

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo da formação do 4,5-benzopiazoselenol
nas misturas homogêneas dos solventes
água-etanol-clorofórmio(ou tolueno)

Lucas Caixeta Gontijo

Dissertação de Mestrado em Química,
apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras

Uberlândia – MG
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

G641e Gontijo, Lucas Caixeta, 1982-
Estudo da formação do 4,5-benzopiazoselenol nas misturas homogêneas dos solventes água-etanol-clorofórmio (ou tolueno) / Lucas Caixeta Gontijo. - 2006.
76f. : il.
Orientador: Sebastião de Paula Eiras.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Selênio - Teses. 3. Espectrofotometria - Teses. I. Eiras, Sebastião de Paula. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



ALUNO(A): LUCAS CAIXETA GONTIJO

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5042403

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Estudo da formação do 4-5-benzopiazoselenol nas misturas homogêneas dos solventes água-etanol-clorofórmio (ou tolueno)”,

ORIENTADOR: PROF. DR. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro da Biblioteca do Campus Santa Mônica no dia 28 de agosto de 2006 às 14 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras
(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Marlón Herbert Flóra B. Soares
(UFG)

Profa. Dra. Yaico D. Tanimoto Albuquerque
(Instituto de Química / UFU)

Uberlândia, 28 de agosto de 2006.

Aos meus queridos pais Carolino e Juversina
Grande irmão Luciano
Incomparável irmã Valéria
Sobrinhos: André, Matheus e Michelly
E adorável namorada Núbia.

Pela felicidade de ter uma família muito especial

Dedico

Ao meu orientador Sebastião
responsável pela minha formação
e por ser uma pessoa tão especial

Dedico

Agradecimentos

A DEUS

Ao Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras pela orientação segura e competente e, principalmente, pela confiança depositada em meu trabalho. Seu estímulo constante e testemunho de seriedade e compreensão, permitiram a concretização deste estudo.

À Prof. Dr^a. Nívea Maria Melo Coelho por ter cedido tão gentilmente alguns equipamentos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz pelas contribuições e questionamentos feitos durante o Exame de Qualificação. E também por ter cedido alguns equipamentos para a realização deste trabalho.

A Prof. Dr^a. Yaico Dirce T. de Albuquerque pelas contribuições e questionamentos feitos durante o Exame de Qualificação.

Aos demais docentes do IQ-UFU, pela amizade, pelos ensinamentos oferecidos e convivência durante os últimos anos.

Aos meus pais, meus irmãos e namorada que me desculpem por suportarem minha impaciência e ausência.

À Núbia Rosa Martins, minha namorada, pela paciência, apoio e carinho irrestritos durante todos os momentos.

Ao amigo Natal Junio Pires, pela amizade e paciência de atender meus questionamentos a respeito da Ciência e projetos de pesquisa.

Ao amigo Francislei Alves Neto, pela amizade e discussões sobre o mundo da Química.

Ao amigo Edson Luiz Paro Junior pelos momentos de descontração ao longo da convivência no laboratório.

Ao amigo Helieder Cortes Freitas pelas discussões a respeito dos projetos de pesquisa.

Ao amigo Alisson Costa da Cruz pela confiança e por ter aceitado minhas sugestões em seu projeto de pesquisa.

Ao amigo Rodrigo Amorim Bezerra da Silva por aceitar alguns questionamentos em seu projeto de pesquisa.

Aos amigos de graduação Aline, Lidiany, Vinícius, Luciano, Cláudio, Sabrina e Juliano pela amizade, ensinamento e trabalho durante a graduação, assim como em outros momentos.

Aos amigos do Laboratório, Alex, Alisson, Edson, Wércio, Fábio, Francislei, Helieder, Natal, Rodrigo e Dayane (que equipe!!!) pelas discussões e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À técnica Liana do laboratório de ensino pelo suporte material concedido e pelo bom atendimento ao uso do laboratório.

À amiga Isabel, no período em que estive na secretaria da pós-graduação, pelo atendimento cordial e eficiente.

A Capes pela bolsa fornecida durante a realização deste projeto.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

VALEU!!!

SUMÁRIO

Resumo	xii
Abstract	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 – Selênio	1
I.1.1 – Histórico	1
I.1.2 – Propriedades físicas e químicas	2
I.1.2.1 – Propriedades físicas	2
I.1.2.2 – Propriedades químicas	4
I.1.3 – Usos do selênio	6
I.1.4 - Selênio na nutrição	8
I.1.5 – Toxicidade do selênio	10
I.2 – Métodos de determinação de selênio	13
I.3 – Sistema fase única	17
I.3.1 – Extração por fase única	17
I.3.2 – Outras aplicações da solução fase única	18
II – OBJETIVOS	19
III – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
III.1 – Materiais e Reagentes	20
III.1.1 – Instrumental	20
III.1.2 – Materiais de vidro	20
III.1.3 – Reagentes	20
III.2 - Soluções	21
III.2.1 - Soluções de 2,3-diaminonaftaleno (DAN)	21
III.2.2 - Soluções de selênio	21
III.3 – Obtenções dos diagramas de fases	21
III.4 – Verificação da formação do complexo 4,5-benzopiazoselenol nas misturas homogênea de solventes	21
III.4.1 – Preparação da fase única	21
III.4.2 – Verificação do comprimento de onda de absorção do complexo formado	22
III.4.3 – Estudo da concentração de DAN nos sistemas	22

III.4.4 – Estudo da influência do tempo, temperatura e pH	22
III.4.5 – Obtenção da curva analítica de calibração preliminar	23
III.4.6 – Estudo da influência da composição da mistura homogênea de solventes	23
III.4.6.1 – Sistema água-etanol-clorofórmio	23
III.4.6.2 – Sistema água-etanol-tolueno	23
III.4.7 – Obtenção da curva analítica de calibração	24
III.4.8 – Avaliação da adição do surfactante dodecilsulfato de sódio	24
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
IV.1 – Diagrama de fases	25
IV.2 – Verificação da formação do complexo 4,5-benzopiazoselenol	27
IV.2.1 – Verificação do comprimento de onda de absorção máxima	28
IV.2.2 - Estudo da concentração do complexante DAN	29
IV.2.2.1 - Sistema água-etanol-clorofórmio	29
IV.2.2.2 - Sistema água-etanol-tolueno	29
IV.2.3 – Planejamento fatorial	30
IV.2.3.1 – Planejamento fatorial 2 ³	31
IV.2.3.1.1 – Planejamento fatorial 2 ³ para o sistema água-etanol-clorofórmio	32
IV.2.3.1.2 – Planejamento fatorial 2 ³ para o sistema água-etanol-tolueno	39
IV.2.4 – Estudo de misturas	42
IV.2.4.1 – Influência da composição no sistema ternário água-etanol-clorofórmio	44
IV.2.4.2 – Influência da composição no sistema ternário água-etanol-tolueno	48
IV.2.5 – Avaliação do emprego de dodecilsulfato de sódio na sensibilidade analítica	51
IV.2.5.1 – Efeito da adição de dodecilsulfato de sódio no sistema água-etanol-clorofórmio	52
IV.2.5.2 – Efeito da adição de dodecilsulfato de sódio no sistema água-etanol-tolueno	53
IV.2.6 – Comparação dos resultados	54
V – CONCLUSÃO	56

VI – PRETENSÕES FUTURAS	57
ANEXOS	
ANEXO 1: Características dos solventes das soluções fase única	58
ANEXO 2: Mecanismo da reação de formação do 4,5-benzopiazoselenol	62
ANEXO 3: Análise dos efeitos pelo método das normais	63
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

FIGURAS

Figura 1 – Representação da reação entre o ácido selenoso e 1,2-diaminobenzeno	13
Figura 2 – Representação da reação entre o ácido J e selênio	14
Figura 3 – Diagramas ternários obtidos a 25 °C	26
Figura 4 – Espectros do complexante DAN e do complexo formado 4,5-benzopiazoselenol	28
Figura 5 - Variação da absorvância em função do volume adicionado de DAN	29
Figura 6 - Variação da absorvância em função do volume adicionado de DAN	30
Figura 7 – Um sistema pode ser representado por uma função (em princípio desconhecida) ligando os fatores (variáveis de entrada) às respostas (variáveis de saída)	31
Figura 8 – Gráfico das normais dos efeitos	34
Figura 9 - Estudo do tempo de reação	35
Figura 10 – Representação do planejamento fatorial composto tipo estrela com ponto central	35
Figura 11 – (a) Superfície de resposta e (b) Linhas de contorno	37
Figura 12 – Curva de calibração preliminar no sistema água-etanol-clorofórmio	39
Figura 13 – Gráfico das normais dos efeitos	41
Figura 14 – Curva de calibração para o sistema água-etanol-tolueno	42
Figura 15 – Triângulo equilátero inscrito no cubo	43
Figura 16 – (a) Uma provável superfície de resposta para uma mistura de três componentes. (b) Suas linhas de contorno ou curvas de nível	44
Figura 17 - Diagrama ternário água-etanol-clorofórmio com os pontos do planejamento experimental das misturas	44
Figura 18 – Linhas de contorno obtida com o planejamento de misturas para o sistema água-etanol-clorofórmio	46
Figura 19 – Curva analítica de calibração no sistema água-etanol-clorofórmio após planejamento de misturas	47
Figura 20 – Comparação das curvas analíticas de calibração no sistema água-etanol-clorofórmio	47
Figura 21 - Diagrama ternário água-etanol-tolueno com os pontos do planejamento experimental das misturas	48

Figura 22 – Linhas de contorno obtida com o planejamento de misturas para o sistema água-etanol-tolueno	49
Figura 23 – Curva de calibração após o planejamento de misturas no sistema água-etanol-tolueno	50
Figura 24 – Comparação das curvas de calibração referente a otimização do planejamento de misturas	51
Figura 25 – Curva de calibração com adição de SDS no sistema água-etanol-clorofórmio	53
Figura 26 – (a) Gráfico de densidade de probabilidade numa distribuição normal padronizada. A probabilidade acumulada correspondente a um valor x_1 é a área sob a curva à esquerda de x_1 . (b) Probabilidade acumulada na escala cartesiana usual. (c) O gráfico da figura (b), num eixo de probabilidade normal	64

TABELAS

Tabela 1 – Algumas propriedades físicas do selênio	3
Tabela 2 – Volumes titulados da mistura etanol-tolueno com o volume gasto do titulante água, juntamente com as respectivas frações em massa	25
Tabela 3 – Planejamento fatorial 2^3 para o sistema água-etanol-clorofórmio	32
Tabela 4 – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2^3 e os valores de probabilidade cumulativa no sistema contendo clorofórmio	34
Tabela 5 – Resultados do planejamento fatorial 2^2 tipo estrela	36
Tabela 6 – Variáveis escalonadas e em valores reais juntamente com as respostas obtidas do caminho de ascensão ao máximo	38
Tabela 7 – Planejamento fatorial 2^3 para o sistema água-etanol-tolueno	40
Tabela 8 – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2^3 e os valores de probabilidade cumulativa no sistema contendo tolueno	40
Tabela 9 – Resultados da otimização univariada do tempo, temperatura e pH	41
Tabela 10 – Matriz da composição do sistema ternário homogêneo de solventes água-etanol-clorofórmio e matriz resposta	45
Tabela 11 – Matriz da composição do sistema ternário homogêneo de solventes água-etanol-tolueno e matriz resposta	49
Tabela 12 – Massa de SDS adicionada em função da resposta variação de absorvância no sistema contendo clorofórmio	52
Tabela 13 – Massa de SDS adicionada em função da resposta variação de absorvância no sistema contendo tolueno	53
Tabela 14 – Resumo dos resultados	54
Tabela 15 – Comparação com outros métodos espectrofotométricos	55

