultrassom e tempo de repouso;
- Avaliação da precisão e exatidão do método proposto utilizando materiais de referência certificados;
- Aplicação do método desenvolvido nas amostras;
- Comparar os valores obtidos pelo método desenvolvido com o método de análise direta de sólidos e verificar o fracionamento de Se(IV) e Se(VI).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Parte 1: desenvolvimento de método para a determinação de Se via análise direta de sólidos e análise das amostras

3.1.1. Instrumentação

Todas as medidas foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua contrAA 600 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) que possui um atomizador com tubo de grafite aquecido transversalmente. O instrumento é equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio de 300 W, operando em modo hot-spot, que serve como fonte de radiação contínua para o comprimento de onda entre 185 e 900 nm; um monocromador duplo de alta resolução, que consiste em um monocromador de prisma para a pré-separação da área espectral e um monocromador com rede echelle para a alta resolução. O espectrômetro foi controlado por um computador com processador “AMD Athlon 64”, 2,21 GHz, utilizando um programa de aquisição de dados desenvolvido por Analytik Jena. A linha principal do Se em 196,026 nm foi usada para a sua determinação. Todas as medidas foram feitas com 300 scans por leitura, com uma integração de 10 ms cada.

A técnica de forno de grafite foi usada exclusivamente para todas as análises. Um sistema manual para introdução de amostras sólidas SSA 6 (Analytik Jena), consistindo em uma pinça pré-ajustada, foi usado para introduzir as plataformas de amostragem sólida (Analytik Jena, Part No. 407-152.023) em tubos de grafite para análise sólida sem o orifício de injeção (Analytik Jena, Part No. 407-A81.303).

As amostras foram pesadas em uma microbalança M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha) diretamente nas plataformas de amostragem sólida. Foram usados tubos de grafite com recobrimento pirolítico e plataforma PIN integrada (Analytik Jena, Part No. 407-A81.025) e um amostrador automático MPE 60 para as medidas das soluções padrões. A absorvância integrada de três pixels foi considerada (“peak volume selected absorbance, PVSA, $A_{\Sigma 3, \text{int}}$ ” [88], resultando na melhor razão sinal/ruído. Argônio com pureza de 99,996% (Air Liquid, Florianópolis, Brasil) foi utilizado como gás de proteção e purga. O programa de temperatura usado para a determinação de Se está mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de temperatura para a determinação de Se nas amostras de solo; vazão de gás argônio $2,0 \text{ L min}^{-1}$ em todas as etapas exceto na atomização, durante a qual a vazão foi desligada.

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / °C s ⁻¹	Permanência / s
Secagem	110	5	10
Pirólise	1.400	300	15
Atomização	2.100	3.000	5
Limpeza	2.500	500	6

As avaliações estatísticas foram feitas com auxílio do programa InStat, versão 3.0 (GraphPad Software Inc.). Para comparação de duas médias foi usado o teste t-student. Para a comparação de três ou mais médias, foi usada a análise de variância (ANOVA), com o teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer, com um nível de confiança de 95%.

3.1.2. Reagentes

Todos os reagentes usados neste trabalho possuíam no mínimo grau analítico de pureza. Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi bi-distilado abaixo da temperatura de ebulição em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Água destilada e deionizada obtida de um sistema Mega ROUP Megapurity (Equisul, Pelotas, Brasil) com uma resistividade específica de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ foi usada para a diluição das amostras e preparação das soluções de calibração. Todos os frascos foram limpos com ácido nítrico 30% v/v por 24 h e, em seguida, com água deionizada por três vezes antes de serem usados.

Os padrões de Se inorgânico usados foram preparados através de uma série de diluições com água de uma solução estoque contendo 1.000 mg L^{-1} de Se, a qual foi preparada a partir de um concentrado de Titrisol (Merck). Ru foi empregado como um modificador permanente.

Uma solução estoque contendo 1.000 mg L^{-1} de Ru (Fluka, Buchs, Suíça) foi utilizada para o recobrimento da plataforma. Dez injeções repetidas de $40 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque, cada qual seguida por um programa de temperatura específico (veja Tabela 2), foram realizadas para recobrir a plataforma com um total de $400 \text{ }\mu\text{g}$ de Ru. O mesmo procedimento foi seguido com dois modificadores alternativos: Pd 1.000 mg L^{-1} (Merck) e Zr 1.000 mg L^{-1} (Merck). A mistura de $0,05\%$ m/v Pd e $0,03\%$ m/v Mg, ambos como nitratos (Merck), com $0,05\%$ de Triton X-100 (Union Carbide), foi usada como modificador em solução, injetada diretamente sobre as amostras sólidas. Para a geração do espectro molecular de referência de NO e PO, foram usadas soluções obtidas através de ureia ($\text{CH}_2\text{N}_2\text{O}$), di-hidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) e cloreto de sódio (NaCl) diluídos com água deionizada a concentrações de 10, 2 e 5 g L^{-1} , respectivamente.

Tabela 2. Programa de temperatura utilizado para a deposição permanente do modificador rutênio na plataforma SS. Vazão de gás: $2,0 \text{ L min}^{-1}$ em todas as etapas [91].

Étapas	Temperatura / °C	Rampa / °C s ⁻¹	Permanência / s
1	130	10	40
2	160	10	50
3	1000	20	25
4	1400	100	5
5	2000	100	5

Os seguintes materiais certificados de referência (CRM) foram utilizados: MURST-ISS-A1, “sedimento marinho antártico” (Programma Nazionale di Ricerche in Antartide, Instituto Superiore di Sanita, Roma, Itália), BCR-142, “solo arenoso leve” (European Community Bureau of Reference, Brussels, Bélgica), MESS-3 e PACS-2 “sedimentos marinhos” (National Research Council Canada, Ottawa, Canada).

3.1.3. Preparação das amostras

As amostras foram coletadas por uma campanha [13] em 12 Estados brasileiros (Figura 5) em sacos de polietileno e armazenadas a -18 °C. Em cada ponto foram coletadas as amostras em três diferentes níveis de profundidade (0 a 7,5, 7,5 a 15 e de 15 a 30 cm), como a Figura 6 ilustra. No laboratório, elas foram secadas em uma estufa a uma temperatura de 50 a 60 °C por 24 h, permitindo que esfriassem sob sílica gel e armazenadas em frascos de polietileno. Primeiramente, todas as amostras foram maceradas manualmente em um gral de ágata até que o material passasse a ter um diâmetro de cerca de 0,5 mm. Raízes e materiais de plantas foram removidos durante esse procedimento. Mais maceramento foi feito por 20 min a 300 rpm em um moinho de bolas (Fritsch Pulverisette modelo 05.102) com frascos de ágata, tampas e bolas. Após isso, as amostras passaram novamente por uma peneira de laboratório de 0,1 mm e armazenadas em frascos de polietileno até que fossem analisadas. Um número de amostras sólidas da campanha de coleta foi analisado para mostrar a aplicabilidade do método desenvolvido em amostras reais.

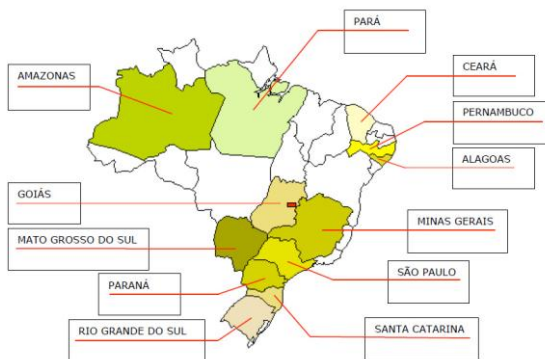


Figura 5. Estados onde ocorreram as coletas de amostras de solo.

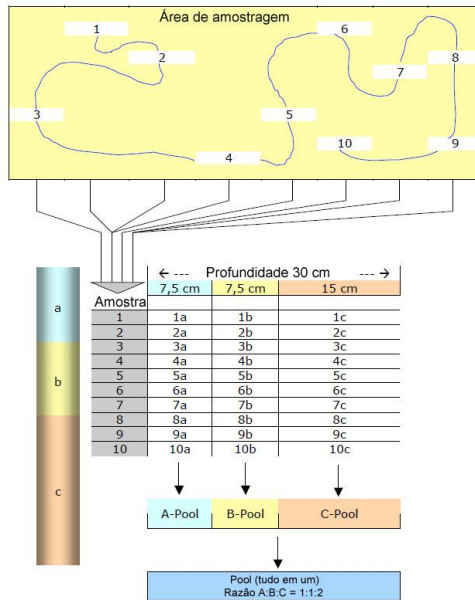


Figura 6. Sistema de amostragem realizado nas áreas de coleta de amostras de solo e exemplos de profundidade.

3.2. Parte 2: determinação de Se em solo por HG-GF AAS e extração alcalina

3.2.1. Instrumentação

Todas as medidas foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica AAS 5 EA (Analytik Jena) com correção de fundo via lâmpada de deutério, equipado com um atomizador de tubo de grafite aquecido transversalmente e um sistema de geração de hidretos modelo HS1 (Analytik Jena). Uma lâmpada de cátodo oco de Se (Analytik Jena) foi usada como fonte de radiação e operada com uma corrente de 13,0 mA (comprimento de onda 196,0 nm, banda espectral de 0,8 nm). O espectrômetro foi operado com um computador IBM PC/AT. O sistema de geração de hidretos foi utilizado no modo de fluxo contínuo e os hidretos gasosos foram introduzidos no tubo de grafite pré-aquecido, usando um amostrador automático modelo MPE 50 (Analytik Jena), equipado com um capilar de aço inoxidável. Uma bomba com quatro

canais de bombeamento com mangueiras foi empregada para transportar a amostra, o agente redutor e o ácido para a bobina de reação; o quarto canal foi usado para transportar o descarte do separador de gás – líquido para o recipiente apropriado. O separador de gás – líquido foi um frasco modificado de 25 mL com um largo volume morto, sendo que metade era preenchida por esferas de vidro com 5 mm de diâmetro.

Tubos de grafite com recobrimento pirolítico sem plataforma (Analytik Jena Part No. 407-A81.011) foram usados exclusivamente e recobertos com 200 µg de Ir, através de cinco deposições de 40 µL de uma solução estoque com 1.000 mg L⁻¹ e executando o programa de temperatura exibido na Tabela 3 após cada injeção. O programa de temperatura para aprisionar o seleneto de hidrogênio e a atomização do Se é mostrado na Tabela 4. Para evitar a perda de modificador permanente em altas temperaturas, a limpeza foi fixada a 2.200 °C; o que foi suficiente, pois não foram esperados resíduos no tubo de grafite utilizando essa técnica. Absorvância integrada (área de pico) foi usada exclusivamente para a validação do sinal e todos os valores foram a média de, pelo menos, três medidas sucessivas.

Tabela 3. Programa de temperatura do forno de grafite para a deposição do modificador permanente irídio na plataforma de grafite. Vazão de gás: 2,0 L min⁻¹ [91].

Etapas	Temperatura / °C	Rampa / °C s ⁻¹	Permanência / s
1	90	5	40
2	110	1	40
3	130	1	40
4	1200	300	25
5	2100	500	10
6	2100	0	5

Tabela 4. Programa de temperatura do forno de grafite para o sequestro do seleneto de hidrogênio e a atomização do selênio. Vazão de gás de arraste: $0,3 \text{ L min}^{-1}$.

Etapas	Temperatura / °C	Rampa / °C s ⁻¹	Permanência / s
Coleta	500	100	30
Atomização	2.100	2.000	5
Limpeza	2.200	100	3

Um banho de ultrassom modelo Ultracleaner 1450 (Unique, Brasil) foi usado para a extração de Se das amostras de solo. Todas as medidas comparativas foram feitas empregando a técnica desenvolvida na parte 1 deste trabalho.

3.2.2. Reagentes

Água destilada e deionizada obtida de um sistema Mega ROUP Megapurity (Equisul, Pelotas, Brasil) com uma resistividade específica de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ foi usada para a diluição das amostras e preparação das soluções de calibração. A solução padrão para Se inorgânico, contendo 1.000 mg L^{-1} de Se, foi preparada a partir de um concentrado de Titrisol (Merck). Para a digestão das amostras, HNO_3 (67%, Fluka) e HCl (37%, Fluka) foram bi-distilados abaixo da temperatura de ebulição em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Uma solução padrão de Ir contendo 1.000 mg L^{-1} (Merck) foi usada para o recobrimento do tubo de grafite. NaBH_4 (Purum, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), NaOH (Merck) e HCl (Fluka) foram usados para a geração de hidretos. Todos os reagentes possuíam no mínimo grau analítico de pureza. Algumas gotas de Anti-Foam A (Sigma-Aldrich) foram adicionadas às amostras que causavam espuma durante a geração de hidretos. Todas as amostras foram preparadas e homogeneizadas em frascos de polipropileno de 50 mL.