Resumo

Neste trabalho a formação do 4,5-benzopiazoselenol no sistema homogêneo dos solventes água-etanol-clorofórmio(ou tolueno) é apresentado avaliando o comportamento da resposta analítica, medida a $\lambda_{\text{máx}} = 380 \text{ nm}$. Empregando técnicas de otimização estudou-se o comportamento do sistema em relação as variáveis: pH de meio, tempo e temperatura de reação, concentração do 2,3-diaminonaftaleno, composição dos solventes e adição de dodecilsulfato de sódio ao sistema. Nas misturas homogêneas dos solventes água-etanol-clorofórmio ou água-etanol-tolueno, denominadas de soluções fase única, a porção aquosa introduz o íon Se(IV) e os solventes clorofórmio e tolueno introduzem o reagente 2,3-diaminonaftaleno, respectivamente nos seus sistemas. As variáveis pH, tempo e temperatura foram estudadas com um planejamento fatorial 2^3 para avaliar possíveis efeitos de interação entre as variáveis pelo método da análise das normais. No sistema contendo clorofórmio observou-se o efeito da interação $\text{pH} \times \text{Temperatura}$ e, então, estas variáveis foram otimizadas pelo método de análise de superfície de respostas. Já a variável tempo foi otimizada com procedimento clássico. Para o sistema contendo tolueno não se observou efeitos de interação e todas as variáveis foram otimizadas com o procedimento clássico. Para avaliação da influência da composição dos solventes na sensibilidade empregou-se o procedimento de otimização planejamento de misturas. Nos dois sistemas estudados observou-se influência significativa da composição da mistura dos solventes obtendo um ganho de sensibilidade de aproximadamente 50% após a otimização. Ainda, no intuito de melhorar a sensibilidade foi avaliada a possibilidade do emprego do surfactante dodecilsulfato de sódio no meio reacional e apenas o sistema contendo clorofórmio apresentou ganho significativo de sensibilidade, aproximadamente 10%. Obteve-se curva analítica de calibração e observa-se que em ambos os sistemas o desenvolvimento de metodologia determinativa de selênio é viável e, conforme matriz escolhida deve-se avaliar o comportamento dos prováveis interferentes e meios para minimizar seus efeitos na determinação de selênio.

Palavras-Chave: selênio, 2,3-diaminonaftaleno, 4,5-benzopiazoselenol, espectrofotometria

Abstract

In this work the formation of the 4,5-benzopiazoselenol in the homogeneous system of the solvents water-ethanol-chloroform(or toluene) mixture it is presented evaluating the behavior of the analytical response, measured the $\lambda_{\max} = 380$ nm. Using classic and chemometrics techniques optimization was studied the behavior of the system in relationship the variables: pH of medium, time and temperature reaction, concentration of the 2,3-diaminonaphthalene, composition of the solvents and addition of sodium dodecilsulfate to the system. In the homogeneous mixtures of the solvents water-ethanol-chloroform or water-ethanol-toluene, denominated of single phase solutions, the aqueous portion introduces the ion Se(IV) and the solvents chloroform and toluene introduce the reagent 2,3-diaminonaphthalene, respectively in their systems. The variables pH, time and temperature were studied with an experimental design 2^3 to evaluate possible interaction effects among the variables for the method of the analysis of the normal ones. In the system containing chloroform the effect of the interaction pHxTemperature was observed and these varied were optimized by the method of analysis surface response. Already variable time was optimized with classic procedure. For the system containing toluene was not observed interaction effects and all the variables were optimized with the classic procedure. For evaluation of the influence of the composition of the solvents in the sensibility the procedure of experimental design for mixtures was used. In the two studied systems significant influence of the composition of the mixture of the solvents was observed obtaining an increase of sensibility of approximately 50% after the optimization. In the intention of improving the sensibility the possibility of the job of the surfactant sodium dodecilsulfate of was evaluated also in the reaction medium and just the system containing chloroform presented significant earnings of sensibility, approximately 10%. It was obtained curves analytical of calibration and it is observed that both system the development of selenium determination methodology is viable and it should be evaluated the behavior of the probable interferences and means to minimize their effects in the selenium determination, according to matrix chosen.

Keywords: selenium, 2,3-diaminonaphthalene, 4,5-benzopiazselenol, spectrophotometry

I – INTRODUÇÃO

I.1 – Selênio

I.1.1 – Histórico

O interesse sobre o estudo do efeito do selênio nos seres vivos começou primeiramente devido a sua toxicidade. Relatos sobre efeitos adversos do excesso de selênio no organismo de animais têm sido realizados desde 1295, quando o explorador Marco Polo, viajando pela China, observou que "os cascos de seu gado tornaram-se inchados e gotejantes quando eles pastavam plantas crescentes em certas áreas". Um cirurgião do exército dos EUA, Dr. Madison, relatou em 1856 que animais do regimento da cavalaria alojados em Nebraska, atualmente estado de Dakota do Sul, sofreram "perda de pêlos da crina e cauda depois de pastarem nos arredores de uma montanha". Em 1934, verificou-se que os níveis elevados de selênio em plantas de regiões semi-áridas do oeste norte-americano eram responsáveis por uma moléstia, chamada de "*doença alcalina*", que acometeu o gado e outros animais de criação. Esta enfermidade era caracterizada por certo tipo de paralisia, perda de pêlo e dentes, unhas quebradiças e desprendimento do casco, idêntica àquela relatada anteriormente¹.

A importância do selênio na nutrição animal foi descoberta por Schwarz e Foltz em 1957. Eles observaram que a adição de selênio na dieta de ratos com deficiência de vitamina E evitava a necrose do fígado. Em um outro estudo eles verificaram que certo composto orgânico específico de selênio (formado principalmente de selenometionina) possuía atividade metabólica várias vezes mais potente que o selênio inorgânico e outras formas orgânicas conhecidas de selênio. Ao contrário do que se pensava, foi comprovado que o efeito protetor contra a necrose de fígado, antes atribuído somente à L-cisteína, é, na verdade, produzido por um efeito sinérgico entre a L-cisteína e o Fator 3, presente como contaminante em quantidades muito baixas neste aminoácido. Quando associado à vitamina E, o selênio tem ação protetora quanto a peroxidação lipídica².

Embora a importância deste elemento traço na nutrição animal tenha sido revelada em 1957, pouco ainda se sabe sobre o papel específico do selênio no organismo. As primeiras funções do selênio nos seres humanos só foram explicadas em 1973. Até os dias de hoje só se conhecem três reações catalisadas por enzimas que

exigem a participação de proteínas contendo selênio. Duas destas reações se relacionam com bactérias, uma necessita da enzima desidrogenase e outra da glicina redutase. A terceira é a da glutathione peroxidase (GPx)³, uma enzima que contém um átomo de selênio ligado covalentemente na forma de selenocisteína que é essencial para sua atividade, e protege os glóbulos vermelhos, membranas celulares e componentes intracelulares contra reações indesejáveis com peróxidos solúveis.

I.1.2 – Propriedades físicas e químicas

Selênio (número atômico 34, massa atômica 78,96 u) foi primeiramente identificado pelos químicos suecos J. J. Berzelius e J. G. Gahn em 1817 em depósitos formados nas câmaras de chumbo que produziam ácido sulfúrico a partir da pirita de cobre. O nome selênio é derivado da palavra grega *selene* significando lua e que reflete sua proximidade com o telúrio que vem do latim *tellus* significando terra. Considerado um metalóide está localizado entre o enxofre e telúrio no grupo 16 da tabela periódica e entre o arsênio e o bromo no quarto período. As propriedades químicas são intermediárias entre as do enxofre e do telúrio. Em seus compostos, o selênio exibe os estados de oxidação -II, 0, +IV e +VI⁴. Ele é o 66º elemento na ordem de abundância na crosta terrestre⁵, com uma concentração média de 0,05 mg.Kg⁻¹.

I.1.2.1 – Propriedades físicas

Algumas propriedades físicas⁶ do selênio estão apresentadas na Tabela 1.

O selênio sólido elementar apresenta alotropia e pode ser encontrado em um ou outro estado amorfo (pó, vítreo ou coloidal) ou em um dos três estados cristalinos (dois na forma monoclinica e um na forma hexagonal), dependendo das condições externas. O selênio cinzento, a forma cristalina semi-metálica do selênio, é a forma mais estável e usual exibindo a propriedade de fotocondutividade. Selênio cinzento é usado em aplicações fotoelétricas e fotoquímicas⁴.

Selênio vítreo: sólido lustroso, negro, opaco, densidade igual a 4,28 g.cm⁻³. Forma-se por resfriamento do selênio fundido, e entre 30 e 40 °C é duro e quebradiço. Apresenta fratura conchoidal e quando em pequena espessura apresenta tom avermelhado. Entre 60 e 80 °C transforma-se em selênio cinzento. Os raios ultravioletas provocam a sua cristalização. É levemente solúvel em dissulfeto de carbono⁷.

Tabela 1 – Algumas propriedades físicas do selênio

Número atômico	34
Distribuição eletrônica	[Ar]3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁴
Massa atômica relativa (u)	78,96
Estados de oxidação	-II, 0, +IV e +VI
Raio atômico, nm	0,140
Raio iônico, nm	
Se(-II)	0,191
Se(IV)	0,050
Se(VI)	0,042
Energia de Ionização, KJ/mol	940
Potencial de ionização, eV	
I	9,75
II	21,5
Eletronegatividade (Pauling)	2,4

Selênio pó: vermelho escuro, densidade igual a 4,26 g.cm⁻³. É obtido por precipitação, com dióxido de enxofre, de solução de ácido selenioso, pela decomposição do selenocianato de potássio por ácido clorídrico, pela sublimação do selênio em tubo fechado, e ainda por outros processos. É ligeiramente solúvel no dissulfeto de carbono, e muito solúvel em oxiclreto de selênio. Aquecido entre 40 e 50 °C, aglomera-se, formando massa dura comparável à variedade vítrea⁷.

Selênio coloidal: é um hidro-sol que pode ser defloculado por excesso de água, desde que não seja velho ou tenha sido exposto à luz; nestes casos a peptização é mais demorada. É preparado pela ação de solução diluída de ácido sulfuroso sobre solução também diluída de ácido selenioso⁷.

Selênio monoclinico: variedade cristalizada vermelha. Obtém-se pela transformação do selênio vítreo ou amorfo quando em contato com dissulfeto de carbono ou quando à solução de selênio em dissulfeto de carbono se adiciona benzeno ou, ainda, por evaporação espontânea desta solução. Sua densidade é 4,47 g.cm⁻³. São duas as formas em que se apresenta esta variedade: uma estável até 110 – 120 °C e outra estável até 125 – 130 °C, chamada de α - e β -⁷.

Selênio cinzento ou metálico: resulta do aquecimento de qualquer das outras variedades abaixo de seu ponto de fusão, durante algum tempo. É insolúvel no dissulfeto de carbono, densidade igual a $4,80 \text{ g.cm}^{-3}$, apresentando cristais hexagonais ou romboédricos. É estável em todas as temperaturas abaixo de seu ponto de fusão. Admitem-se duas formas para esta variedade: selênio A, não condutor da eletricidade, e selênio B, condutor e sensível à luz⁷.

Os seis isótopos estáveis do selênio e a abundância relativa são: ^{74}Se (0,87%), ^{76}Se (9,02%), ^{77}Se (7,58%), ^{78}Se (23,52%), ^{80}Se (49,82%) e ^{82}Se (9,19%). Um número instável de isótopos do selênio também foi descoberto. Ativação de nêutron é usada para produzir vários isótopos artificiais do selênio. Por exemplo, ^{75}Se é usado na medicina e em aplicações analíticas por causa de sua emissão de raios-gama, enquanto ^{77}Se tem sido usado em estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) no metabolismo de compostos organo-selênio⁴.

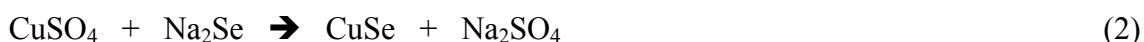
I.1.2.2 – Propriedades químicas

Posicionado entre o enxofre e telúrio no grupo 16 da tabela periódica, as propriedades químicas do selênio são intermediárias entre esses dois elementos. Selênio geralmente exibe as valências -II, 0, +IV e +VI tanto em compostos simples ou complexos, e seus sais são considerados análogos aos do enxofre. Selênio está quase sempre associado com enxofre em processos endógenos (que acontecem no interior da Terra), enquanto enxofre e selênio seguem caminhos diferentes em processos exógenos (que acontecem ou se aproximam à superfície da Terra). Enxofre é relativamente fácil de ser oxidado para sulfatos solúveis que migram rapidamente, enquanto, selênio é mais resistente à oxidação e requer condições mais fortes de oxidação para ser oxidado a selenatos solúveis que podem então ser convertidos a selênio elementar por agentes redutores apropriados⁸.

Selenetos metálicos são considerados “sais” do ácido H_2Se (que é formado pela reação do selênio com hidrogênio a temperaturas sobre $200 \text{ }^\circ\text{C}$), e pode ser selenetos ácidos monosubstituídos ou selenetos normais disubstituídos, em que o selênio é reduzido ao estado de oxidação -II (Se^{2-}). Sais ácidos da forma MHSe só são formados pelos metais alcalinos (Grupo 1) e alcalinos terrosos (Grupo 2). Alcalinos, alcalinos terrosos e metais pesados podem formar selenetos⁸. Forma-se selenetos com metais e

muitos não-metais que se assemelham a sulfetos quanto ao aspecto físico, composição e propriedades.

Reações típicas para a formação de selenetos são:



Selenetos são oxidados pelo oxigênio atmosférico mais rapidamente que os equivalentes sulfetos. Selenetos de metais pesados são insolúveis em água, enquanto os de metais alcalinos, alcalinos terrosos e calcogêneos são prontamente solúveis em água. Selenetos metálicos se assemelham aos sulfetos em composição, aparecimento e propriedades⁴.

No ambiente, selenetos são tipicamente encontrados nas formas minerais. Selenetos minerais normalmente são encontrados em associações com minerais de enxofre onde Se^{2-} pode substituir ionicamente o enxofre por causa das semelhanças em seus raios iônicos (Se 198 pm; S 184 pm)⁸. Estes minerais incluem calcopirita (CuFeS_2) e pirita (FeS_2), como também outros sulfetos que incluem minerais de enxofre vulcânicos e galena (PbS).

Selenitos em que o selênio está no estado de oxidação +IV, são preparados pela neutralização do ácido selenoso (H_2SeO_3) pelos óxidos, hidróxidos ou carbonatos de metais correspondentes. Eles formam duas séries de sais: selenitos normais (M_2SeO_3) e ácido ou hidrogenoselenitos (MHSeO_3). Solubilidade em água de selenitos e sulfitos são semelhantes. Selenitos e ácido selenoso têm importantes aplicações industriais incluindo o tratamento eletrolítico de refinaria de cobre, descoloração de vidros e produção de pigmentos⁸.

Semelhantemente, duas séries de sais de metal - neutro (MSeO_4) e ácido (MHSeO_4) – são associadas com o ácido selênico (H_2SeO_4). Aqui, selênio está no estado de oxidação +VI. Selenatos e sulfatos apresentam colorações semelhantes, facilidade de cristalização e solubilidade em água, embora eles tenham caminhos de decomposição diferentes. Selenatos decompõem tipicamente obtendo o selenito de metal e oxigênio, enquanto o sulfato equivalente decompõe obtendo o óxido de metal, dióxido de enxofre e oxigênio. Isto é o resultado da maior estabilidade de sais no

sistema selenito-selenato comparando com o sistema sulfito-sulfato. Usos industriais de selenatos incluem a produção de esmaltes e coberturas e descoloração de vidros⁸.

Haleto são formados através de reações vigorosas entre selênio e fluoreto, selênio e cloro, e também de reações menos vigorosas com bromo. Não são formados selenohaleto de iodo. Oxihaleto de selênio, incluindo SeOF_2 , um líquido colorido com um cheiro pungente, e SeOBr_2 que forma cristais laranja, também foram sintetizados⁴.

Selênio também reage com os elementos não-metálicos carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre sob condições apropriadas. Selenitos de nitrogênio (Se_4N_4) e vários selenitos de fósforo da forma P_xSe_y foram documentados. Sulfotrióxido de selênio, SeSO_3 , é uma substância cristalina verde escura e é formado pela adição de selênio elementar ao trióxido de enxofre⁸.

I.1.3 – Usos do selênio

As propriedades fotocondutoras do selênio cinzento fazem com que seja empregado satisfatoriamente em aplicações fotoelétricas e fotoquímicas. Selênio também é encontrado na dopagem de vidros, produção de metais e borracha, e em várias outras indústrias⁹.

Células fotoelétricas e fotovoltaicas contendo selênio são usadas em luz e aplicações sensíveis inclusive colorímetros, fotômetros, interruptores de luz automáticos, gravação de sons, sistemas de alarme de incêndio, detecção de luz e infravermelho e aparelhos de medida (usado em aplicações astronômicas e outras) e em fotocópias. Selênio é usado na produção de vidro para remover a cor esverdeada que surge de impurezas férreas. Alguns óxidos de ferro presentes no estado fundido são oxidados a um óxido férrico um pouco amarelo por compostos adicionados de selênio que em troca é reduzido a selênio elementar vermelho que compensa a coloração verde de qualquer óxido férrico restante. Quando adicionado em grandes quantidades selênio dá ao vidro uma coloração rósea, e quando misturado com outros compostos, são produzidos várias colorações de vidro e cerâmica. Artigos decorativos e religiosos, como também lentes para sinais luminosos, automóveis, estrada de ferro, aplicações marinhas e outras, tem sido usado vidro vermelho^{8,9} dopado com selênio desde 1800.

A adição de selênio em metais e ligas, como aço, cobre, níquel-ferro, cobalto-ferro, altera as propriedades de fundição e propriedades mecânicas dos metais. Compostos de selênio também têm aplicações em camadas anticorrosivas⁸.

Sulfoseleneto de cádmio é um importante pigmento inorgânico usado em cerâmicas, pinturas, tintas de especialidade e plásticos. Podem ser produzidas várias colorações dependendo das condições e relações dos reagentes, variando de amarelo e laranja para as cores castanha e vermelha⁸.

Selênio também é empregado nas áreas de medicina, farmacêuticas e nutrição. Dióxido de selênio é empregado como um catalisador na fabricação de produtos farmacêuticos e na síntese de substâncias orgânicas. Xampus anti-caspa estão disponíveis contendo sulfeto de selênio ou suspensões de selenito de sódio. Em algumas áreas deficientes de selênio, como parte da Nova Zelândia, a nutrição de animais pode ser suplementada com selenito de sódio na prevenção de doenças. Na medicina veterinária, selênio também é usado para prevenir a distrofia muscular, infertilidade de ovelhas e doença do músculo branco, e em controle de tensão e pressão alta em animais. Na medicina humana selênio é empregado no tratamento da deficiência de selênio e na cura de tecido traumatizado. Adicionalmente, compostos organoselênio como Ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2-H)-one; PZ-51) tem a finalidade de atuar como um agente antiinflamatório no tratamento de condições patológicas ligadas aos hidroperóxidos. Também há evidência que alguns compostos de selênio podem exibir propriedades anticancerígenas⁴.

Outras aplicações de selênio são: na indústria de borracha como ajuda na vulcanização e melhoramento das propriedades mecânicas da borracha; como aditivo para óleos e graxa lubrificantes para melhorar as propriedades de detergente e em fotografia, nos quais banho no produto de selenito de sódio produz impressão de tons marrons⁸.

A importância do selênio em sistemas biológicos é devido a sua habilidade em substituir o enxofre em moléculas orgânicas e inorgânicas, devido a similaridade dos raios iônicos para os dois elementos. Nem todo o selênio ingerido é absorvido pelo organismo - selênio insolúvel e proteínas de selênio indigeríveis serão excretadas pelas fezes. Selênio absorvido também pode ser perdido do organismo por excreção pela via urinária como íon trimetilselênio, ou pela via respiratória depois da metilação para dimetilselênio. O selênio restante é então normalmente metabolizado a selênio-análogo aos aminoácidos contendo enxofre que formam a base para selênio que contém polipeptídios e proteínas¹⁰.

Como o selênio tem a habilidade para substituir o enxofre em ambas moléculas, orgânicas e inorgânicas, compostos análogos de selênio aos de enxofre não

se comportam necessariamente da mesma maneira nos sistemas biológicos, com diferenças acentuadas, inclusive facilidade de redução de seus oxianions e a força ácida de seus hidretos. Nos sistemas biológicos, selênio é reduzido a selenito, enquanto enxofre é oxidado a sulfato para excreção. Esta diferença é mostrada na equação abaixo, onde S(IV) é oxidado preferencialmente, enquanto Se(IV) é reduzido¹⁰.



Conseqüentemente o metabolismo do selênio tende aos estados mais reduzidos enquanto o metabolismo do enxofre tende aos estados mais oxidados. Isto terá um impacto obviamente quando selênio substituir o enxofre em compostos biológicos orgânicos, comprometendo a relação metabólica dos compostos devido aos diferentes caminhos metabólicos⁴.

A redução do selênio em sistemas biológicos tem também se mostrado em estudos com seleneto (ácido selenoso), que também se mostra como um reagente espontâneo em importantes compostos biológicos como a cisteína, glutathiona e coenzima A como compostos instáveis na forma de “selenotrisulfetos”, com a fórmula RS-Se-SR, que rapidamente decompõe-se em disulfeto e selênio elementar em pH alcalino⁴. A reação de formação dos selenotrisulfetos pode ser representada da seguinte forma:



I.1.4 - Selênio na nutrição

A essencialidade do selênio na nutrição animal, encontrado no fígado e rins, era um fator desconhecido até 1957, quando foi evidenciada sua necessidade para a prevenção da necrose em ratos deficientes em vitamina E. Evidências do papel do selênio na nutrição humana não eram conhecidas até 1970. Com a descoberta de que selênio é um componente integral da glutathiona peroxidase (SeGSHpx) em humanos, e que a dieta de selênio exibe uma influência direta na atividade dos tecidos contendo SeGSHpx, evidenciou que o selênio é um nutriente essencial na dieta humana¹¹.