O CRM MURST-ISS-A1, “sedimento marinho antártico”, também usado no desenvolvimento do método da primeira parte deste trabalho, foi utilizado para todas as otimizações. O método desenvolvido foi aplicado no CRM BCR 142R, “solo arenoso leve” (Institute for

Reference Materials and Measurements, Bélgica), assim como nas amostras de solo de diferentes regiões do Brasil, vindas da campanha, também descrito na parte anterior (3.1.3).

3.2.3. Preparação das amostras

A coleta e o tratamento das amostras usadas estão descritos na parte 3.1.3 deste trabalho. Para a digestão das amostras, foi seguido o procedimento descrito na literatura [14]: antes de cada programa de digestão, os frascos de PTFE foram imersos por 12 h em ácido nítrico diluído (10% v/v HNO₃) a temperatura ambiente, seguido por um programa de limpeza usando ácido nítrico de grau reagente (65% v/v) e o programa de limpeza do forno de micro-ondas recomendado pelo fabricante. Para a digestão das amostras de solo, 2,5 mL de HNO₃ concentrado (65% v/v) e 7,5 mL de HCl (37% v/v) foram adicionados a cerca de 1,0 g de amostra de solo no frasco de PTFE. Os frascos foram fechados e o seu conteúdo misturado por 5 min utilizando um banho de ultrassom. Após isso, os frascos fechados foram removidos do banho e deixados sob pressão atmosférica por 30 min. Finalmente, os frascos foram introduzidos no forno de micro-ondas e o programa de digestão da Tabela 5 foi utilizado. Para evitar formação de espuma e espalhamento do líquido, os frascos foram resfriados à temperatura ambiente por 30 min depois do término do programa de digestão, abertos cuidadosamente e água foi adicionada para preencher o volume até 40 mL. Após esse procedimento, Se foi determinado por HG-GF AAS usando o método desenvolvido neste trabalho.

Tabela 5. Condições para a digestão parcial do filtro com água régia em um forno de micro-ondas TOPwave.

Parâmetro	Valor
Temperatura / °C	190
Pressão / bar	40
Rampa / min	1
Tempo / min	25

Para a extração de Se das amostras de solo usando solução alcalina e posterior determinação por HG-GF AAS, cerca de 0,3 a 0,6 g de amostra ou CRM foram pesados em frascos de polipropileno e 20 mL de solução extratora de NaOH foram adicionados. Em seguida, a amostra foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 24 h, seguida de 30 min de banho ultrassom para a subsequente determinação via HG-GF AAS. A reação foi feita com NaBH₄ 1% / NaOH 0,5% e 3 mol L⁻¹ de HCl. O aprisionamento em tubo de grafite recoberto com Ir como modificador permanente foi em 300 °C, seguido pelo programa de temperatura descrito na Tabela 2.

Para efeitos de comparação foram usados os valores obtidos pelo método desenvolvido na parte 1 deste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parte 1: desenvolvimento de método para a determinação de Se com análise direta de sólidos

4.1.1. Curvas de pirólise e atomização

As curvas de pirólise e atomização para Se usando uma solução padrão aquosa e vários modificadores são mostradas na Figura 7. O modificador Pd e Mg, adicionado em solução, claramente apresentou os melhores resultados, seguidos dos modificadores permanentes Ru e Ir. Pd usado como um modificador permanente pôde estabilizar o Se apenas até a temperatura de 900 °C, a qual é bem inferior a 1.400 °C, que pode ser utilizada com os outros modificadores. O uso do Zr como modificador permanente resultou inequivocamente nos menores valores de absorvância integrada de Se.

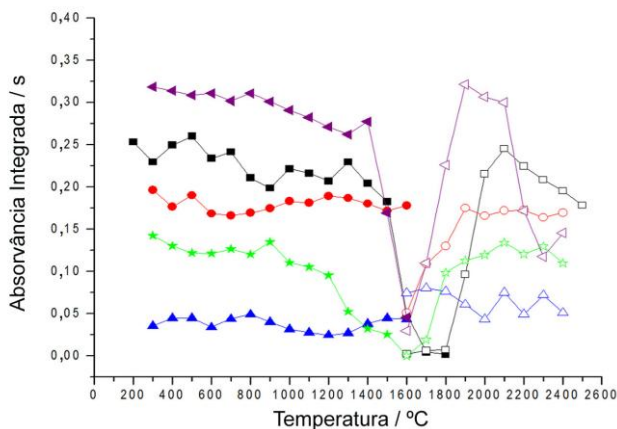


Figura 7. Curvas de pirólise (símbolos preenchidos) e atomização (símbolos vazios) obtidas com HR-CS GF AAS para o padrão de Se 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ em solução aquosa com os modificadores Ru (\blacksquare, \square), Zr ($\blacktriangle, \triangle$), Ir (\bullet, \circ), Pd (\star, \star) e Pd + Mg em solução ($\blacktriangleleft, \triangleleft$). Temperatura de atomização, $T_{\text{at}} = 2.100 \text{ }^\circ\text{C}$ para a pirólise e temperatura de pirólise, $T_{\text{pir}} = 1.400 \text{ }^\circ\text{C}$ para a atomização, exceto para o Pd, $T_{\text{pir}} = 900 \text{ }^\circ\text{C}$.

Usando os dados obtidos com a solução padrão aquoso, curvas de pirólise e atomização também foram desenvolvidas para a amostra sólida de solo empregando modificadores que apresentaram melhor performance: Pd + Mg em solução e Ru como modificador permanente, respectivamente. Entretanto, os resultados foram irreprodutíveis em todas as temperaturas e para ambos os modificadores (Figura 8).

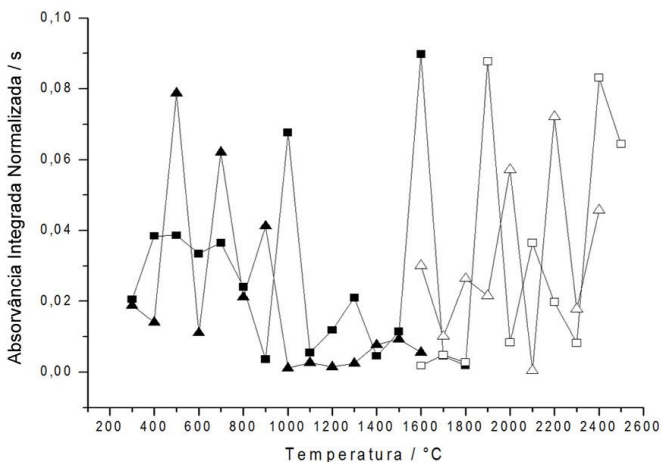


Figura 8. Curvas de pirólise e atomização obtidas por HR-CS GF AAS para o Se, em uma amostra sólida de solo S08, com os modificadores Ru (■, □) e Pd+Mg em solução (▲, △) com $T_{at} = 2.100\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a pirólise e $T_{pir} = 1.400\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a atomização.

Para solucionar esse problema, diferentes estratégias foram investigadas. Um trabalho publicado por Zanão et al. [49] para a determinação de Se em amostras de sangue sugeriu o uso de um modificador permanente, no caso uma mistura de W e Rh, e, juntamente com a amostra, a co-injeção de uma solução de RhCl_3 . A reprodução dessa técnica não se mostrou eficaz no caso de análise direta de sólidos em amostras de solo, mas a ideia de usar um estabilizante termal injetado simultaneamente com a amostra foi investigada.

Estudos como usar modificadores permanentes (Ru e Ir) e a co-injeção de um modificador em solução, como Pd+Mg, não foram eficazes. Entretanto, uma estratégia mostrou-se promissora: o uso de Ru

tanto como modificador permanente depositado na plataforma quanto injetado em solução sobre a amostra sólida. A Figura 9 mostra o resultado desse experimento, que acabou se revelando apropriado para a determinação de Se em amostras de solo. Dessa forma, as condições obtidas pelo experimento, ou seja, 1.400 °C para a temperatura de pirólise e 2.100 °C para a temperatura de atomização foram adotadas para as investigações futuras.

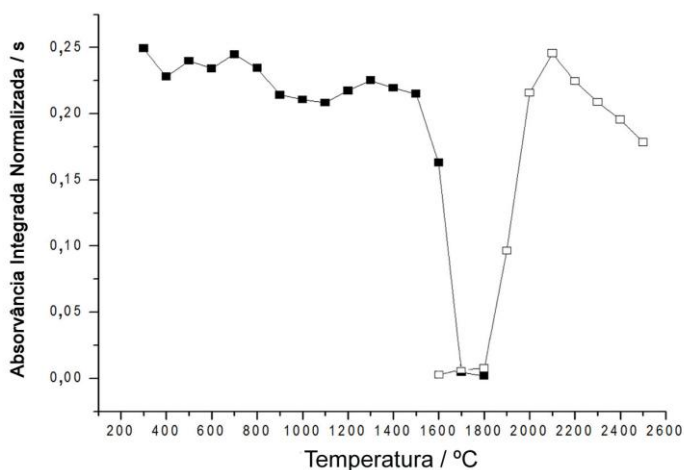


Figura 9. Curvas de pirólise (■) e atomização (□) obtidas por HR-CS SS-GF AAS para o Se, na amostra de solo S08, usando Ru como modificador permanente e também adicionando em solução sobre a amostra sólida; $T_{at} = 2.100$ °C para a pirólise e $T_{pir} = 1.400$ °C para a atomização.

4.1.2. Correção de fundo

Todas as amostras de solo exibiram um fundo de absorção descontínuo, como é mostrado na Figura 10. Esse fundo foi identificado como causado principalmente pelas moléculas de NO e PO. Espectros de referência para essas duas moléculas precisavam ser estabelecidos para a correção da interferência espectral.

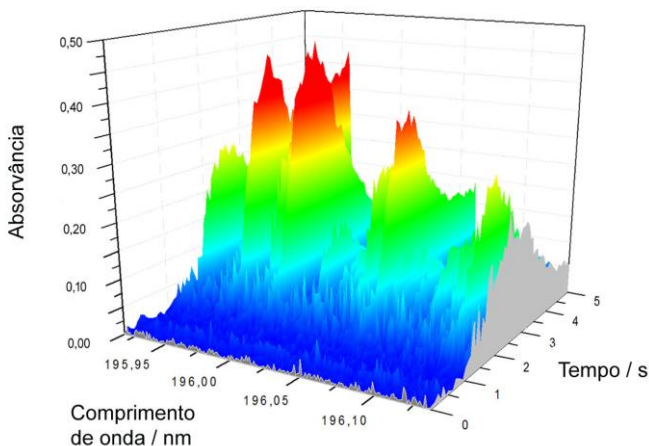


Figura 10. Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o Se em uma amostra de solo, utilizando modificador permanente Ru e também em solução, nas vizinhanças da linha analítica em 196,026 nm, $T_{\text{pir}} = 1.400\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} = 2.100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apenas a correção para eventos contínuos está aplicada.

Em primeira instância, um espectro para cada molécula foi estabelecido usando 20 μL de ácido nítrico e fosfórico para os espectros de NO e PO, respectivamente, e usando o mesmo programa de temperatura mostrado na Tabela 1. Porém, apenas a adição de um ácido em um tubo de grafite normalmente não causaria a geração dos espectros desejados. Acredita-se que a formação ocorreu devido a um efeito de memória das amostras de solo intensificado com a presença dos ácidos. Para que a dúvida fosse sanada, espectros de NO e PO foram estabelecidos seguindo outra metodologia: 20 μL de uma solução aquosa contendo $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 g L^{-1} foram introduzidos no forno de grafite, resultando no espectro de excitação eletrônica com estrutura rotacional fina da molécula de PO [46]. Já para a geração do espectro de NO, foi utilizado $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (ureia) de concentração 10 g L^{-1} [46]. Para os dois casos, o mesmo programa de temperatura da Tabela 1 foi seguido.