O papel biológico fundamental do selênio em animais e humanos é ser considerado dentro do sistema da enzima SeGSHpx, que contém a selenocisteína em

seu sítio ativo. A GSHpx foi descrita como uma enzima de “trabalho doméstico” para a qual funciona protegendo as células contra os efeitos do oxigênio destruindo peróxidos de hidrogênio e peróxidos orgânicos. GSHpx converte peróxido de hidrogênio em água. Se os peróxidos de hidrogênio não forem removidos, podem interagir com outros componentes da célula para formar os radicais livres. Estes podem proliferar, enquanto causam mudanças estruturais em lipídios e proteínas e podem conduzir a mudanças nas membranas da célula chegando a um comprometimento da integridade celular conduzindo até a morte⁴.

Outros papéis biológicos do selênio incluem o metabolismo da prostaglandina e glutational¹⁰; e também é importante em espermatogêneses. Adicionalmente, selênio também inclui um componente de proteínas diferente da GSHpx.

Em mamíferos e espécies de aves, selênio é um elemento traço essencial à saúde, com mais baixas entradas que são caracterizadas por uma variedade de sintomas, muitos dos quais são relacionados a alterações nos sistemas cardíacos e musculares. Van Vleet e Ferrans¹² lista 47 doenças em animais que são degeneração necrótica no fígado, pouco desenvolvimento de pena, atrofia pancreática, fibroses. A deficiência de selênio nos animais também está relacionada à infertilidade, aborto, retenção de placenta e nascimento de bezerros fracos ou natimortos, embora o mecanismo patológico desses processos ainda não seja conhecido¹³. Para contornar a deficiência de selênio em gado leiteiro Diaz et al¹⁴ estudou a suplementação de selênio na forma orgânica (Sel-Plex) ou inorgânica em um rebanho comercial para avaliação da qualidade do leite.

Entrada inadequada de selênio em humanos está associada com a incidência da doença de Keshan, uma cardiomiopatia caracterizada por deterioração severa e múltipla necrose do coração¹⁵. A doença é endêmica a certas áreas na China onde os solos são tipicamente pobres em selênio. Aumento da entrada de selênio pela ingestão de sais fortificados de selênio mostrou-se como um redutor da incidência da doença de Keshan¹⁶. Outra doença relacionada à entrada inadequada de selênio é a doença de Kashin-Beck. Esta é um osteoartropatia endêmica ocorrida na Sibéria oriental, Coréia do norte e partes da China associadas com severa deficiência de selênio e que afeta a cartilagem e crescimento dos ossos¹⁶, e como na doença de Keshan a suplementação de selênio apresentou resultados satisfatórios.

Os níveis de selênio requeridos diariamente para humanos manterem a atividade da GSH-px a seu máximo foi informada como sendo 0,062 mg para homens e

0,055 mg para mulheres. Níveis de selênio considerados seguros para exposição humana são 0,550 mgSe/dia de selênio inorgânico e 0,775 mgSe/dia de alimentos selenosos ou componentes de selênio orgânico⁴.

I.1.5 – Toxicidade do selênio

Níveis elevados de selênio em água ou na dieta podem resultar em toxicidade aguda, mudanças patológicas em tecidos, reprodução prejudicada (inclusive mortalidade de embriões e anormalidades desenvolvida em jovens) e envenenamento crônico em animais adultos⁴. Em um resumo da literatura sobre a toxicidade do selênio, concluiu que o mecanismo específico por qual o excesso de selênio produz sintomas de toxicidade é relativamente desconhecido, mas observou que recente pesquisa sugeriu que a reação de selenita e selenocisteína com glutathione produzem superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio e possivelmente outros oxiradicais que podem conduzir a destruição das células⁴.

A toxicidade aguda de compostos de selênio inorgânico está em função do estado de oxidação, solubilidade aquosa e exposição a níveis extremamente altos de um simples evento. Em animais, o consumo de grandes quantidades de plantas contendo até 10 mg/g de selênio resulta em toxicidade aguda. Enquanto tais plantas normalmente são sem sabores para animais, condições do tempo podem forçar os animais a comer tais plantas¹⁷. Sintomas associados com a toxicidade aguda de selênio em animais são: respiração com odor de alho, letargia, salivação, vômitos, tremores nos músculos, parada respiratória e morte. A intoxicação aguda também se caracteriza por sonolência, enfraquecimento, queda de pêlos e crescimento do casco. A intoxicação crônica em gado têm duas formas de manifestação: por cegueira e incoordenação e por alcalose metabólica. Nesses casos o animal fica cego, cambaleando e sucumbe por falha respiratória. Nessa forma, estão ligadas às plantas seleníferas, que podem envolver outros princípios tóxicos¹³.

Em humanos a selenose aguda é causada principalmente devido a exposição de trabalhadores profissionais em fundidores de cobre e plantas de retificadores de selênio. Esta exposição está associada principalmente pelo selênio no ar e aerossóis de SeO_2 que hidratam a H_2SeO_3 em contato com a pele e mucosas¹⁰. Os sintomas podem incluir uma irritação imediata às mucosas da área respiratória superior, seguida por dor de cabeça, náusea, fadiga, vômitos, vertigem, um amargo na boca e respiração com

odor de alho; e também pode resultar em edema pulmonar. A toxicidade aguda de selênio surge por causa de uma exposição prolongada a altos níveis de selênio num certo período de tempo. Os sintomas são principalmente neurológicos e incluem cegueira e angústia respiratória⁴.

Dados de toxicidade de selênio são baseados em estudos de indivíduos expostos a altos níveis de selênio na dieta. Dados sobre a epidemiologia chinesa sugestionam que 750 a 850 µg de Se/dia é o limite máximo para a exposição diária¹⁸.

Toxicidade crônica do selênio em humanos resulta na condição denominada de selenose, caracterizada por fragilidade de cabelos e unhas, problemas gastrintestinais, erupções na pele, odor de alho exalado e anormalidades no sistema nervoso. Uma ocorrência de selenose foi informada na China devido a uma ingestão diária de selênio superior a 0,85mg. Também foi informado nos Estados Unidos a ocorrência de selenose em 13 pessoas que ingeriram diariamente suplementos contendo 27,3 mg de selênio por tablete. Em outros estudos na China, aproximadamente 5 mg/dia de selênio em alimentos resultaram em troca de unha e perda de cabelo. Foi informado também que pessoas que consumiram 1mg de selênio por dia na forma de selenito de sódio por mais de dois anos apresentaram os sintomas de selenose¹⁹.

Exposição moderada a níveis de selênio com o passar do tempo pode conduzir a selenose crônica, e em animais pode causar lesões, necrose, anorexia e perda de peso. Isto geralmente é chamado de “doença alcalina” entre animais e, é exemplificado pela perda de pelos que ocorreram em cavalos do exército de Dakota do Sul, E.U.A. em 1850. A selenose crônica em humanos acontece em atividade profissional como inalação de fumos de selênio ou exposição a materiais contendo selênio. Em regiões geográficas contendo alto índice de selênio, como a província de Enshi na China, os altos níveis de selênio na terra e nos alimentos da região podem conduzir a um consumo excessivo de selênio e então provocar a selenose⁴.

Selênio é considerado teratogênico, isto é, causa defeitos de nascimento em embriões, mas a teratogenicidade em humanos não foi comprovada²⁰.

Também é considerado que o excesso de selênio é cariogênico a animais e humanos, quer dizer, causando um aumento na incidência de cavidades dentais se a exposição acontecer durante o desenvolvimento do dente. Adicionalmente o excesso de selênio também pode causar cataratas de olho⁴.

A ação antioxidante do selênio indica que este elemento pode desempenhar um relevante papel na prevenção do câncer. Essa ação preventiva ocorre

principalmente devido ao papel desempenhado pelo selênio no fígado, local onde compostos carcinogênicos são metabolizados através de um conjunto de oxidases. Conforme mencionado anteriormente, o selênio é um elemento importante para a produção bioquímica da enzima glutathiona peroxidase (GPx), responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio, evitando a proliferação dos radicais livres nos organismos vivos^{21,22}.

O selênio também afeta a toxicidade do mercúrio, protegendo o organismo contra os efeitos nocivos desse metal. A redução da toxicidade do mercúrio pode ser atribuída à ação antioxidante do selênio, que minimiza os danos causados pelos radicais livres gerados pelo mercúrio nas membranas celulares²¹.

Em 1994 Taylor et al²³ demonstraram que vários novos genes no HIV codificam proteínas contendo selenocisteína, o que normalmente leva ao término da síntese da proteína. Apesar de que ainda nada se tenha comprovado, suspeita-se de que tais genes poderão fornecer a base de um papel para o selênio na bioquímica e regulação do HIV. Assim, alguns autores consideram a possibilidade de uma correlação entre a progressão do quadro infeccioso de um paciente soro positivo e a diminuição drástica dos níveis de selênio no mesmo indivíduo.

Informações sobre o metabolismo do selênio são escassas. A absorção de selênio pelo intestino, sua retenção e distribuição variam com a espécie e parece depender da solubilidade dos compostos de selênio ingerido. Ainda faltam dados sobre seres humanos, porém, sabe-se que a interação entre compostos de selênio e os grupos sulfidrilas, em particular aqueles presentes na membrana celular, oferece interessantes possibilidades para elucidar o metabolismo do selênio. Isso foi comprovado por meio de um estudo realizado com plantas e microorganismos, que sugere uma competição entre o selênio e o enxofre para o transporte do elemento através da membrana celular. O selênio absorvido é depositado em quantidades variáveis ao longo de todos os tecidos do corpo, com exceção do tecido adiposo. Os níveis mais elevados são encontrados nos rins, fígado, coração e baço⁶.

Como mencionado anteriormente, tanto a deficiência quanto o excesso de selênio nos mamíferos, pode levar a sérios problemas de saúde. Por essa razão, surgiu a necessidade de se adquirir informações sobre o conteúdo de selênio nas mais diversas matrizes e aqui as matrizes biológicas têm grande importância como diagnóstico dos níveis de selênio no organismo. Existe uma demanda crescente de métodos para a determinação de selênio a níveis de traços em diferentes amostras tais como águas ou

materiais biológicos.

I.2 – Métodos de determinação de selênio

Diferentes métodos têm sido relatados para determinação de selênio. Os métodos mais comumente empregados estão baseados em medidas espectrofotométricas²⁴ e espectrofluorimétricas²⁵ de piazoselenol formado pela reação de Se(IV) com 2,3-diaminonaftaleno. Geração de hidreto^{26,27}, análise por ativação de nêutrons (NAA)²⁸, técnicas cromatográficas²⁹⁻³², voltamétricas³³⁻³⁵ e métodos cinéticos de análise³⁶ tem sido desenvolvidos para a determinação de selênio. Alguns desses métodos dão boa sensibilidade, mas requerem equipamentos de custo elevado. Outros não possuem sensibilidade suficiente para determinação de selênio em certas amostras.