Com os espectros de NO e PO em mãos, foi adotada a correção de fundo por mínimos quadrados (LSBC) nas medidas das amostras de

solo, utilizando um algoritmo oferecido pelo software do equipamento de HR-CS AAS.

A Figura 11 mostra o espectro de absorvância para a mesma amostra de solo da Figura 10 após a subtração dos espectros de NO e PO usando LSBC. O espectro corrigido mostra apenas o sinal de Se e as linhas conhecidas de Fe em sua vizinhança. Essas linhas, entretanto, são bem separadas no comprimento de onda da linha analítica, não causando interferência em HR-CS GF AAS. As linhas de Fe estiveram presentes em todas as amostras de solo investigadas neste trabalho.

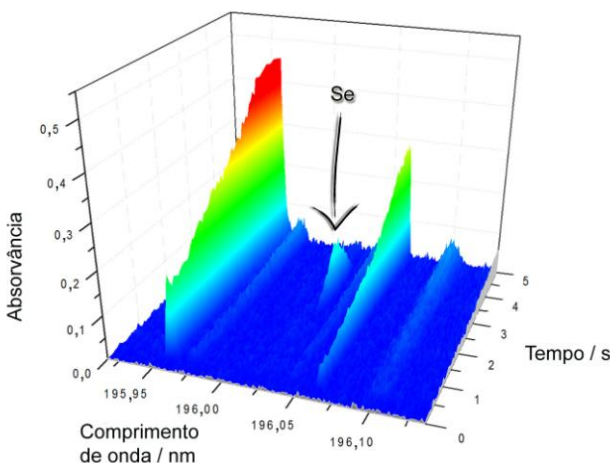


Figura 11. Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o Se em uma amostra de solo, utilizando modificador permanente Ru e também injetando-o em solução, nas vizinhanças da linha analítica em 196,026 nm, $T_{\text{pir}} = 1.400\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{at}} = 2.100\text{ }^{\circ}\text{C}$. A correção para eventos contínuos está aplicada, assim como a LSBC com os espectros de NO e PO.

4.1.3. Parâmetros de mérito

Após a otimização de todas as condições analíticas, como o programa de temperatura e os modificadores, uma curva de calibração foi estabelecida e os parâmetros de mérito foram determinados. A equação de regressão linear, o coeficiente de correlação (R), a massa

característica (m_0), o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para Se são mostrados na Tabela 6. A massa característica é a massa de um analito necessária para gerar uma absorvância integrada de 0,0044 s. O valor de 50 pg encontrado neste trabalho está próximo ao valor de 40 pg reportado na literatura para um tubo aquecido transversalmente [19]. O LOD é determinado através do cálculo de três vezes o desvio padrão de 10 medidas do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração; o LOQ é baseado em dez vezes o desvio padrão das mesmas medidas. Em análise direta de sólidos, o branco é normalmente calculado seguindo a “resposta de massa zero”, isto é, a inserção repetida de uma plataforma de análise sólida vazia que contenha apenas o modificador, e rodando em um programa de temperatura completo [92].

Tabela 6. Parâmetros de mérito para a determinação de Se com HR-CS SS-GF AAS.

Parâmetro	Se
Equação da Reta	$A_{\text{int}} = 0,0937 m_{\text{Se}} + 0,0191$
R	0,9989
LOD / ng g ⁻¹	30
LOQ / ng g ⁻¹	100
m_0 / pg	50

4.1.4. Análises das amostras de solo e de CRM

Os resultados obtidos para Se em diferentes amostras de solo e três CRM usando HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos estão exibidos na Tabela 7. Também estão mostrados os resultados obtidos em um trabalho anterior [14] com as mesmas amostras, mas determinadas por HG-GF AAS após uma digestão assistida por micro-ondas. Não houve uma diferença significativa nesses dois resultados, baseados em

um teste t-student de 95% de intervalo de confiança. Os valores obtidos para os três CRM também confirmam que o método proposto usando HR-CS SS-GF AAS com calibração aquosa oferece resultados exatos. A precisão, expressa em desvio padrão relativo (RSD), foi melhor que 10% em todos os casos, o que é aceitável para uma análise direta de sólidos, considerando a homogeneidade da amostra e as pequenas porções usadas para determinação.

Na realidade, a precisão obtida com o método comparado, HG-GF AAS, não foi significativamente diferente do método proposto, ainda que as amostras tenham sido digeridas com ácidos no trabalho desenvolvido anteriormente. Isso, portanto, é uma vantagem, pois há um número de procedimentos que devem ser seguidos para o preparo de amostras. Outro aspecto é o número e a quantidade de reagentes que devem ser usados para HG-GF AAS em comparação com HR-CS SS-GF AAS, que só requer o modificador químico.

Por fim, mas não menos importante, há a questão do manuseio da amostra. Usando HR-CS SS-GF AAS, uma única medida demora cerca de 5 min (sem considerar um preparo mínimo da amostra), que conseqüentemente se tornam 15 min em uma análise em triplicata. Considerando isso, é possível realizar análises de 25 a 30 amostras por dia, incluindo o tempo para a calibração, recobrimento para as plataformas, etc. Esse manuseio é cerca de cinco vezes melhor que no caso de HG-GF AAS, principalmente devido à extensa preparação de amostra necessária, o que significa que o método proposto vai ao encontro da expectativa de uma determinação de rotina para Se em um grande número de amostras.

Tabela 7. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Valor certificado / $\mu\text{g g}^{-1}$	Concentração encontrada / ng g^{-1}		RSD / %
		HG-GF AAS ¹⁴	HR-CS SS-GF AAS	
S01 (F/IR/AM)	–	604 \pm 15	630 \pm 15	2,5
S02 (C/CG/MS)	–	113 \pm 6,5	130 \pm 10	7,7
S03 (F/TA/PA)	–	419 \pm 18	405 \pm 20	5,0
S04 (C/VA/RS)	–	248 \pm 11	280 \pm 20	7,1
S05 (C/LA/SC)	–	262 \pm 20	250 \pm 25	10
S07 (C/PA/CE)	–	599 \pm 24	550 \pm 20	3,6
S08 (F/FL/SC)	–	406 \pm 19	420 \pm 20	4,8
S09 (C/SH/GO)	–	215 \pm 21	200 \pm 20	10
S10 (C/CU/PR)	–	370 \pm 12	350 \pm 10	2,9
MURST-ISS-A1	2,2 \pm 0,1*	2.076 \pm 129	2.050 \pm 150	7,3
MESS-3	0,72 \pm 0,05	–	690 \pm 30	4,3
PACS-2	0,92 \pm 0,22	–	880 \pm 50	5,7

*Valor informado, não é certificado.

4.1.5. Limites da técnica proposta

Problemas por correção de fundo, principalmente com moléculas diatómicas, como NO e PO, limitam a determinação de Se por LS GF AAS, até mesmo tornando-a impossível. No caso de HR-CS GF AAS, por serem eliminadas por LSBC, não há essa dificuldade. A presença de Fe também não é um problema, pois as três linhas de absorção desse elemento nas vizinhanças da linha de Se são bem separadas. Sílica, outra substância que é encontrada com frequência em alta concentração em solo, também não apresenta problemas, pois a banda de absorção da molécula SiO é localizada entre 210 e 260 nm [19] e nenhuma absorção foi observada abaixo de 200 nm.

Porém, um problema ainda não mencionado foi encontrado durante as investigações. Originalmente, um CRM estava incluso: BCR-

142, “solo arenoso leve” (European Community Bureau of Reference, Brussels, Bélgica). Não foi possível determinar Se neste CRM. Imediatamente após a adição do modificador Ru em solução sobre a amostra ocorreu um borbulhamento e, após a reação ter sido finalizada e a análise no espectrômetro ter sido feita, nenhum sinal de Se foi detectado. Esse problema não foi investigado a fundo, pois nenhuma outra amostra apresentou esse comportamento. Uma explicação para esse fenômeno seria o CRM conter uma quantidade significativa de calcário, e uma alta concentração de ácido presente na solução de Ru ter gerado CO_2 . De alguma forma, o Se foi perdido nessa reação violenta e um possível mecanismo que explicaria o que ocorreu não será proposto neste trabalho. Outra simples possibilidade é o CRM estar contaminado com alguma substância que tenha causado a reação. Como CRM é um material único e costuma ser caro, testes com um BCR-142 supostamente limpo não puderam ser feitos. Dessa forma, a análise com esse material foi descartada.

De qualquer modo, como mencionado anteriormente, essa foi a única amostra que apresentou esse comportamento, podendo servir como alerta de que esse método não é aplicável em qualquer tipo de amostra de solo.

4.2. Parte 2: determinação de Se em todas as amostras de solo disponíveis

Com o método desenvolvido na primeira parte deste trabalho determinou-se o conteúdo total de Se em todas as amostras de solo disponíveis da campanha de coleta. Como discutido anteriormente, essa campanha teve como objetivo coletar amostras de solos em 12 Estados brasileiros, desde o Amazonas e Pará no extremo norte até o Rio Grande do Sul, no extremo sul.

Os valores de Se estão dispostos nas Tabelas 8, 9 e 10. Vale ressaltar que a sigla da amostra representa o Estado no qual ela foi coletada, como detalhado na Figura 5. Já a letra indica a profundidade no solo (“a” sendo 0 – 7,5; “b” 7,5 – 15 cm e “c” 15 – 30 cm). Por fim, o número é referente à área de coleta na região escolhida, seguindo o padrão exemplificado na Figura 6.

Os resultados dispostos nas Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13 referem-se exatamente aos valores dependentes do nível de profundidade das amostras coletadas. Já os valores encontrados na Tabela 7, na seção anterior, dizem respeito às amostras “pool”, ou seja, uma mistura conforme a Figura 12 ilustra.

Tabela 8. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por HR-CS SS-GF AAS; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$
AM 1a	19,0 \pm 3,0	AM 1c	10,5 \pm 2,5	AL 1b	10,5 \pm 2,5
AM 2a	15,0 \pm 2,5	AM 2c	11,5 \pm 1,5	AL 2b	8,00 \pm 0,5
AM 3a	16,0 \pm 3,0	AM 3c	10,5 \pm 1,5	AL 3b	8,00 \pm 0,5
AM 4a	14,0 \pm 2,0	AM 4c	9,5 \pm 1,0	AL 4b	9,00 \pm 1,0
AM 5a	14,0 \pm 3,0	AM 5c	10,0 \pm 1,0	AL 5b	10,5 \pm 1,5
AM 6a	10,0 \pm 3,0	AM 6c	7,0 \pm 0,5	AL 6b	9,50 \pm 1,0
AM 7a	17,0 \pm 3,5	AM 7c	12,0 \pm 2,5	AL 7b	11,7 \pm 1,3
AM 8a	12,0 \pm 2,0	AM 8c	6,50 \pm 0,5	AL 8b	12,5 \pm 1,0
AM 9a	7,0 \pm 0,5	AM 9c	5,0 \pm 0,5	AL 9b	13,5 \pm 1,5
AM 10a	8,0 \pm 1,0	AM 10c	6,0 \pm 0,5	AL 10b	13,5 \pm 1,0
AM 1b	17,5 \pm 4,0	AL 1a	12,0 \pm 2,5	AL 1c	8,5 \pm 2,5
AM 2b	14,5 \pm 3,0	AL 2a	10,0 \pm 1,0	AL 2c	7,0 \pm 0,5
AM 3b	15,0 \pm 3,0	AL 3a	9,0 \pm 0,7	AL 3c	7,0 \pm 0,5
AM 4b	13,0 \pm 2,0	AL 4a	11,0 \pm 1,0	AL 4c	8,0 \pm 0,5
AM 5b	12,5 \pm 2,0	AL 5a	12,5 \pm 2,0	AL 5c	9,5 \pm 1,5
AM 6b	9,5 \pm 1,0	-	-	AL 6c	6,5 \pm 0,3
AM 7b	14,0 \pm 2,0	-	-	AL 7c	7,5 \pm 0,7
AM 8b	8,50 \pm 1,0	-	-	AL 8c	5,5 \pm 0,5
AM 9b	5,50 \pm 0,5	-	-	AL 9c	9,5 \pm 1,5
AM 10b	7,50 \pm 0,5	-	-	AL 10c	9,5 \pm 1,5

Tabela 9. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por HR-CS SS-GF AAS; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostr a	Concentraçã o encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostr a	Concentraçã o encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostr a	Concentraçã o encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$
CE 1a	16,0 \pm 2,5	CE 1c	12,0 \pm 1,0	PA1b	12,0 \pm 1,5
CE 2a	15,0 \pm 2,0	CE 2c	11,0 \pm 1,5	PA 2b	8,0 \pm 1,0
CE 3a	16,5 \pm 1,5	CE 3c	11,5 \pm 1,5	PA 3b	11,0 \pm 2,0
CE 4a	14,0 \pm 2,0	CE 4c	9,0 \pm 0,5	PA 4b	13,0 \pm 2,0
CE 5a	15,0 \pm 2,0	CE 5c	9,5 \pm 1,0	PA 5b	13,0 \pm 1,5
CE 6a	13,0 \pm 2,0	CE 6c	8,0 \pm 0,7	PA 6b	12,0 \pm 1,5
CE 7a	15,0 \pm 1,5	CE 7c	10,0 \pm 1,0	PA 7b	11,0 \pm 2,0
CE 8a	13,0 \pm 2,0	CE 8c	10,0 \pm 1,0	PA 8b	13,0 \pm 1,0
CE 9a	15,0 \pm 2,0	CE 9c	11,5 \pm 1,0	PA 9b	14,0 \pm 1,0
CE 10a	16,5 \pm 2,5	CE 10c	10,5 \pm 1,5	PA 10b	11,0 \pm 1,5
CE 1b	14,0 \pm 2,0	PA 1a	14,0 \pm 2,5	PA 1c	10,0 \pm 1,0
CE 2b	13,0 \pm 2,0	PA 2a	10,0 \pm 2,0	PA 2c	6,0 \pm 0,3
CE 3b	13,5 \pm 1,5	PA 3a	13,0 \pm 2,0	PA 3c	9,0 \pm 1,0
CE 4b	12,0 \pm 2,0	PA 4a	16,0 \pm 3,0	PA 4c	10,0 \pm 1,0
CE 5b	12,0 \pm 2,0	PA 5a	15,0 \pm 2,5	PA 5c	10,0 \pm 1,5
CE 6b	11,0 \pm 2,0	PA 6a	14,0 \pm 2,5	PA 6c	11,0 \pm 1,5
CE 7b	12,0 \pm 1,5	PA 7a	13,0 \pm 2,0	PA 7c	8,0 \pm 1,0
CE 8b	11,0 \pm 1,5	PA 8a	16,0 \pm 1,5	PA 8c	10,5 \pm 1,0
CE 9b	13,5 \pm 1,5	PA 9a	15,0 \pm 2,0	PA 9c	12,0 \pm 1,0
CE 10b	13,5 \pm 2,0	PA 10a	12,0 \pm 2,0	PA 10c	9,5 \pm 1,0

Tabela 10. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por HR-CS SS-GF AAS; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$
PE 1a	17,0 \pm 3,0	GO 1a	13,5 \pm 1,5	GO 1c	9,0 \pm 0,5
PE 2a	14,0 \pm 2,0	GO 2a	10,5 \pm 1,5	GO 2c	8,0 \pm 0,5
PE 3a	14,5 \pm 2,5	GO 3a	8,5 \pm 0,5	GO 3c	6,0 \pm 0,5
PE 4a	12,0 \pm 1,5	GO 4a	9,5 \pm 0,5	GO 4c	7,0 \pm 0,5
PE 5a	17,0 \pm 3,0	GO 5a	12,0 \pm 1,5	GO 5c	9,0 \pm 0,7
PE 6a	18,0 \pm 2,5	GO 6a	13,0 \pm 1,5	GO 6c	10,0 \pm 1,0
PE 7a	17,5 \pm 2,0	GO 7a	14,5 \pm 2,0	GO 7c	10,5 \pm 1,5
PE 8a	15,0 \pm 1,5	GO 8a	12,5 \pm 1,5	GO 8c	8,5 \pm 0,5
PE 9a	16,5 \pm 2,0	GO 9a	11,5 \pm 1,0	GO 9c	8,5 \pm 0,5
PE 10a	13,5 \pm 1,0	GO 10a	15,5 \pm 2,5	GO 10c	10,5 \pm 1,0
PE 1c	14,5 \pm 2,0	GO 1b	11,5 \pm 1,0	MS 1a	5,0 \pm 0,3
PE 2c	8,0 \pm 0,5	GO 2b	8,5 \pm 0,5	MS 2a	6,5 \pm 0,5
PE 3c	10,0 \pm 1,0	GO 3b	6,5 \pm 0,5	MS 3a	5,5 \pm 0,3
PE 4c	11,0 \pm 1,0	GO 4b	7,5 \pm 0,5	MS 4a	4,0 \pm 0,3
PE 5c	12,0 \pm 1,5	GO 5b	11,0 \pm 1,5	MS 5a	3,0 \pm 0,2
PE 6c	12,0 \pm 1,5	GO 6b	11,0 \pm 1,5	MS 6a	5,0 \pm 0,3
PE 7c	10,5 \pm 1,5	GO 7b	13,5 \pm 1,5	MS 7a	6,0 \pm 0,3
PE 8c	9,0 \pm 0,5	GO 8b	10,5 \pm 1,5	MS 8a	7,0 \pm 0,5
PE 9c	11,5 \pm 1,0	GO 9b	10,5 \pm 1,0	MS 9a	5,5 \pm 0,3
PE 10c	10,5 \pm 0,5	GO 10b	13,5 \pm 2,0	MS 10a	6,0 \pm 0,3

Tabela 11. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por HR-CS SS-GF AAS; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$
MS 1b	$3,5 \pm 0,5$	MG 1b	$7,5 \pm 0,5$	SP 1a	$7,0 \pm 0,5$
MS 2b	$4,5 \pm 0,5$	MG 2b	$6,0 \pm 0,3$	SP 2a	$5,0 \pm 0,5$
MS 3b	$3,5 \pm 0,3$	MG 3b	$5,5 \pm 0,5$	SP 3a	$6,5 \pm 0,5$
MS 4b	$2,5 \pm 0,3$	MG 4b	$7,0 \pm 0,5$	SP 4a	$8,0 \pm 0,5$
MS 5b	$0,4 \pm 0,2$	MG 5b	$9,5 \pm 2,5$	SP 1b	$6,5 \pm 0,5$
MS 6b	$3,0 \pm 0,3$	MG 6b	$4,5 \pm 0,3$	SP 2b	$4,0 \pm 0,5$
MS 7b	$4,5 \pm 0,2$	MG 7b	$5,5 \pm 0,5$	SP 3b	$3,5 \pm 0,5$
MS 8b	$6,0 \pm 0,5$	MG 8b	$5,0 \pm 0,5$	SP 4b	$6,0 \pm 0,5$
MS 9b	$4,5 \pm 0,3$	MG 9b	$13,5 \pm 2,0$	SP 1c	$4,0 \pm 0,5$
MS 10b	$5,0 \pm 0,2$	MG10b	$7,0 \pm 0,3$	SP 2c	$2,0 \pm 0,5$
MS 1c	$6,8 \pm 0,3$	MG 1c	$5,5 \pm 0,5$	SP 3c	$1,5 \pm 0,5$
MS 2c	$2,5 \pm 0,5$	MG 2c	$3,0 \pm 0,3$	SP 4c	$4,0 \pm 0,5$
MS 3c	$2,5 \pm 0,2$	MG 3c	$4,0 \pm 0,5$	-	-
MS 4c	$2,0 \pm 0,2$	MG 4c	$5,5 \pm 0,5$	-	-
MS 5c	$0,2 \pm 0,1$	MG 5c	$7,5 \pm 0,5$	-	-
MS 6c	$2,5 \pm 0,2$	MG 6c	$3,5 \pm 0,3$	-	-
MS 7c	$4,0 \pm 0,2$	MG 7c	$4,5 \pm 0,5$	-	-
MS 8c	$5,0 \pm 0,5$	MG 8c	$3,0 \pm 0,5$	-	-
MS 9c	$14,0 \pm 2,0$	MG 9c	$12,5 \pm 0,2$	-	-
MS 10c	$3,5 \pm 0,2$	MG 10c	$5,0 \pm 0,5$	-	-

Tabela 12. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por HR-CS SS-GF AAS; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$
PR1a	5,0 \pm 0,5	PR 1c	3,5 \pm 0,3	SC 1b	1,2 \pm 0,1
PR 2a	3,0 \pm 0,3	PR 2c	1,0 \pm 0,1	SC 2b	3,0 \pm 0,3
PR 3a	2,5 \pm 0,2	PR 3c	1,0 \pm 0,1	SC 3b	1,0 \pm 0,1
PR 4a	5,5 \pm 0,5	PR 4c	2,5 \pm 0,2	SC 4b	3,0 \pm 0,3
PR 5a	6,0 \pm 0,5	PR 5c	3,5 \pm 0,3	SC 5b	3,5 \pm 0,3
PR 6a	4,5 \pm 0,5	PR 6c	2,5 \pm 0,2	SC 6b	1,0 \pm 0,1
PR 7a	5,0 \pm 0,5	PR 7c	4,0 \pm 0,3	SC 7b	2,0 \pm 0,2
PR 8a	5,0 \pm 0,5	PR 8c	4,0 \pm 0,3	SC 8b	2,5 \pm 0,2
PR 9a	6,0 \pm 0,5	PR 9c	5,0 \pm 0,5	SC 9b	0,3 \pm 0,1
PR 10a	7,0 \pm 0,5	PR 10c	3,0 \pm 0,3	SC 10b	2,0 \pm 0,2
PR 1b	4,5 \pm 0,3	SC 1a	4,7 \pm 0,5	SC 1c	0,1 \pm 0,1
PR 2b	2,0 \pm 0,2	SC 2a	5,0 \pm 0,5	SC 2c	2,0 \pm 0,2
PR 3b	2,0 \pm 0,2	SC 3a	2,0 \pm 0,2	SC 3c	1,0 \pm 0,1
PR 4b	3,5 \pm 0,3	SC 4a	3,5 \pm 0,3	SC 4c	2,0 \pm 0,2
PR 5b	4,0 \pm 0,3	SC 5a	4,0 \pm 0,3	SC 5c	2,5 \pm 0,2
PR 6b	3,5 \pm 0,3	SC 6a	1,5 \pm 0,1	SC 6c	1,0 \pm 0,1
PR 7b	4,0 \pm 0,3	SC 7a	2,5 \pm 0,2	SC 7c	1,5 \pm 0,1
PR 8b	4,5 \pm 0,3	SC 8a	3,5 \pm 0,3	SC 8c	2,0 \pm 0,2
PR 9b	5,5 \pm 0,5	SC 9a	1,5 \pm 0,1	SC 9c	<LOD
PR 10b	5,0 \pm 0,5	SC 10a	5,0 \pm 0,5	SC 10c	1,0 \pm 0,1

Tabela 13. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por HR-CS SS-GF AAS; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$	Amostra	Concentração encontrada / $\mu\text{g g}^{-1}$
RS 1a	$0,3 \pm 0,03$	RS 1c	<LOD
RS 2a	$1,0 \pm 0,1$	RS 2c	<LOD
RS 3a	$1,5 \pm 0,1$	RS 3c	<LOD
RS 4a	$2,0 \pm 0,2$	RS 4c	<LOD
RS 5a	$0,5 \pm 0,05$	RS 5c	<LOD
RS 6a	$0,3 \pm 0,03$	RS 6c	<LOD
RS 7a	$0,1 \pm 0,05$	RS 7c	<LOD
RS 8a	$0,7 \pm 0,1$	RS 8c	<LOD
RS 9a	$1,5 \pm 0,1$	RS 9c	<LOD
RS 10a	$2,0 \pm 0,2$	RS 10c	<LOD
RS 1b	$0,5 \pm 0,1$	-	-
RS 2b	$0,5 \pm 0,1$	-	-
RS 3b	$0,5 \pm 0,1$	-	-
RS 4b	<LOD	-	-
RS 5b	<LOD	-	-
RS 6b	<LOD	-	-
RS 7b	<LOD	-	-
RS 8b	<LOD	-	-
RS 9b	$1,0 \pm 0,1$	-	-
RS 10b	<LOD	-	-

Observando os valores encontrados de Se para todas as amostras, é possível discutir alguns pontos. Primeiramente, o conteúdo de Se presente em regiões no Norte do Brasil é maior daquele que pode ser encontrado nas regiões no Sul, em sua maioria, como mostra a Figura 12. Em relação aos níveis de profundidade, o Se está mais concentrado nas amostras coletadas mais próximas à superfície – com exceção apenas de duas amostras (MS1 e MS9). Considerando todos os outros resultados, é possível que essas duas amostras estejam de alguma forma contaminadas com Se ou sua coleta foi identificada de forma errada, pois o valor cresce conforme a profundidade também se eleva, quando o esperado era justamente o contrário (valor de Se deveria diminuir conforme a profundidade aumenta).