Uma avaliação dos principais métodos instrumentais para a determinação de selênio pode ser feita de acordo com a sensibilidade, a linearidade da curva de calibração, o limite de detecção, a reprodutibilidade (dada pelo desvio padrão relativo), o tempo de análise e a presença de interferentes. A escolha de um destes métodos dependerá dos objetivos propostos da análise, assim como do tratamento prévio da amostra.

Os métodos espectrofotométricos geralmente são baseados na reação de Se(IV) com uma o-diamina formando a classe de complexos denominadas de piazoselenóis. O piazoselenol mais simples pode ser obtido entre a reação do ácido selenoso com o 1,2-diaminobenzeno³⁷⁻⁴⁰ conforme a equação apresentada na Figura 1. Este método espectrofotométrico de absorção da radiação na região do visível também é popular devido a sua simplicidade. Como reagentes destacam-se o 3,3-diaminobenzidina, 1,2-diaminobenzeno, 2,3-diaminonaftaleno, 4,5-diamino-6-tiopiridina, entre outros.

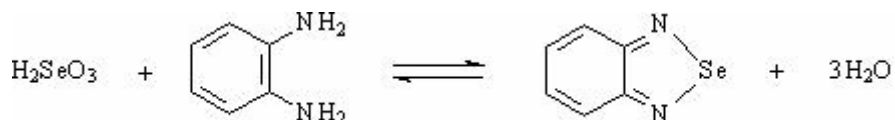


Figura 1 – Representação da reação entre o ácido selenoso e 1,2-diaminobenzeno

Um dos métodos sensíveis para a determinação de selênio é dado pela reação de Se(IV) com 3,3'-diaminobenzidina⁴¹ entre pH 2 e 3. O composto amarelo formado, difenilpiazoselenol pode ser extraído com tolueno em pH > 5,0.

Outros reagentes como 2,3-diaminonaftaleno⁴² e 4,5,6-triaminopirimidina⁴³ são também usados para formar piazoselenóis com Se(IV). A 3,3'-diaminobenzidina é menos sensível que 2,3-diaminonaftaleno e apresenta um branco de reagentes com alto valor de absorvância. A solução contendo o difenilpiazoselenol deve ser neutralizada antes que o complexo seja quantitativamente extraído da fase orgânica.

O reagente, 4,5,6-triaminopirimidina, pode ser usado para determinar Se(IV) diretamente em solução aquosa entre pH 1,5 e 2,5. A determinação é feita em 362 nm⁴³.

O método Espectrofotométrico de Fluorescência Molecular que utiliza a reação do 2,3-diaminonaftaleno (DAN) com Se(IV) para a formação do complexo piazoselenol está limitado a erros devido ao decaimento fotossensível do complexo 2,3-diaminonaftaleno-Se(IV) o qual induz a perdas de selênio.

O selênio pode ser determinado como piazoselenol por Cromatografia Gasosa com detecção por captura de elétrons. Al-Attar et al⁴⁴ investigaram a possibilidade de utilizar reagentes mais sensíveis para a determinação de selênio. Eles utilizaram 3-bromo-5-trifluorometil-1,2diaminobenzeno para determinação de selênio em amostras de plantas por Cromatografia Gasosa com detecção por captura de elétrons. O limite de detecção encontrado para o método foi de 2,2 ngSe/mL, correspondente a quantidade mínima detectável de 5 pg de selênio.

Ramachandran et al⁴⁵ propuseram como reagente para determinação espectrofotométrica de selênio o ácido 6-amino-1-naftol-3-sulfônico (ácido J). O complexo amarelo forma-se entre pH 1 e 2,5 na proporção de 2:1 conforme observado na Figura 2.

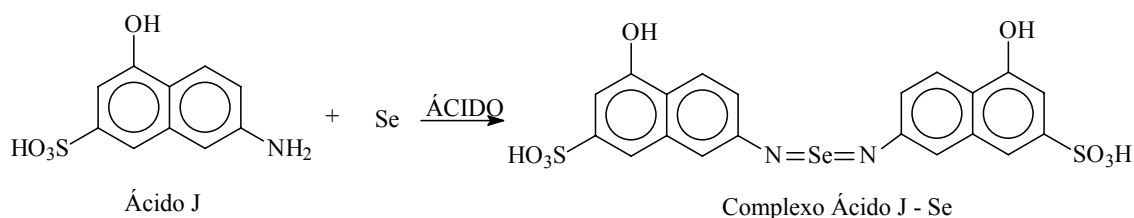
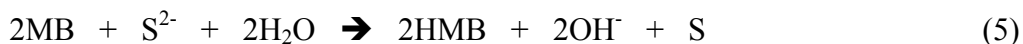


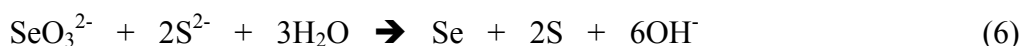
Figura 2 – Representação da reação entre o ácido J e selênio

Na literatura também são encontrados métodos catalíticos para determinação de selênio, como exemplo, a determinação espectrofotométrica baseada na ação catalítica do Se(IV) na redução do azul de metileno juntamente com a ação de íons sulfeto. O esquema da reação pode ser sumarizado da seguinte forma³⁶:

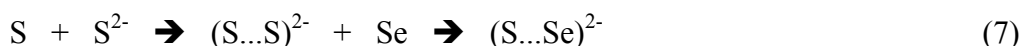
➤ Redução do azul de metileno (MB) pelo sulfeto;



➤ Redução do Se(IV) ao estado elementar pelo sulfeto;



➤ Produção de selenosulfeto (estabilizando a redução do selênio por polisulfeto);



➤ Catalise da redução do MB por selenosulfeto;



Um sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado e o efeito catalítico de Se(IV) na redução do 1,4,6,11-tetrazanaftaceno a 1,6-diidro-1,4,6,11-tetrazanaftaceno na presença de glicoxal e ácido hipofosforoso também foi proposto como um método espectrofotométrico para determinação de selênio⁴⁶.

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica não ofereceu de início um método adequado para determinar o selênio. A emissão das lâmpadas de cátodo oco, usadas como fontes de radiação, não são suficientemente intensas e na linha mais sensível, 196 nm, ocorre forte absorção pelos componentes da chama ar-acetileno. A chama de argônio-hidrogênio, mais transparente, foi proposta, mas nela, por causa da temperatura mais baixa, ocorre a dissociação incompleta dos sais e absorção molecular⁴⁷.

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização

Eletrotérmica é uma alternativa à chama. O uso de atomizadores eletrotérmicos em determinações de elementos nos quais as linhas analíticas ótimas estão na região do ultra-violeta distante é problemático. O espalhamento de luz por material particulado, a interferência de matriz e a absorção molecular são fatores críticos⁴⁸.

Para elementos voláteis como o selênio é necessário o uso de modificadores químicos a fim de reduzir a perda da espécie analítica durante as etapas de aquecimento. Uma alternativa para contornar estes problemas é converter os elementos (Sb, As, Bi, Ge, Pb, Se, Te e Sn) em hidretos voláteis e, então, separá-los da matriz e determiná-los por Espectrometria de Absorção Atômica. A maioria dos problemas associados aos métodos espectrométricos de absorção atômica com geração de hidretos são os efeitos de interferências de alguns elementos os quais reduzem bastante o sinal analítico. O método de geração de hidretos é altamente dependente da geometria do sistema geração de hidretos e isto afeta diretamente no limite de detecção. Para o método EAA-GH discreto, o transporte de hidreto é um fator crítico. Neste caso, os sistemas em fluxo são superiores e mais versáteis do que os métodos discretos⁴⁸.

Estes últimos métodos de determinação apresentam várias desvantagens como, por exemplo, complexidade e custo dos instrumentos; juntamente com a necessidade de algum grau de habilidade no desenvolvimento da operação. Portanto é importante o desenvolvimento de métodos sensíveis que sejam de baixo custo e facilidade da técnica quanto a operação tal como a espectrofotometria.

Geralmente as determinações espectrofotométricas são precedidas por algum processo de extração líquido-líquido do complexo piazoselenol e as metodologias propostas são sensíveis à variação de pH do meio, de temperatura e outros parâmetros físico-químicos do sistema. Algumas dessas reações de formação do piazoselenol são muito lentas para o desenvolvimento da cor e o número de interferentes que a determinação está sujeita varia de acordo com o composto o-diamina empregado para formar o piazoselenol⁴⁹. Entretanto, para determinação de selênio destacamos o reagente 2,3-diaminonaftaleno por apresentar maior sensibilidade em comparação com os outros compostos o-diaminas⁴⁹.

Um procedimento determinativo⁴⁹ é a extração do complexo piazoselenol em tolueno ou clorofórmio e detecção espectrofotométrica a 330 nm na faixa de 0,05 a 7,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selênio empregando o 1,2-diaminobenzeno. As características da metodologia proposta sugerem que possíveis modificações podem tornar o procedimento mais eficiente.

Uma possibilidade bastante viável de melhorar o procedimento determinativo é o emprego da técnica de extração líquido-líquido por fase única. A solução fase única favorece o contato dos reagentes facilitando a reação química e, além disso, a presença de um solvente orgânico pode proporcionar um aumento da sensibilidade analítica na determinação espectrofotométrica. Assim, o uso desta solução como meio reacional, sem a separação das fases, pode proporcionar metodologia de boa sensibilidade para determinação de selênio.

I.3 – Sistema fase única

I.3.1 – Extração por fase única

A técnica de extração líquido-líquido por fase única, ou simplesmente extração por fase única, foi proposta por Martins⁵⁰ na qual íons metálicos são extraídos com agentes complexantes. O sistema empregado consistia de uma mistura de água-acetona-benzeno (ou ciclohexano), sendo a acetona adicionada em excesso para que este sistema fosse levado a uma única fase líquida. Nessa solução em fase única (solução FU) podem dar-se reações de complexação, como de um agente quelante e um íon metálico. No caso foi empregado tenoiltrifluoroacetona (TTA) como agente quelante e as extrações estudadas com os íons metálicos ferro, cobre e cobalto. A complexação é função da concentração hidrogeniônica da solução FU, podendo-se com a adição de ácido ou de base a solução complexar ou evitar complexação dos íons metálicos⁵⁰.

Silva⁵¹, estudou a complexação dos seguintes íons metálicos Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II) e Pb(II) nos sistema fase única água-etanol-metilisobutilacetona(MIC), usando tenoiltrifluoroacetona (TTA) como quelante. Da Silva⁵² efetuou extrações por fase única no sistema água-acetona-benzeno com tenoiltrifluoroacetona e fosfato de tri-n-butila (TBP) como complexantes, para os metais Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) e U(VI). Manzano⁵³ estudou o comportamento dos íons metálicos Cr(III), Mn(II), Fé(III), Co(II), Ni(II) e Cu(II) no sistema fase única água-acetona-benzeno empregando como agente quelante acetilacetona(ACAC).

A extração por fase única também apresenta a possibilidade de pré-concentração. Neste intuito, Barbosa⁵⁴ estudou o emprego da solução fase única água-etanol-clorofórmio como técnica de pré-concentração para determinação de íons Hg(II) com ditizona. Gonçalves⁵⁵ estudou a influência da composição da mistura água-etanol-

clorofórmio na extração por fase única de chumbo com ditizona. Já Freitas⁵⁶ estudou a determinação e a extração de cádmio(II) empregando 1-(2-piridilazo)-2-naftol e a mistura homogênea de solventes água-etanol-clorofórmio.