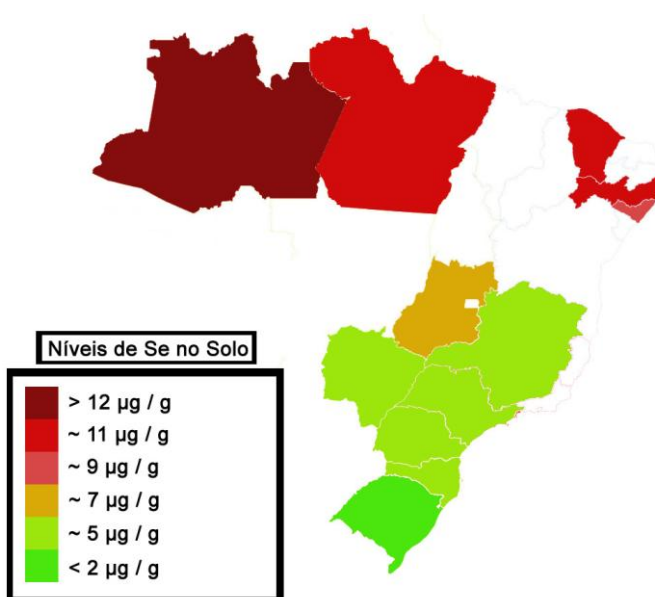


Figura 12. Mapa do Brasil com a indicação dos Estados analisados e as concentrações médias encontradas (valores absolutos) de Se em seus respectivos solos.

Para analisar estatisticamente os dados, decidiu-se separá-los por locais. A média e o desvio padrão das 10 amostras disponíveis em cada nível (a, b, c) foram calculados e o teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer, com um nível de confiança de 95%, aplicado. Obteve-se que a região de AL possui uma variação de resultados não significativa quando comparamos os dados dos três níveis de solo encontrados na região. MS, por sua vez, apresentou um perfil diferente: o solo mais profundo possui uma média menor quando comparada com as médias das profundidades superiores. No entanto, o desvio padrão é elevado (comparado com a e b). Apesar disso, os valores possuem uma variação significativa. O restante das regiões do país apresentou também uma variação significativa, exceto MG, SP e PE, por não terem os dados de solo completamente disponíveis como nas outras regiões. RS não foi comparado por apresentar valores abaixo do limite de detecção do método. A Figura 13 mostra as análises estatísticas de oito Estados brasileiros.

Assim, é possível afirmar que os resultados encontrados de Se em solo variam de forma significativa, dependendo, na maioria dos casos, do nível de profundidade. Ou seja, quanto mais profundo o nível de solo, tanto menos Se é encontrado (não importando seu estado de oxidação). Uma comparação estatística entre os Estados não foi realizada devido às amostras não estarem disponíveis em quantidades e níveis iguais para todas as regiões.

No entanto, é preciso ressaltar que mesmo com a determinação de todas as amostras disponíveis, o Brasil é um país gigantesco. Para poder realizar um trabalho que represente essa magnitude, seriam necessárias muito mais amostras e muito mais pontos de coleta. Todavia, com esses resultados obtidos é possível traçar uma provável abundância natural para o Se no Brasil.

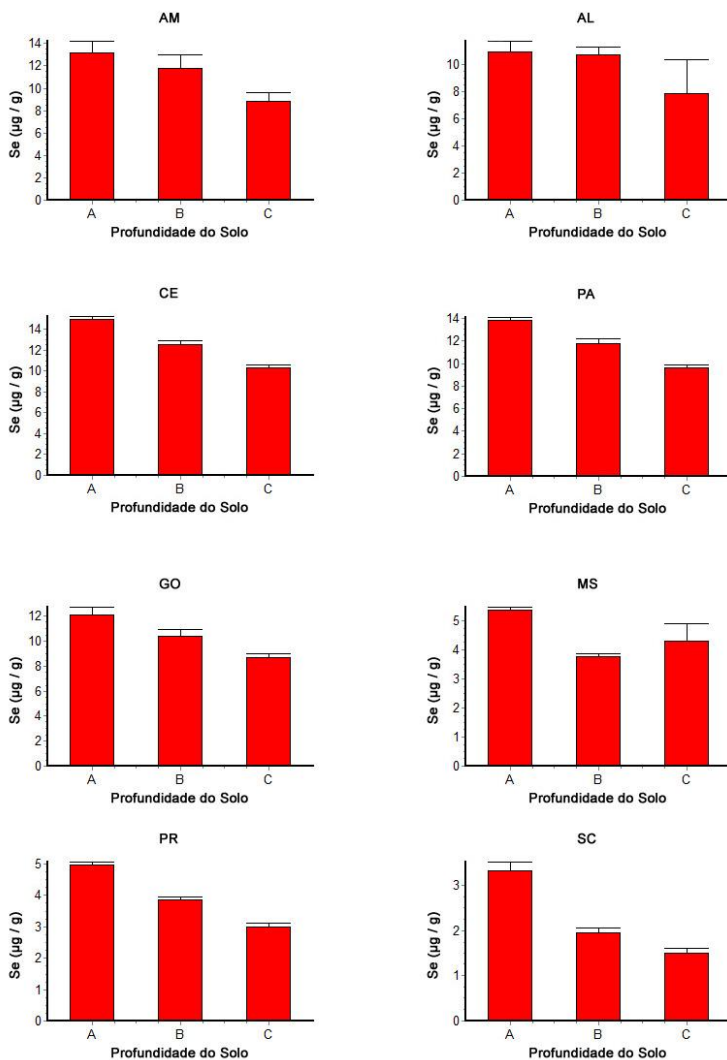


Figura 13. Gráficos com a média e o desvio padrão das análises de Se em cada nível de profundidade (A, B e C) das amostras de solo. Exceto AL, todos os outros estados apresentaram variação significativa nos valores.

4.3. Parte 3: determinação de Se em solo por HG-GF AAS após extração alcalina

4.3.1. Recobrimento do forno de grafite

No solo, Se está presente, na maioria dos casos, em forma de minerais, ou seja, em sua forma inorgânica. Porém, o Se também pode estar presente neles em compostos complexos orgânicos, como a selenometionina, o que exige condições extremas para que seja completamente mineralizado – uma pré-condição para as determinações utilizando HG-GF AAS. O estado de oxidação do Se é importante também, pois apenas Se(IV) forma hidretos gasosos; assim, uma etapa de redução é obrigatória se Se(VI) for formado durante a digestão. Finalmente, os diferentes parâmetros no procedimento de HG-GF AAS com aprisionamento *in situ* em um tubo de grafite recoberto com Ir precisam ser otimizados.

Aprisionamento *in situ* usando vazão contínua com a GF AAS [93] é uma técnica particularmente atrativa e é no momento o método via AAS mais sensível para a determinação de Se e outros elementos geradores de hidretos [94, 95]. O modificador permanente escolhido para este estudo foi o Ir, principalmente devido à sua eficiência estabelecida em trabalhos anteriores publicados na literatura não somente para Se, mas também para outros elementos [96].

4.3.2. Temperaturas de aprisionamento e atomização

Todos os experimentos para as otimizações das temperaturas foram realizados utilizando uma solução aquosa de $66 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se em modo vazão 12 mL min^{-1} por 15 segundos, alcançando uma massa absoluta de $0,2 \mu\text{g}$ de Se. Considerando que a geração de hidretos separa o analito da matriz [97, 98], não é preciso usar o CRM para otimizar o programa de temperatura; apenas as soluções padrões são necessárias. Os resultados obtidos pelos estudos do aprisionamento e atomização estão exibidos na Figura 14.

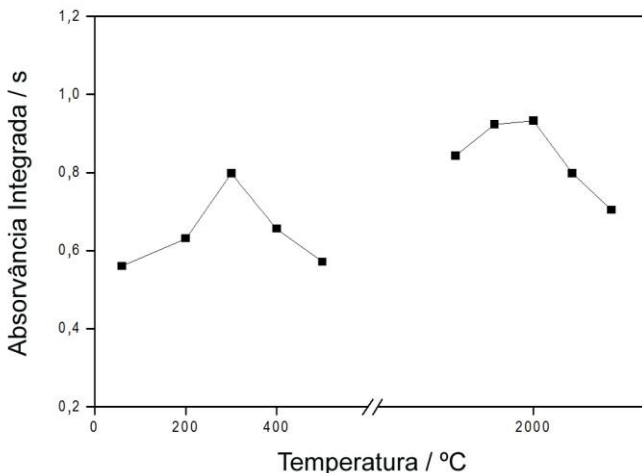


Figura 14. Curvas de temperaturas de aprisionamento e atomização usando 0,2 µg de Se (solução de padrão aquoso) aplicadas a tubo de grafite recoberto com 200 µg de Ir como modificador permanente. Para o aprisionamento, $T_{\text{atom}} = 2.100 \text{ } ^\circ\text{C}$; para a atomização, $T_{\text{apri}} = 300 \text{ } ^\circ\text{C}$.

O programa de temperatura é composto de estágios de aprisionamento e atomização, com o tempo de integração fixado em 3 segundos durante a atomização, seguido de uma etapa de limpeza. No estágio de aprisionamento, quando os hidretos estão pré-concentrados no forno de grafite pela interação com o modificador permanente Ir, as temperaturas foram estudadas entre 60 e 500 °C, sendo que o melhor resultado foi observado em 300 °C. Temperaturas acima de 300 °C mostraram uma perda de sinal, provavelmente devido às interações menores entre o hidreto e o modificador permanente. Assim, a temperatura de atomização foi otimizada usando uma T_{apri} de 300 °C. O melhor valor encontrado foi com 2.000 °C, sendo uma temperatura menor em apenas 100 °C em um trabalho anterior a este [14].

4.3.3. Otimização da solução alcalina extratora

O objetivo deste trabalho foi usar uma solução alcalina para a extração total de Se do solo. Em pH básico, ácidos húmicos e fúlvicos e outros compostos da matéria orgânica, que possam conter quantidades

consideráveis de Se ligados, são solubilizados e o Se torna-se disponível na solução [99, 100]. Dessa forma, o elemento pode ser separado da matriz e determinado por HG-GF AAS. Neste estudo, diferentes concentrações de solução extratora de NaOH foram avaliadas e resultados satisfatórios foram alcançados usando $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, como é mostrado na Figura 15. Para concentrações de NaOH maiores que $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ os valores de absorvância integrada não sofreram alterações, mostrando, portanto, que a extração mais eficiente foi obtida usando essa concentração. A concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH usada neste trabalho é cinco vezes maior que a encontrada por Kang *et al.* [99], em cujo trabalho os autores reportam que a eficiência de extração para Se do solo aumenta em conformidade com o aumento da concentração de NaOH. Nesse mesmo trabalho, há evidência de que uma grande parte do Se total foi recuperada em uma única extração com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Assim, usando $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, todo o Se foi provavelmente extraído em uma única etapa.

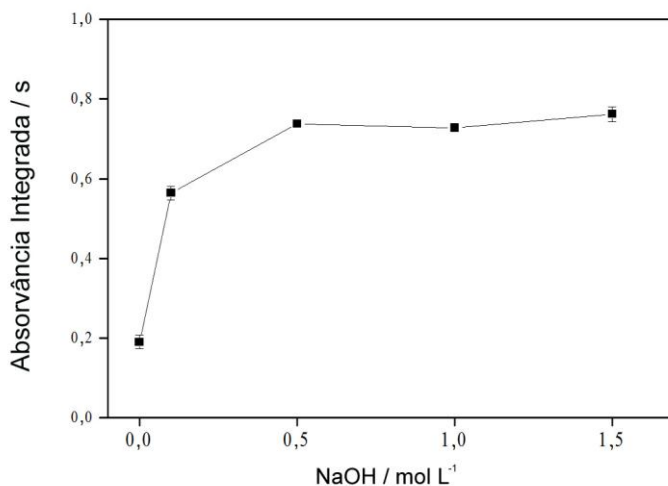


Figura 15. Curva de otimização para a extração alcalina de uma suspensão feita com 0,6 g do CRM MURST-ISS-A1 (cerca de $0,2 \mu\text{g}$ de Se) e 20 mL de solução extratora de NaOH; após 24 h de repouso em temperatura ambiente e 20 min em banho ultrassom.

4.3.4. Otimização da geração de hidreto

A concentração de NaBH_4 foi otimizada na faixa entre 5 e 15 g L^{-1} e a concentração de NaOH em 5 g L^{-1} , fixando o volume da solução $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ em 6,6 mL. Os resultados estão exibidos na Figura 16. A concentração de NaOH na solução redutora não precisa ser otimizada porque publicações anteriores mostraram que o NaOH só é adicionado ao agente redutor para estabilizar o NaBH_4 em solução [14]. A absorvância integrada aumentou consideravelmente quando a concentração do agente redutor aumentou para 10 g L^{-1} e permaneceu constante acima dessa condição. Assim, a concentração de 10 g L^{-1} (1% m/v) de NaBH_4 foi escolhida como sendo a concentração do agente redutor.

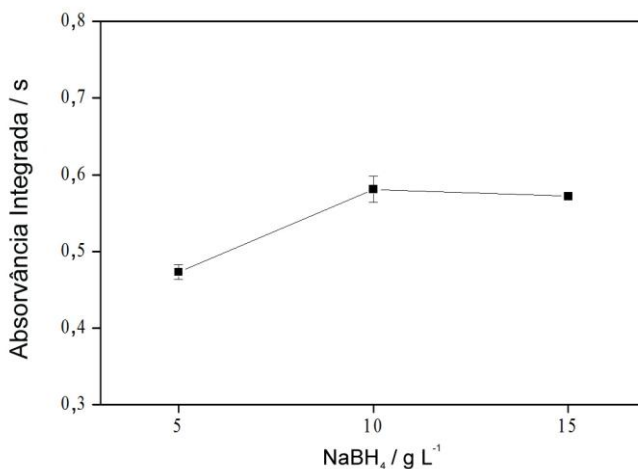


Figura 16. Influência da concentração da solução redutora (NaBH_4) no sinal de Se usando uma suspensão de 0,3 g de CRM MURST-ISS-A1 (cerca de 0,2 μg de Se). Condições: 20 mL de 0,5 mol L^{-1} de NaOH após 24 h de repouso em temperatura ambiente e 20 min de banho ultrassom. Concentração de NaOH 0,5% (m/v); HCl 3,0 mol L^{-1} .

A concentração de HCl para a reação de geração de hidreto foi estudada. Foram usados 6,6 mL de uma solução de HCl com concentração entre 1 e 4 mol L⁻¹ e os resultados estão presentes na Figura 16. A presença de prótons na reação é essencial para a formação do hidreto de Se(IV). Uma vez que as amostras contêm alta concentração de OH⁻, a concentração de HCl é necessária para neutralizar a amostra e reagir com o agente redutor e o analito. Dessa forma, a Figura 17 mostra que as concentrações de HCl abaixo de 2 mol L⁻¹ não são suficientes para neutralizar todos os íons hidróxido presentes na amostra e para reduzir as espécies de Se(IV) para o hidreto. Entretanto, quando concentrações acima de 2 mol L⁻¹ foram empregadas, os valores estavam em seu máximo, garantindo que os dois processos estavam completos. Portanto, 3 mol L⁻¹ foi escolhido como sendo a concentração de HCl para os estudos seguintes.

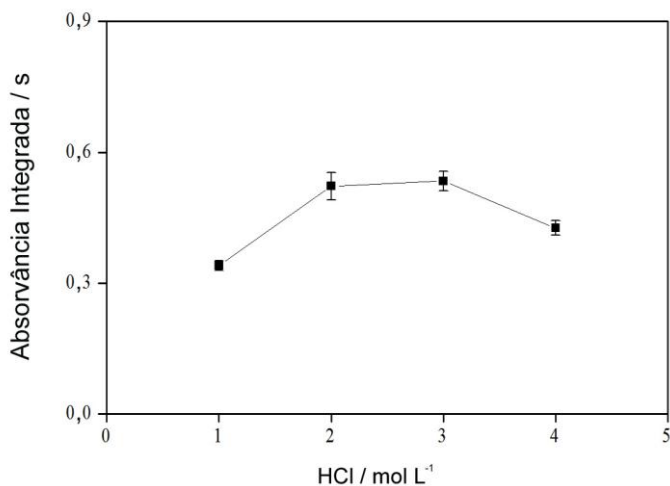


Figura 17. Otimização da concentração de HCl para a determinação de Se em solo via suspensão usando 0,6 g de CRM MURST-ISS-A1 (cerca de 0,2 µg de Se). Condições: 20 mL de 0,5 mol L⁻¹ de NaOH após 24 h de repouso em temperatura ambiente e 20 min de banho ultrassom. Concentração de NaBH₄ / NaOH de 10 g L⁻¹ / 0,5 % (m/v).

4.3.5. Influência do tempo de repouso e de agitação

Os tempos de repouso e de agitação também foram avaliados. Ambas as variáveis foram otimizadas com parâmetros fixados anteriormente, e a influência do tempo de repouso e com agitação na extração de Se pode ser vista na Figura 18.

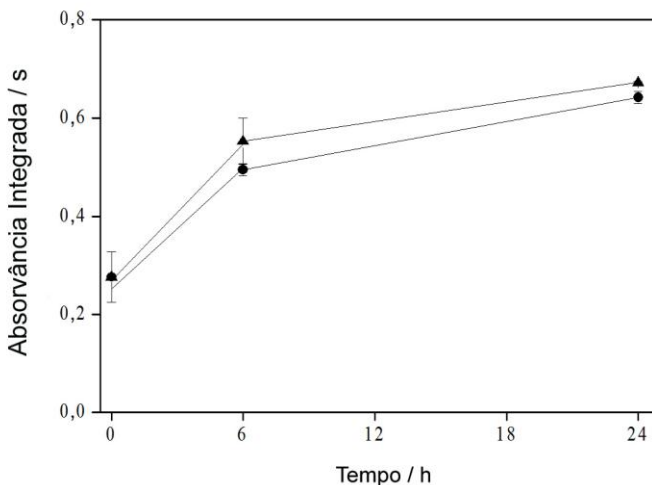


Figura 18. Influência do repouso e da agitação na extração de Se comparado a banho de ultrassom; realizado com 0,6 g de CRM MURST-ISS-A1 (cerca de 0,2 μg de Se). Condições: 20 mL de NaOH 0,5 mol L^{-1} . Após 0, 6 e 24 h de repouso (●) ou com agitação (▲). Concentração para NaBH_4 / NaOH de 10 g L^{-1} / 0,5 % m/v. Concentração de HCl de 3,0 mol L^{-1} .

As amostras foram medidas com três tempos diferentes entre 0 e 24 h, com uma amostra em repouso a temperatura ambiente e a outra com agitação magnética. O tempo ideal de repouso usando NaOH como solução extratora foi 24 h, enquanto o método de agitação não mostrou diferença significativa quando em comparação com o método de repouso. Com a intenção de reduzir o tempo gasto para o preparo de amostra, a possibilidade de usar um banho de ultrassom ao invés de

tempo de repouso também foi avaliada, e um tempo de sonificação de até 60 min foi considerado usando condições previamente fixadas.

A extração com ultrassom foi proposta por Pumure *et al.* [100], que usou essa abordagem na extração de Se de amostras de carvão. Os autores encontraram resultados interessantes usando cerca de 25 min de ultrassom e diferentes solventes. Neste caso, talvez por diferença intrínseca de matrizes, usando apenas ultrassom obteve-se um sinal menor àquele alcançado com o procedimento que usa o repouso. Assim, o uso do ultrassom não foi suficiente para extrair todo o Se da amostra, e a condição de 24 h de repouso teve de ser adotada para garantir que todo o Se fosse extraído das amostras de solo. Entretanto, o banho de ultrassom foi empregado por 30 min antes da análise para garantir uma extração total de Se devido à sua habilidade de solubilizar complexos inorgânicos [100].

4.3.6. Parâmetros de mérito

Após a otimização de todas as condições analíticas, uma curva de calibração foi estabelecida e os parâmetros de mérito foram determinados. A equação de regressão linear, R, m_0 , LOD e LOQ para Se estão exibidos na Tabela 14. O branco foi medido usando uma amostra contendo apenas água e a solução extratora NaOH.

Tabela 14. Parâmetros de mérito para a determinação de Se com HG-GF AAS.

Parâmetro	Se
Equação da Reta	$A_{\text{int}} = 0,00842 m_{\text{Se}} + 0,143$
R	0,9990
LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$	6
LOQ / $\mu\text{g L}^{-1}$	20
m_0 / pg	35

4.3.7. Análises e fracionamento das amostras

A eficiência da extração proposta foi verificada usando HR-CS GF AAS – método desenvolvido na primeira etapa deste trabalho – e comparada com os resultados obtidos por outra técnica (via digestão) de HG-GF AAS [14] e também pela mesma técnica de HR-CS GF AAS, mas com análise direta de sólidos. O método proposto foi aplicado aos CRMs MURST-ISS-A1 e BCR 142R. Ambos os resultados para o Se total ficaram de acordo com os valores de referência de $2,2 \pm 0,1$ e $0,53 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, como mostrado na Tabela 12.

Como mencionado anteriormente, Se(0) e Se(-II) são pouco solúveis e todo o Se solúvel (IV e VI) foi extraído. Assim, a concentração de Se(VI) foi calculada pela subtração de Se(IV), determinada por HG-GF AAS, do Se total, determinado por HR-CS GF AAS, sendo os dois casos via extração alcalina. O Se(VI) calculado, Se(IV) determinado e o Se total estão mostrados na Tabela 15.

Apesar de o número de amostras analisado nesta etapa do trabalho não ser suficiente para uma avaliação estatística, há algumas observações interessantes que devem ser discutidas brevemente. As amostras dos Estados do Amazonas e Minas Gerais tiveram a maior concentração de Se, enquanto os valores de Santa Catarina foram os menores; entretanto, não há um padrão geral para a distribuição de Se sobre as três camadas investigadas (“a” sendo 0 – 7,5; “b” 7,5 – 15 cm e “c” 15 – 30 cm). Em contraste a isso, o conteúdo de Se(VI) possui uma tendência nas amostras investigadas; a concentração de Se (VI) foi maior na camada “a”, quando comparado com as camadas mais profundas. As plantas estão mais disponíveis em níveis mais próximos da superfície e consequentemente Se(VI) também está em um valor de concentração maior. Assim, as amostras mais profundas possuem valores menores de Se(VI) – isso vai ao encontro do esperado e ilustrado pelo ciclo do Se da Figura 3.

Tabela 15. Resultados obtidos para a determinação de Se em amostras de solo e CRM por diferentes técnicas; todos os valores determinados são a média \pm o desvio padrão de $n = 3$.