Andrade et al⁵⁷ propuseram um procedimento analítico para determinação espectrofotométrica de Mo(VI) com α -benzoiloxima empregando a técnica de extração por fase única na mistura água-etanol-clorofórmio.

I.3.2 – Outras aplicações da solução fase única

A solução fase única não é estudada apenas no sentido da extração. Eiras et al⁵⁸ estudaram o emprego da solução fase única água-etanol-metilisobutilacetona(MIC) na determinação de Cr(III) por espectrofotometria de absorção atômica por chama.

Outra aplicação da solução fase única é a determinação de Cu, Co e Pb em gasolina. Neste caso, Ozcan et al⁵⁹ estudaram a determinação direta dos elementos empregando a espectrometria de absorção atômica por atomização eletrotérmica na solução fase única água-etanol-gasolina.

A partir de outra característica importante da fase única que é a sua capacidade em dissolver, com certas limitações, tanto compostos inorgânicos como compostos orgânicos, Eiras et al⁶⁰ empregaram a solução fase única água-acetona-diclorometano para realização da clivagem oxidativa do cicloexeno com permanganato de potássio na obtenção do ácido adípico, sendo o produto extraído para a fase orgânica (diclorometano).

Borges et al⁶¹ empregaram as propriedades da mistura de 3 componentes para determinação do teor alcoólico de cachaças. A solução fase única empregada para este propósito foi água-etanol-clorofórmio.

Observamos que as maiorias dos estudos empregando soluções fase única são para reações de complexações de íons metálicos e suas respectivas extrações. Neste trabalho estudou-se a possibilidade de determinação de um não-metal na fase única – o selênio.

O sistema fase única estudado neste trabalho é constituído de água, etanol e clorofórmio (ou tolueno), tendo como ligante o 2,3-diaminonaftaleno e como íon de interesse o selênio. No anexo 1, estão algumas informações dos solventes estudados.

II – OBJETIVOS

Estudar a reação entre Se(IV) e 2,3-diaminonaftaleno nas misturas homogêneas dos solventes água-etanol-clorofórmio ou água-etanol-tolueno, visando a possibilidade de empregar o produto da reação (4,5-benzopiazoselenol) para detecção espectrofotométrica de selênio.

Para esta finalidade propõe-se estudar todas as variáveis que afetam a reação para isto destacam-se:

- 1 – Estudar a influência das variáveis pH, tempo, temperatura e concentração do complexante 2,3-diaminonaftaleno empregando as técnicas quimiométricas de otimização;
- 2 – Estudar a influência da composição dos solventes na sensibilidade analítica empregando o planejamento de misturas;
- 3 – Comparar as figuras de mérito obtidas com demais métodos espectrofotométricos.

III – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

III.1 – Materiais e Reagentes

III.1.1 – Instrumental

Balança Analítica - OHAUS[®], Modelo AS120 - Precisão 0,1 mg.

Espectrofotômetro HACH – DR 4000/U

pHmetro - ANALION, Modelo PM608.

Banho Ultratermostatizado – Marconi, Modelo BTC-9090 – Precisão 0,1 °C

Ultrasonic Cleaner – UNIQUE – Modelo: 1450 USC

III.1.2 – Materiais de vidro

Buretas de 10,0; 25,0 e 50,0 mL

Erlenmeyers de 250 mL

Pipetas graduadas de 1,00 ; 2,00; 5,00 e 10,00 mL

Balões volumétricos de 10,00; 25,00; 50,00; 100,00 e 1000,0 mL

III.1.3 – Reagentes

Etanol - DINÂMICA

Clorofórmio – ISOFAR

Tolueno - REAGEN

Ampola de solução de dióxido de selênio 1000 mg - MERCK

2,3-diaminonaftaleno – ACROS

Dodecilsulfato de sódio - VETEC

III.2 - Soluções

III.2.1 - Soluções de 2,3-diaminonaftaleno (DAN)

Em um balão volumétrico adicionou-se quantitativamente a massa de 2,3-diaminonaftaleno, correspondente à concentração desejada e, em seguida completou-se o volume com clorofórmio ou tolueno, conforme o caso em estudo.

III.2.2 - Soluções de selênio

Diluiu-se para um balão de 1000 mL a solução padrão de dióxido de selênio contendo 1000 mg de Se, contido na ampola, obtendo assim uma solução estoque de concentração 1000 mg.L^{-1} . As diversas soluções de trabalho de selênio foram obtidas por diluição a partir da solução estoque.

III.3 – Obtenções dos diagramas de fases

Efetuuou-se titulações, até o ponto de opalescência, de diferentes misturas dos pares de solventes miscíveis com o terceiro solvente. Obteve-se assim um conjunto dos respectivos volumes dos solventes permitindo a obtenção dos diagramas de fases estudados.

III.4 – Verificação da formação do complexo 4,5-benzopiazoslenol nas misturas homogênea de solventes

III.4.1 – Preparação da fase única

A preparação da fase única foi feita tomando-se um ponto da região fase única convenientemente escolhido do diagrama de fases e, conhecendo-se os volumes correspondentes a tal ponto, juntaram-se primeiramente em um recipiente volumes dos solventes miscíveis, água e etanol, e a seguir introduziu-se o terceiro componente. Neste trabalho a fase aquosa introduz o íon selênio no sistema e a fase orgânica (clorofórmio e/ou tolueno) introduz o complexante 2,3-diaminonaftaleno.

III.4.2 – Verificação do comprimento de onda de absorção do complexo formado

Para verificação do comprimento de onda de absorção máxima do complexo nos sistemas em estudo escolheu-se as seguintes frações em massa: 0,12:0,54:0,34 respectivamente para os solventes água-etanol-clorofórmio e 0,14:0,63:0,23 respectivamente para os solventes água-etanol-tolueno. Em volumes, os sistemas são iguais e correspondem a 1,0; 6,0 e 2,0 mL. A fase única foi preparada adicionando-se 1,0 mL de solução de Se(IV) – 50 mg.L⁻¹ (pH = 2,0), 6,0 mL de etanol seguido da adição de 2,0 mL de solução 0,002% m/v de 2,3-diaminonaftaleno em clorofórmio ou tolueno.

III.4.3 – Estudo da concentração de DAN nos sistemas

Mantendo constante a concentração de selênio a 10 mg.L⁻¹ em pH = 2,00, na porção aquosa, e temperatura igual a 25 °C (± 2) variou-se a concentração de DAN na fase única pela adição de volumes diferentes de uma solução de DAN – 0,100% m/v e completando-se a solução fase única com o etanol e o restante de solvente extrator (clorofórmio ou tolueno). Obteve-se leitura de absorbância contra um branco de reagentes.

III.4.4 – Estudo da influência do tempo, temperatura e pH

Para verificar a influência do tempo, temperatura e pH foi realizado um planejamento fatorial 2³ nos dois sistemas. Neste estudo empregou-se uma concentração de selênio de 10 mg.L⁻¹ (na porção aquosa), porém as concentrações de DAN empregadas nos dois sistemas foram diferentes: 1,0 mL de solução de DAN – 0,100% m/v para o sistema contendo clorofórmio e 0,5 mL para o sistema contendo tolueno. As proporções dos solventes foram completadas para manter constante as proporções descritas no item III.4.2.

III.4.5 – Obtenção da curva analítica de calibração preliminar

A partir das condições experimentais otimizadas obteve-se uma curva analítica de calibração e suas respectivas figuras de mérito. Para o sistema água-etanol-clorofórmio empregou-se pH = 1,0, tempo de 40 minutos, temperatura de 23 °C e 1,0 mL de uma solução de DAN – 0,100% m/v, enquanto que para o sistema água-etanol-tolueno empregou-se pH = 1,0, tempo de 30 minutos, temperatura de 45 °C e 0,5 mL de uma solução de DAN – 0,100% m/v. As proporções dos solventes foram completadas para manter constante as proporções descritas no item III.4.2.

III.4.6 – Estudo da influência da composição da mistura homogênea de solventes

III.4.6.1 – Sistema água-etanol-clorofórmio

Efetuuou-se o planejamento com 11 pontos na região de fase única do sistema estudado, ressaltando a triplicata no ponto central. No preparo das misturas manteve-se constante na solução fase única a concentração tanto de selênio como de 2,3-diaminonaftaleno a 1,0 mg.L⁻¹ e 0,010 % m/v, respectivamente. As misturas preparadas foram colocadas em um banho termostatizado à 23 °C (± 2) durante 40 minutos e em seguida obteve-se medida de absorvância em espectrofotômetro a 380 nm.

III.4.6.2 – Sistema água-etanol-tolueno

Efetuuou-se o planejamento com 9 pontos distribuídos na região de fase única do sistema estudado, ressaltando a triplicata no ponto I. No preparo das misturas manteve-se constante a concentração tanto de selênio como de 2,3-diaminonaftaleno na solução fase única a 1,0 mg.L⁻¹ e 0,010 % m/v, respectivamente. As misturas preparadas foram colocadas em um banho termostatizado a 45 °C (± 2) durante 30 minutos e em seguida obteve-se medida de absorvância em espectrofotômetro a 380 nm.

III.4.7 – Obtenção da curva analítica de calibração

Empregando a composição de máxima sensibilidade obteve-se uma segunda curva analítica de calibração confrontando suas figuras de mérito com as figuras de mérito da curva analítica preliminar (item III.4.5).

III.4.8 – Avaliação da adição do surfactante dodecilsulfato de sódio

Foram adicionadas diferentes quantidades em massa de dodecilsulfato de sódio nos sistemas estudados para avaliar a influência na sensibilidade analítica. Para isto mantiveram-se todas as outras condições constantes. No sistema água-etanol-clorofórmio empregou-se pH = 1,0 na porção aquosa, tempo de 40 minutos, temperatura de 23 °C, [Se(IV)] = 10 mg.L⁻¹ na porção aquosa, [DAN] = 0,01 % m/v na fase única e composição 2,0:4,0:1,0 v/v respectivamente para os solventes água, etanol e clorofórmio. Para o sistema água-etanol-tolueno empregou-se pH = 1,0 na porção aquosa, tempo de 30 minutos, temperatura de 45 °C, [Se(IV)] = 10 mg.L⁻¹ na porção aquosa, [DAN] = 0,01 % m/v na fase única e composição 2,0:12,0:1,0 v/v respectivamente para os solventes água, etanol e tolueno.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 – Diagrama de fases

Uma das melhores maneiras de mostrar como o equilíbrio de fases varia com a composição do sistema é usar um diagrama de fases triangular⁶². Sendo o sistema constituído de três componentes, tem-se que a soma das frações em massa de cada espécie ou componente é numericamente igual a 1 (um).

O diagrama ternário água-etanol-clorofórmio foi obtido do trabalho de Barbosa⁵⁴. Porém, o diagrama água-etanol-tolueno foi obtido pelo processo de titulação de fases, em que o sistema constituído de dois componentes miscíveis é titulado com o terceiro componente até o ponto final da titulação que é observado quando a mistura miscível se torna opaca (turva), este ponto é denominado de opalescência. Os valores gastos dos volumes dos solventes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Volumes titulados da mistura etanol-tolueno com o volume gasto do titulante água, juntamente com as respectivas frações em massa.