Amostra	Valor de referência / $\mu\text{g g}^{-1}$	Se Total / $\mu\text{g g}^{-1}$				Se(VI) Estimado
		HR-CS SS-GF AAS	HR-CS GF AAS	Se(IV) HG-GF AAS		
AM 1a	-	19,0 \pm 3,0	16,0 \pm 1,0	1,91 \pm 0,32	14,1 \pm 1,0	
AM 1b	-	17,5 \pm 4,0	15,0 \pm 1,5	3,01 \pm 0,13	11,9 \pm 1,5	
AM 1c	-	10,5 \pm 2,5	9,5 \pm 1,5	3,50 \pm 0,03	6,0 \pm 1,5	
AM 9a	-	7,00 \pm 0,5	6,80 \pm 0,30	1,83 \pm 0,54	5,0 \pm 0,6	
AM 9b	-	5,50 \pm 0,5	5,55 \pm 0,50	2,14 \pm 0,14	3,4 \pm 0,5	
SC 1a	-	4,70 \pm 0,5	4,80 \pm 0,50	0,30 \pm 0,10	4,5 \pm 0,6	
SC 1b	-	1,20 \pm 0,10	1,30 \pm 0,10	0,32 \pm 0,19	1,0 \pm 0,2	
SC 1c	-	0,10 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0,09 \pm 0,07	<LOD	
SC 9a	-	1,50 \pm 0,05	1,40 \pm 0,05	0,24 \pm 0,14	1,2 \pm 0,15	
SC 9b	-	0,25 \pm 0,03	0,28 \pm 0,03	0,28 \pm 0,04	<LOD	
MS 1a	-	5,00 \pm 0,35	5,10 \pm 0,25	0,19 \pm 0,08	4,9 \pm 0,3	
MS 1b	-	3,50 \pm 0,55	3,40 \pm 0,30	0,44 \pm 0,02	3,0 \pm 0,3	
MS 1c	-	6,80 \pm 0,25	6,50 \pm 0,25	7,01 \pm 0,23	<LOD	
MS 5a	-	0,90 \pm 0,10	1,10 \pm 0,10	0,32 \pm 0,19	0,8 \pm 0,2	
MS 5b	-	0,40 \pm 0,05	0,35 \pm 0,10	0,41 \pm 0,04	<LOD	
MG 5a	-	10,3 \pm 1,5	10,25 \pm 0,5	2,41 \pm 0,08	7,8 \pm 0,5	
MG 5b	-	9,5 \pm 2,5	8,5 \pm 1,0	3,77 \pm 0,37	4,7 \pm 1,1	
MG 9c	-	12,5 \pm 0,15	12,0 \pm 0,1	10,5 \pm 1,3	1,5 \pm 1,2	
S01	-	0,63 \pm 0,15	0,65 \pm 0,10	0,56 \pm 0,03	<LOD	
S07	-	0,55 \pm 0,02	0,6 \pm 0,1	0,62 \pm 0,46	<LOD	
MURST-ISS-A1	2,2 \pm 0,1	2,05 \pm 1,5	2,10 \pm 0,20	2,23 \pm 0,12	<LOD	
BCR 142R	0,53 \pm 0,12	0,52 \pm 0,1	0,51 \pm 0,03	0,53 \pm 0,05	<LOD	

5. CONCLUSÕES

Através da aplicação de análise direta de sólidos e de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite, desenvolveu-se na primeira parte do presente trabalho um método para determinar a concentração de Se em amostras de solo. A análise direta de solos evidencia que esse procedimento apresenta o benefício de não necessitar do uso de ácidos tóxicos ou corrosivos e de não gerar descartes nocivos ao meio ambiente. De mais a mais, é um processo rápido que, excetuando maceramento e filtragem – a serem também inevitavelmente realizados antes de uma digestão de amostra ou de uma extração alcalina – não requer preparo de amostra. Por sua vez, a calibração pode ser feita com padrões aquosos, simplificando, dessa forma, o procedimento. Entretanto, nenhuma previsão deverá ser aventada no que tange à possível aplicação do método apresentado a outros analitos e outras matrizes. Este trabalho, em todo caso, foi inovador, ao permitir a determinação de Se em solo e sedimentos usando HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos – desafio esse que perdurava por anos na área dessa técnica.

Na segunda parte deste trabalho, foram determinados os valores de Se em diversas amostras de solo coletadas em 12 Estados brasileiros. Verificaram-se concentrações de Se mais elevadas nos solos provenientes da região Norte e mais escassas nos solos da região Sul, o que pode ser interpretado como indício de uma tendência no que tange à distribuição e à abundância natural de Se pelo país. Os dados foram analisados estatisticamente e apresentaram uma mudança significativa dependendo do nível de profundidade de onde o solo foi coletado.

Por fim, na terceira parte deste trabalho foi desenvolvido um novo método para a determinação de Se(IV) usando extração alcalina em amostras de solo. As determinações foram feitas usando espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos com aprisionamento e atomização em forno de grafite. A determinação de Se(IV) tornou possível calcular a quantidade de Se(VI) através da subtração do Se total, determinado pelo método previamente desenvolvido. A verificação da exatidão foi realizada comparando o método proposto com os resultados obtidos via HR-CS SS-GF AAS. A baixa concentração de NaOH usada para as extrações reduz o volume de resíduos e o risco associado a eles. O uso de equipamento de laboratório,

como forno de micro-ondas ou blocos digestores, também se torna desnecessário.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TROFAST, J. Berzelius' Discovery of Selenium. **Chemistry International**, v. 33, 2011.
2. US Institute of Medicine, **Food and Nutrition Board**, 2000.
3. OLDFIELD, J.E. **Selenium World Atlas**, Selenium and Tellurium Development Association, 2002.
4. FISHBEN, L. Selenium, in: E. Merian (Ed.), **Metals and their Compounds in the Environment**, VCH, Weinheim, 1991.
5. SEIXAS, T. G.; MOREIRA, I.; KEHRIG, H. A. e MALM, O. Distribuição de selênio em organismos marinhos da Baía de Guanabara / RJ. **Quim. Nova**, v.30, n.3, p. 554-559, 2007.
6. HAMILTON, S.J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Sci. Total Environ.**, v. 326, p. 1-31, 2004.
7. FERNANDEZ-MARTINEZ,, A.; CHARLET, L. Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 8, p. 81-110, 2009.
8. WALLSCHLAEGER, D.; FELDMANN, J. Formation, occurrence, significance, and analysis of organoselenium and organotellurium compounds in the environment. **Organometallics in Environment and Toxicology**, Sigel, A., Royal Society of Chemistry: Cambridge, Reino Unido, v. 7, p. 319-364, 2010.
9. ZWOLAK, I.; ZAPOROWSKA, H. Selenium interactions and toxicity: A review. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 28, p. 31-46, 2012.

10. PICKERING, I.J.; LIN, Z. Q.; CERVINKA, V.; ZAYED, A.; TERRY, N. Managing selenium-contaminated agricultural drainage water by the integrated on-farm drainage management system: role of selenium. **Water Research**, v.36, p.3150, 2002.
11. GERWIGA, H. Umweltchemie und Ökotoxikologie Jahrestagung, **Quo vadis Umweltforschung**, v. 4, Halle: Saale, 2006.
12. OLDFIELD, J.E. **Selenium World Atlas**, selenium-tellurium development association (STDA), 1999.
13. COZZOLINO, S.M.F.; MARTENS, A. Mapeamento da Distribuição de Selênio em Território Brasileiro por meio da Análise de Alimentos Nativos: Feijão e Carne Bovina para Consumo Humano e Águas e Solos Oriundas; **Projeto FAPESP No. 00/11699-5 e Processo FAPESP No. 00/11578-3**; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental; São Paulo, 2004.
14. SHALTOUT, A.A., CASTILHO, I.N.B., WELZ, B., CARASEK, E., MARTENS, I.B.G., MARTENS, A, COZZOLINO, S.M.F. Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry, **Talanta**, v. 85, p. 1350-1356, 2011.
15. BORGES, D. L. G., CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, n. 18, p. 58-67, 2005.

16. WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3^a ed., Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
17. HIEFTJE, G. M. Atomic absorption spectrometry—has it gone or where is it going? **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 4, p. 117, 1989.
18. HEITMANN, U.; SCHÜTZ, M.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK S. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochim. Acta, Part B**, 51, p.1095-1105, 1996.
19. WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High-Resolution Continuum Source AAS**, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
20. WELZ, B., VALE, M. G. R.; BORGES, D. L. G.; HEITMANN, U. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, p. 2085-2095, 2007.
21. LACHAS, H; RICHAUD, R.; HEROD, A.A.; DUGWELL, D.R.; KANDIYOTI, R.; JARVIS, K.E. Determination of 17 trace elements in coal and ash reference materials by ICP-MS applied to milligram sample sizes. **Analyst**, v.124, p.177-184, 1999.
22. MALEKI, N.; SAFAVI, A.; DOROODMAND, M. M. Determination of selenium in water and soil by hydride generation atomic absorption spectrometry using solid reagents. **Talanta**, v. 66, p. 858-862, 2005.
23. 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**, São Paulo, v. 1, n. 9, p.30-38, 2004.
24. HASWELL, S.; MENDHAM, J.; BUTLER, M. J.; SMITH, D.C. Determination of arsenic in solid samples by cold acid solubilization hydride generation atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 3, p. 731-734, 1988.
25. PEAK, D. Adsorption mechanisms of selenium oxyanions at the aluminum oxide/water interface, **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 303, p. 337-345, 2006.
26. WANG, H.; ZHANGA, H.; GAOA, P.; GUOA, X. Simultaneous determination of selenium containing amino acids and their sulfur-analogues in green tea and gynostemma pentaphyllum infusion with high performance liquid chromatography based on fluorescence labeling. **Microchem. J.**, v 110, p.192-197, 2013.
27. GUO, W.; SHENGHONG, H.; YANXIN, W.; LUYUAN, Z.; ZHAOCHU H.; JIANGYI Z.. Trace determination of selenium in biological samples by CH₄-Ar mixed gas plasma DRC-ICP-MS. **Microchem. J.**, v. 8, p.106-112, 2013.
28. DADFARNIA, S; NOZOHOR, M; SHABANI, A. M. H. Indirect spectrophotometric determination of ultra trace amounts of selenium based on dispersive liquid-liquid microextraction-solidified floating organic drop. **Spectrochim. Acta, Part A**, v. 116, p.1-5, dez. 2013.
29. TYBURSKA, A.; JANKOWSKI, K. Determination of selenium in dietary supplements by optical emission spectrometry after alkaline

- dissolution and subsequent headspace solid phase microextraction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 74, p.268-272, 2013.
30. U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**, Nutrient Data Laboratory, v. 25, 2012.
 31. WELZ, B.; MELCHER, M.; SCHLEMMER, G. Determination of selenium in human blood serum. Comparison of two atomic-absorption spectrometric procedures. **Frenesius J. Anal. Chem.**, v. 316, p. 271, 1983.
 32. LEBIHAN, A.; CABON, J. Y.; ELLEOUET, C. Spectral Interference related to the presence of nitrate and nitrogen monoxide in Zeeman-corrected atomic-absorption spectrometry with electrothermal atomization. **Analisis**, v. 20, p. 601-604, 1992.
 33. RADZIUK, B., THOMASSEN, Y. Chemical modification and spectral interferences in selenium determination using Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 7, p. 397, 1992.
 34. SHUTTLE, I. L.; FEUERSTEIN, M.; SCHLEMMER, G. Communication. Long-term stability of a mixed palladium–iridium trapping reagent for in situ hydride trapping within a graphite electrothermal atomizer. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 7, p. 1299-1301, 1992.
 35. HANNA, C. P.; CARNRICK, G. R.; MCINTOSH, S. A.; GUYETTE, L. C; BERGEMANN, D. E. Determination of total Hg in environmental samples with on-line microwave digestion coupled

- to a flow injection mercury system (FIMS). **At. Spectrosc.**, v. 16, p. 82, 1995.
36. TSALEV, D. L.; D'ULIVO, A.; LAMPUGNANI, L.; DI MARCO, M.; ZAMBONI, R. Thermally stabilized iridium on an integrated, carbide-coated platform as a permanent modifier for hydride-forming elements in electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 1. Optimization studies. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 10, p. 1003, 1995.
37. TSALEV, D. L., D'ULIVO, A.; LAMPUGNANI, L.; DI MARCO, M.; ZAMBONI, R. Thermally stabilized iridium on an integrated, carbide-coated platform as a permanent modifier for hydride-forming elements in electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 2. Hydride generation and collection, and behaviour of some organoelement species. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 11, p.979, 1996.
38. WELZ, B.; WOLYNETZ, M. S.; VERLINDEN, M. Interlaboratory trial on the determination of selenium in lyophilized human serum, blood and urine using hydride generation atomic absorption spectrometry. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, p. 927, 1987.
39. LAN, W. G.; MING, K.; SIN, Y. M. Comparison of four microwave digestion methods for the determination of selenium in fish tissue by using hydride generation atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 41, p. 125, 1994.
40. LAVILLA, I.; COSTAS, J. M. G., BENDICHO, C. Improved microwave-assisted wet digestion procedures for accurate Se determination in fish and shellfish by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 591, p. 2250, 2007.

41. SINEMUS, H. W.; MELCHER, M.; WELZ, B. Influence of valence state on the determination of antimony, arsenic, bismuth, selenium and tellurium in lake water using the hydride AA technique. **At. Spectrosc.**, v. 2, p. 81, 1981.
42. WELZ, B.; MELCHER, M. Decomposition of Marine Biological Tissues for Determination of Arsenic, Selenium, and Mercury Using Hydride-Generation and Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrometries. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 427-431, 1985.
43. KRIVAN, V.; PETRICK, K.; WELZ, B.; MELCHER, M. Radiotracer error-diagnostic investigation of selenium determination by hydride-generation atomic absorption spectrometry involving treatment with hydrogen peroxide and hydrochloric acid. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 1703, 1985.
44. STURGEON, R. E.; GRINBERG, P. Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 27, p. 222-231, 2012.
45. BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Sample pre-treatment methods for the trace elements determination in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 57, p. 327, 2002.
46. BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS—determination of selenium and arsenic in human urine. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 15, p. 137-141, 2000.

47. BOHRER, D.; BECKER, E.; NASCIMENTO, P. C.; DESSUY, M.; CARVALHO, L. M. C. Comparison of graphite furnace and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of selenium status in chicken meat. **Food Chem.**, v. 104, p. 868, 2007.
48. MEI, L.; ZHE-MING, N.; ZHU, R. Determination of selenium in biological tissue samples rich in phosphorus using electrothermal atomization with Zeeman-effect background correction and $(\text{NH}_4)_3\text{RhCl}_6$ +citric acid as a mixed chemical modifier. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 53, p. 1381, 1998.
49. ZANÃO, R.; BARBOSA, F.; SAMUEL, S., KRUG, F.; ABDALLA, A. L. Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W–Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 57, p.291, 2002.
50. GARDINER, P. H. E.; LITTLEJOHN, D.; HALLS, D. J.; FELL, G. S. Direct determination of selenium in human blood serum and plasma by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 9, p. 74, 1995.
51. WINKEL, L. H. E.; VRIENS, B.; JONES, G. D.; SCHNEIDER, L. S.; PILON-SMITHS, E.; BAÑUELOS, G. S. Selenium Cycling Across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. **Nutrients**, v. 7, p. 4199-4239, 2015.
52. ALFTHAN, G.P.; ASPILA, P.; EKHYOLM, M.; HARTIKAINEN, H.; HERO, H.; HIETANIEMI, V.; ROOT, T.; SALMINEN, P.; VENÄLÄINEN, E.-R.; ARO, A. Nationwide supplementation of sodium selenate to commercial fertilizers: History and 25 year

- results from the Finnish selenium monitoring program. **Combating Micronutrient Deficiencies: Food-Based Approaches**, FAO/CAB International, Roma, Itália, 2011.
53. HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 18, p. 309-318, 2005.
 54. LYONS, G. Selenium in cereals: Improving the efficiency of agronomic biofortification in the UK. **Plant Soil**, 2010, 332, 1–4.
 55. RAYMAN, M.P. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, p. 1256-1268, 2012.
 56. CURTIN, D.; HANSON, R.; LINDLEY, T.N.; BUTLER, R.C. Selenium concentration in wheat grain as influenced by method, rate, and timing of sodium selenate application. **N. Z. J. Crop Hort.**, v. 34, p. 324–339, 2006.
 57. BAÑUELOS, G. S.; ARROYO, I.; PICKERING, I. J.; YANG, S. I.; FREEMAN, J. L. Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched hyperaccumulator *Stanleya pinnata*. **Food Chem.**, v. 166, p. 603-608, 2015.
 58. BAÑUELOS, G. S. Irrigation of broccoli and canola with boron and selenium laden effluent. **J. Environ. Qual.**, v. 31, p. 1802–1808, 2002.
 59. BAÑUELOS, G. S.; FREEMAN, J. L. Coping with naturally-high levels of soil salinity and boron in the westside of central California. **Perspect. Sci.**, v. 3, p. 4-6, 2015.
 60. THIRY, C.; SCHNEIDER, Y-J.; PUSSEMIER, L.; DE TEMMERMAN, L.; RUTTENS, A. Selenium bioaccessibility and

- bioavailability in Se-enriched food supplements. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 152, p. 152–160, 2013.
61. POBLACIONES, M.J.; RODRIGO, S.; SANTAMARÍA, O.; CHEN, Y.; MCGRATH, S.P. Agronomic selenium biofortification in triticum durum under mediterranean conditions: From grain to cooked pasta. **Food Chem.**, v. 146, p. 378–384, 2014.
 62. KÁPOLNA, E.; HILLESTROM, P.R.; LAURSEN, K.H.; HUSTED, S.; LARSEN, E.H. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. **Food Chem.**, v. 115, p. 1357–1363, 2009.
 63. KÁPOLNA, E.; LAURSEN, K.H.; HUSTED, S.; LARSEN, E.H. Bio-fortification and isotopic labelling of Se metabolites in onions and carrots following foliar application of Se and ⁷⁷Se. **Food Chem.**, v. 133, p. 650–657, 2012.
 64. FERNANDEZ-MARTINEZ, A.; CHARLET, L. Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 8, p. 81–110, 2009.
 65. NAKAMARU, Y.M.; ALTANSUVD, J. Speciation and bioavailability of selenium and antimony in non-flooded and wetland soils: A review. **Chemosphere**, v. 111, p. 366–371, 2014.
 66. LE HÉCHO, I.; TOLU, J.; THIRY, Y.; BUENO, M.; POTIN-GAUTIER, M. **Influence of selenium speciation and fractionation on its mobility in soils**. CRC Press: Boca Raton, Flórida, EUA, p. 216–230, 2012.

67. WENG, L.; VEGA, F.A.; SUPRIATIN, S.; BUSSINK, W.; VAN RIEMSDIJK, W.H. Speciation of Se and DOC in soil solution and their relation to Se bioavailability. **Environ. Sci. Technol.**, v. 45, p. 262–267, 2011.
68. SÉBY, F.; POTIN-GAUTIER, M.; GIFFAUT, E.; BERGE, G.; DONARD, O.F.X. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25 °C. **Chem. Geol.**, v. 171, p. 173–194, 2001.
69. BUCHS, B.; EVANGELOU, M.H.W.; WINKEL, L.H.E.; LENZ, M. Colloidal properties of nanoparticulate biogenic selenium govern environmental fate and bioremediation effectiveness. **Environ. Sci. Technol.**, v. 47, p. 2401–2407, 2013.
70. ESZENYI, P.; SZTRIK, A.; BABKA, B.; PROKISCH, J. Elemental, Nano-Sized (100–500 nm) Selenium production by probiotic lactic acid bacteria. **J. Biosci. Biochem. Bioinform.**, v. 1, p. 148–152, 2011.
71. DHANJAL, S.; CAMEOTRA, S.S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. **Microb. Cell Fact.**, v. 9, p. 52, 2010.
72. TAM, K.; HO, C.T.; LEE, J.H.; LAI, M.; CHANG, C.H.; RHEEM, Y.; CHEN, W.; HUR, H.G.; MYUNG, N.V. Growth mechanism of amorphous selenium nanoparticles synthesized by *Shewanella* sp. HN-41. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 74, p. 696–700, 2010.
73. LENZ, M.; VAN AELST, A.C.; SMIT, M.; CORVINI, P.F.X.; LENS, P.N.L. Biological production of selenium nanoparticles from waste waters. **Adv. Mat. Res.** v. 71–73, p. 721–724, 2009.

74. CHASTEEN, T.G.; BENTLEY, R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. **Chem. Rev.**, v. 103, p. 1-25, 2003.
75. PEAK, D.; SPARKS, D.L. Mechanisms of selenate adsorption on iron oxides and hydroxides. **Environ. Sci. Technol.** v. 36, p. 1460–1466, 2002.
76. BRUGGEMAN, C.; MAES, A.; VANCLUYSEN, J. The interaction of dissolved boom clay and gorleben humic substances with selenium oxyanions (selenite and selenate). **Appl. Geochem.**, v. 22, p. 1371–1379, 2007.
77. SÉBY, F.; GAUTIER, M. P.; LESPE, G.; ASTRUC, M. Selenium speciation in soils after alkaline extraction. **Sci. Total Environ.**, v. 207, p. 81–90, 1997.
78. SHAND, C.A.; ERIKSSON, J.; DAHLIN, A.S.; LUMSDON, D.G. Selenium concentrations in national inventory soils from scotland and sweden and their relationship with geochemical factors. **J. Geochem. Explor.**, v 121, p. 4–14, 2012.
79. LEVESQUE, M. Some aspects of selenium relationships in eastern canadian soils and plants. **Can. J. Soil Sci.**, v. 54, p. 205–214, 1974.
80. DARCHEVILLE, O.; FÉVRIER, L.; HAICHAR, F.Z.; BERGE, O.; MARTIN-GARIN, A.; RENAULT, P. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. **J. Environ. Radioact.**, v. 99, p.981–992, 2008.

81. COPPIN, F.; CHABROULLET, C.; MARTIN-GARIN, A. Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolated from a natural grassland soil. **Eur. J. Soil Sci.**, v. 60, p. 369–376, 2009.
82. NAKAMARU, Y. M.; ALTANSUVD, J. Speciation and bioavailability of selenium and antimony in non-flooded and wetland soils: A review. **Chemosphere**, v. 111, p. 366–371, 2014.
83. SUPRIATIN, S.; LIPING, W.; COMANS, R. N. J. Selenium speciation and extractability in Dutch agricultural soils. **Sci. Total Environ.**, v. 532, p. 368–382, 2015.
84. TOLU, J., HÉCHO, I. L.; BUENO, M.; THIRY, Y.; POTIN-GAUTIER, M. Selenium speciation analysis at trace level in soils. **Anal. Chim. Acta**, v. 684, p. 126–133, 2011.
85. STROUD, J. L.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. Selenium speciation in soil extracts using LC–ICPMS. **J. Environ. Anal. Chem.**, v. 92, p. 222–236, 2012.
86. GHASEMIA, E.; NAJAFIA, N. M.; RAOFIEA, F.; GHASSEMPOURB, A. Simultaneous speciation and preconcentration of ultra traces of inorganic tellurium and selenium in environmental samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to electrothermal atomic absorption spectroscopy determination. **J. Hazard. Mater.**, v. 181, p. 491–496, 2010.
87. SAYGI, K.O.; MELEK, E.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Speciation of selenium(IV) and selenium(VI) in environmental samples by the combination of graphite furnace atomic absorption spectrometric

- determination and solid phase extraction on dianion HP-2MG. **Talanta**, v. 71, p.1375–1381, 2007.
88. CASIOT, C.; CARMEN, M.; ALONSO, B.; BOISSON, J.; DONARDA, O.F.X.; GAUTIERA, M.P. Simultaneous speciation of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in FT waters and soil extracts by capillary electrophoresis and UV detection. **Analyst**, v. 123, p. 2887–2893, 1998.
89. FERRI, T.; ROSSI, S.; SANGIORGIO, P. Simultaneous determination of the speciation of selenium and tellurium in geological matrices by use of an iron(III)-modified chelating resin and cathodic stripping voltammetry. **Anal. Chim. Acta**, v. 361, p. 113–123, 1998.
90. WANG, D.; SIPPOLA, J. Selenium in soil extracts and plants determined by flourometry. **Ann. Agric. Fenn.**, v. 29, p. 151–156, 1990.
91. ARAUJO, R. G. O.; WELZ, B.; VIGNOLA, F.; BECKER-ROSS, H. Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry—Determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling. **Talanta**, v. 80, p. 846, 2009.
92. KURFÜRST, U., General aspects of the graphite furnace solid sampling method. **Solid sample analysis**, Berlin: Springer, Heidelberg, p. 21-127, 1998.
93. BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M. Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry configurations:

- recent developments and trends. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 56, p. 1801-1829, 2001.
94. DOCEKAL, B.; DEDINA, J.; KRIVAN, V. Radiotracer investigation of hydride trapping efficiency within a graphite furnace. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 52, p. 787-794, 1997.
 95. HAUG, H.O.; LIAO, Y.P. Automated determination of tin by hydride generation using in situ trapping on stable coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 50, p. 1311-1324, 1995.
 96. 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 mass spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 59, p. 243-253, 2004.
 97. 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. 9, p. 8, 2004.
 98. POHL, P. Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 23, p. 21-27, 2004.
 99. KANG, Y.; YAMADA, H.; KYUMA, K.; HATTORI, T.; KIGASAWA, S. Selenium in Soil Humic-Acid. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v. 37, p. 241-248, 1991.
 100. PUMURE, I.; RENTON, J.J.; SMART, R. B. Ultrasonic extraction of arsenic and selenium from rocks associated with mountaintop

removal/valley fills coal mining: Estimation of bioaccessible concentrations. **Chemosphere**, v. 78, p. 1295-1300, 2010.