Volume variável, mL		Titulante, mL	Fração massa (m/m)		
Volume de Etanol	Volume de Tolueno	Volume de Água	Água	Etanol	Tolueno
10,0	1,0	7,2	45,20	49,38	5,42
6,0	2,0	1,9	22,76	56,54	20,70
10,0	2,0	4,1	29,94	57,44	12,62
16,0	2,0	8,6	37,53	54,93	7,54
8,0	2,0	2,9	26,55	57,63	15,82
14,0	2,0	7,0	35,46	55,79	8,75
18,0	2,0	10,2	39,10	54,28	6,62
24,0	2,0	16,9	45,06	50,34	4,61
30,0	2,0	33,0	56,58	40,46	2,96
5,0	5,0	0,9	9,83	42,98	47,19
10,0	5,0	2,6	17,58	53,20	29,21
20,0	5,0	7,6	27,48	56,90	15,62
30,0	5,0	14,2	33,71	56,03	10,25
10,0	7,0	2,3	14,19	48,52	37,29
10,0	15,0	1,7	7,55	34,93	57,53
6,0	16,0	0,9	4,63	24,28	71,09

* Densidades⁵⁵ (g/cm³) a 25 °C: água – 0,999, etanol – 0,789 e tolueno – 0,862

Os valores da fração da massa de água, etanol e tolueno, obtidos na titulação, foram plotados no gráfico para construção da curva binodal de separação do diagrama ternário, também chamado de diagrama de Gibbs e Roozeboom⁶². Os diagramas

ternários obtidos para os sistemas água-etanol-clorofórmio e água-etanol-tolueno estão apresentados na Figura 3.

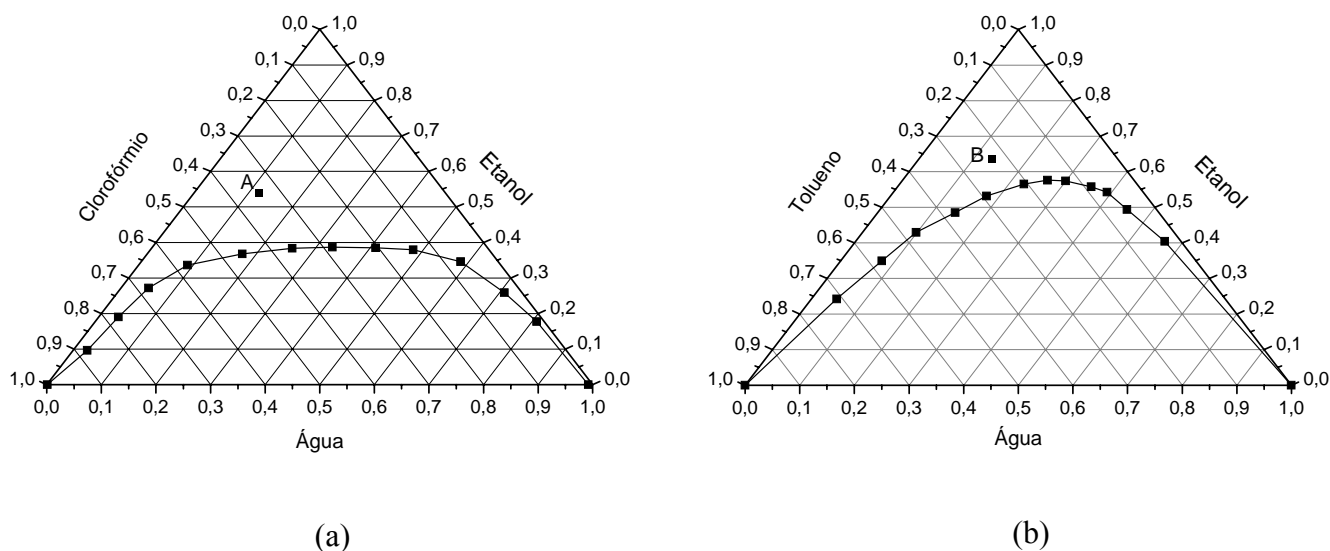


Figura 3 – Diagramas ternários obtidos a 25 °C.

(a) água-etanol-clorofórmio. (b) água-etanol-tolueno.

Os pontos A e B observados apresentam a composição 1:6:2 v/v, respectivamente para os solventes água, etanol e clorofórmio (ou tolueno).

Observa-se nos diagramas que existem dois pontos localizados na base do diagrama de fases que não foram determinados. O primeiro ponto seria a solubilidade do clorofórmio (ou tolueno) em água e o segundo seria a solubilidade da água em clorofórmio (ou tolueno) que foram obtidas da literatura⁶³, que são:

Solubilidade (20 °C): Clorofórmio/água: 0,822 g/100g

Solubilidade (23 °C): Água/Clorofórmio: 0,072 g/100g

Solubilidade: Tolueno/Água: 0,627 g/100g

Solubilidade: Água/Tolueno: não informado

Transformando estes valores para composições em frações massa/massa temos:

→ (Água; Etanol; Clorofórmio) = (0,9918; 0,0; 0,0082)

→ (Água; Etanol; Clorofórmio) = (0,0007; 0,0; 0,9993)

→ (Água; Etanol; Tolueno) = (0,9994; 0,0; 0,0006)

→ (Água; Etanol; Tolueno) = (não informado)

Esses dados são de grande importância, pois possibilitou determinar em quais pontos da base do diagrama de fases a curva binodal termina.

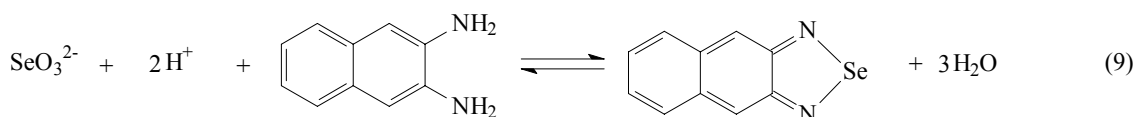
Analisando os diagramas, nos vértices do triângulo tem-se a presença de um componente puro. Ao longo das arestas tem-se a mistura binária e no interior do triângulo, como os pontos A e B, tem-se uma composição ternária. Dois pares idealmente miscíveis água-etanol e clorofórmio(ou tolueno)-etanol formam regiões de fase única e que o sistema água-clorofórmio(ou tolueno), ao longo da base do triângulo, forma-se uma região de duas fases. Dessa forma tem-se que a região acima da curva binodal obtida, constitui um sistema unifásico e a região abaixo da curva binodal trata-se de um sistema bifásico.

O papel do etanol, denominado de consoluta, no sistema nada mais é o de dispersar os líquidos imiscíveis, pois quando se adiciona porções de etanol às misturas, ele se distribui nas duas camadas de modo a permitir que a porção água se dissolva no clorofórmio ou tolueno.

Os pontos A e B, observados nos diagramas, são os pontos escolhidos para efetuar os experimentos iniciais da reação entre o selênio e o 2,3-diaminonaftaleno (DAN). Estes pontos possuem as seguintes frações em massa: ponto A (0,12:0,54:0,34) e ponto B (0,14:0,63:0,23) que correspondem em volumes a 1,0:6,0:2,0 mL, respectivamente para os solventes água, etanol e clorofórmio (ou tolueno). O critério de escolha destes pontos está relacionado com a distância da curva binodal pois pontos muito próximos podem desestabilizar a solução fase única devido a evaporação de algum dos solventes.

IV.2 – Verificação da formação do complexo 4,5-benzopiazoselenol

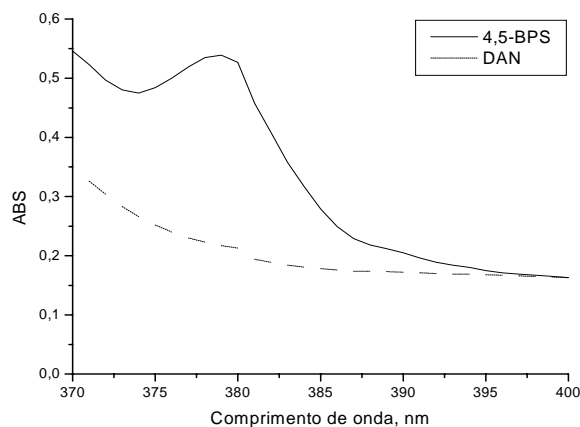
A reação de formação do complexo é dada pela equação 9, cujo mecanismo está esquematizado no anexo 2⁶⁴.



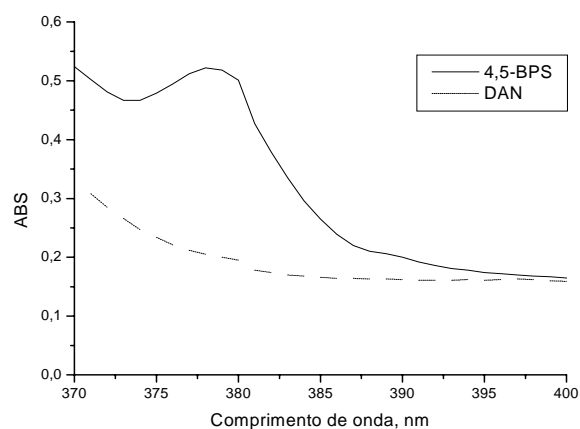
Verifica-se que a reação é dependente da concentração hidrogeniônica e desta forma, para estudos iniciais, empregou-se uma solução ácida para verificar o comprimento de onda de absorção máxima.

IV.2.1 – Verificação do comprimento de onda de absorção máxima

Os espectros de absorção para o complexante e o complexo formado nos sistemas estudados estão apresentados na Figura 4. Observa-se nos espectros que o comprimento de absorção máxima, em ambos os sistemas, ocorrem a 380 nm nas soluções fase única.



(a)



(b)

Figura 4 – Espectros do complexante DAN e do complexo formado 4,5-benzopiazoselenol
 (a) Sistema água-etanol-clorofórmio - Condições: $[Se]_{F.U}^i = 1,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,0$, $[DAN]_{F.U}^{ii} = 0,01 \text{ \%m/v}$, tempo 40 min. e temperatura de $23 \text{ }^\circ\text{C}$
 (b) Sistema água-etanol-tolueno - Condições: $[Se]_{F.U} = 1,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,0$, $[DAN]_{F.U} = 0,01 \text{ \%m/v}$, tempo 30 min. e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$.
 Composição: 1,0:6,0:2,0 v/v

ⁱ $[Se]_{F.U}$ = concentração de selênio na fase única

ⁱⁱ $[DAN]_{F.U}$ = concentração de 2,3-diaminonaftaleno na fase única

IV.2.2 - Estudo da concentração do complexante DAN

IV.2.2.1 - Sistema água-etanol-clorofórmio

A Figura 5 mostra a variação de absorvância quando se altera a concentração do complexante DAN no sistema estudado. Observa-se que a partir de um volume adicionado de 0,8 mL de DAN - 0,100 % m/m a variação de absorvância não é pronunciada. Então adotou-se como concentração ótima para este sistema um volume adicionado de 1,0 mL, pois assegurava uma faixa em que pequenas alterações na concentração não provocava perda de sinal. Para completar a proporção da solução fase única empregada adicionou-se 1,0 mL do solvente clorofórmio.

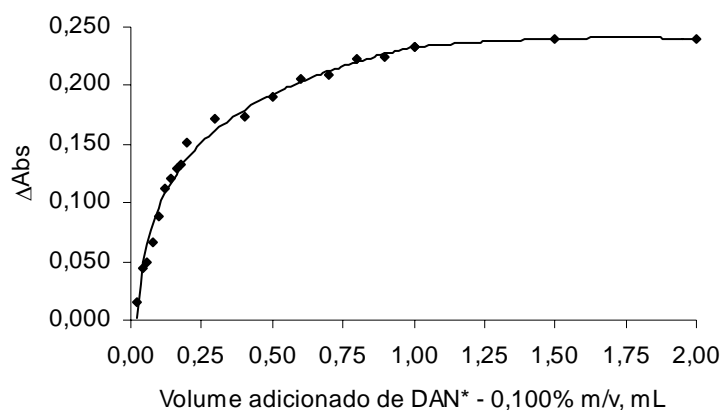


Figura 5 - Variação da absorvânciaⁱⁱⁱ em função do volume adicionado de DAN

Condições: DAN - 0,100% m/v, [Se(IV)] = 10 mg.L⁻¹, pH = 2,0,

Temperatura de 25 °C e tempo de 60 minutos.

Composição da fase única 1:6:2 v/v respectivamente para água, etanol e clorofórmio

* Adicionou-se também clorofórmio puro para completar a composição deste solvente na solução fase única.

IV.2.2.2 - Sistema água-etanol-tolueno

O estudo da variação da concentração de DAN no sistema contendo tolueno está apresentado na Figura 6. Observa-se que a partir de um volume adicionado de 0,4 mL

ⁱⁱⁱ Variação de absorvância (ΔAbs) = absorvância do complexo (4,5-BPS) – absorvância do complexante (DAN)

de DAN - 0,100% m/v a variação de absorvância não é pronunciada. Então adotou-se como concentração ótima para este sistema um volume adicionado de 0,5 mL, pois assegura uma faixa em que pequenas alterações na concentração não provoquem perda de sinal. Para completar a proporção da solução fase única empregada adicionou-se 1,5 mL do solvente tolueno.

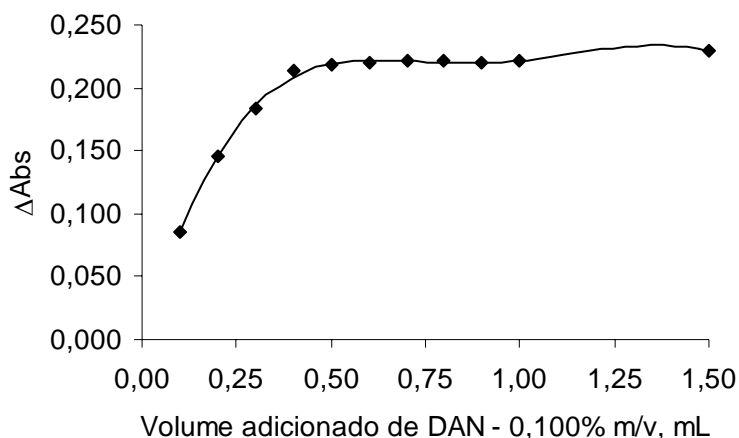


Figura 6 - Variação da absorvância em função do volume adicionado de DAN

Condições: DAN - 0,100% m/v, [Se(IV)] = 10 mg.L⁻¹, pH = 2,0,

Temperatura de 25 °C e tempo de 60 minutos.

Composição da fase única 1:6:2 v/v respectivamente para água, etanol e tolueno

* Adicionou-se também tolueno puro para completar a composição deste solvente na solução fase única.

IV.2.3 – Planejamento fatorial

No estudo das variáveis que afetam uma reação química é importante que se faça inicialmente um planejamento pois precisa-se saber em primeiro lugar o que é mesmo que se está procurando. A maioria dos planejamentos são realizados de forma a otimizar univariadamente as variáveis que afetam uma reação química, ou seja, fixa-se uma variável num certo valor e varia a outra até descobrir qual o valor dessa variável que deverá ser empregada para que se produza uma maior resposta. Executando-se desta forma todas as variáveis descobre-se a resposta ótima e os experimentos acabaram. Esta forma de planejamento pode não fornecer as melhores condições de uma determinada reação, pois as variáveis podem influenciar mutuamente, e o valor ideal para uma delas

pode depender do valor da outra. Esse comportamento é chamado de interação entre os fatores (variáveis)⁶⁵. Assim, para o estudo das variáveis que afetam a reação química entre o selênio e 2,3-diaminonaftaleno usou-se planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos para extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um mínimo de experimentos.

IV.2.3.1 – Planejamento fatorial 2^3

Neste planejamento o interesse é descobrir como a resposta (variação de absorvância) depende dos fatores pH, tempo e temperatura reacional na reação de formação do complexo 4,5-benzopiazoselenol nos sistemas ternários água-etanol-clorofórmio(ou tolueno) . Nesta situação o problema resume-se conforme a situação mostrada na Figura 7.

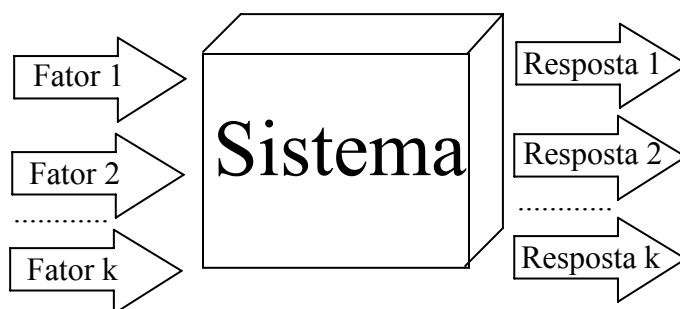


Figura 7 – Um sistema pode ser representado por uma função (em princípio desconhecida) ligando os fatores (variáveis de entrada) às respostas (variáveis de saída)⁶⁵

Na figura acima, certo número de fatores atuando sobre o sistema produz um conjunto de respostas. Então o sistema atua como uma função que opera sobre as variáveis de entrada (fatores) e produz como saída as respostas observadas. O objetivo é descobrir essa função ou pelo menos obter uma aproximação satisfatória para ela. Com isso pode-se entender melhor a natureza da reação em estudo, e assim escolher as melhores condições de operação do sistema⁶⁵.

IV.2.3.1.1 – Planejamento fatorial 2³ para o sistema água-etanol-clorofórmio

A Tabela 3 mostra um planejamento fatorial 2³ (onde o índice sobrescrito indica a quantidade de variáveis estudadas e o valor 2 indica o número de níveis escolhidos) e as variáveis estudadas: tempo(t), temperatura(T) e pH sendo a resposta variação de absorbância (Δ Abs) do sistema. Os níveis escolhidos para cada variável estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Planejamento fatorial 2³ para o sistema água-etanol-clorofórmio

Variáveis			Nível baixo (-)				Nível alto (+)			
pH			2,0				4,0			
Tempo (t), min.			10,0				30,0			
Temperatura (T), °C			30,0				45,0			
Efeitos principais			Interações				Replicatas			
pH	t	T	pHxt	pHxT	txT	pHxtxT	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média
-	-	-	+	+	+	-	0,173	0,192	0,197	0,187
+	-	-	-	-	+	+	0,162	0,176	0,182	0,173
-	+	-	-	+	-	+	0,228	0,238	0,220	0,229
+	+	-	+	-	-	-	0,194	0,179	0,184	0,186
-	-	+	+	-	-	+	0,150	0,175	0,163	0,163
+	-	+	-	+	-	-	0,217	0,236	0,219	0,224
-	+	+	-	-	+	-	0,227	0,219	0,225	0,224
+	+	+	+	+	+	+	0,251	0,246	0,233	0,243
Efeitos:										
0,006	0,034	0,020	-0,018	0,034	0,006	-0,003				

Escolheu-se para cada variável apenas dois níveis porque requerem relativamente poucos experimentos e embora sejam incapazes de explorar completamente uma grande região no espaço das variáveis, podem indicar tendências para posteriores realizações de experimentos⁶⁶.

A tabela 3 foi obtida colocando os ensaios na ordem padrão. Todas as colunas começam com o nível (-) e depois os sinais vão se alternando. Um a um na primeira coluna, depois dois a dois, e finalmente quatro sinais negativos e quatro positivos, na terceira coluna⁶⁵. Os efeitos foram calculados a partir da soma algébrica das respostas em função dos sinais (-) e (+), dividindo esta soma pelo número de sinais (-) ou (+), ou seja, quatro. Então, a média dos efeitos mede o efeito médio da variável sobre todas as condições de outras variáveis. Como exemplo, na expressão abaixo foi calculado o efeito principal tempo (2ª coluna da tabela 3). E assim procedeu-se para os cálculos dos demais efeitos principais. Para a obtenção dos sinais referentes às interações foi feita uma multiplicação dos sinais das respectivas interações. Exemplo: o primeiro sinal da interação pHxt foi obtido multiplicando-se o sinal (-) da variável pH com o sinal (-) da variável tempo e assim sucessivamente para os oito ensaios. E para os cálculos dos efeitos procede-se da mesma maneira como explicado para o cálculo dos efeitos principais.

$$\text{Efeito tempo}(t) = (-0,187 - 0,173 + 0,229 + 0,186 - 0,163 - 0,224 + 0,224 + 0,243) / 4$$

$$\text{Efeito tempo}(t) = 0,034$$

Analisando a Tabela 3 verificamos que apresenta dois grupos de efeitos: efeito principal (isto é, efeito causado por cada uma das variáveis) e efeitos de interação (isto é, efeito causado pela interação entre as variáveis que podem ser de segunda, terceira ou enésima ordem conforme o número de fatores considerados).

Porém os valores dos efeitos podem ser devido apenas a sinal de ruídos, assim a análise por meio de gráficos das normais é uma técnica alternativa para tentarmos distinguir nos resultados de um planejamento os valores que correspondem realmente aos efeitos⁶⁵. Os detalhes da técnica de análise dos efeitos pelo método das normais está apresentada no anexo 3.

Para obtenção do gráfico das normais seguindo as recomendações do anexo 3 obteve-se os dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2^3 e os valores de probabilidade cumulativa

Ordem	Efeito	Região de probabilidade cumulativa (%)	Ponto central	Z
1	-0,018	0,00 – 14,28	07,14	-1,47
2	-0,003	14,28 – 28,56	21,42	-0,79
3	0,006	28,56 – 42,84	35,70	-0,38
4	0,006	42,84 – 57,12	49,98	0,00
5	0,020	57,12 – 71,40	64,26	0,38
6	0,034	71,40 – 85,68	78,54	0,79
7	0,034	85,68 – 100,00	92,84	1,47

Analisando o gráfico das normais, apresentado na figura 8, verifica-se que os pontos que mais se distanciam da reta de média populacional zero são o efeito principal tempo (t) e a interação pHxT portanto dentre todos os efeitos estes são os mais significativos. Como a variável tempo não interage com as demais variáveis esta é uma variável independente e pode ser otimizada univariadamente. Porém, para as demais variáveis (pH e Temperatura) temos um efeito de interação e um método eficaz para sua otimização é a metodologia de superfície de resposta (MSR)⁶⁵.

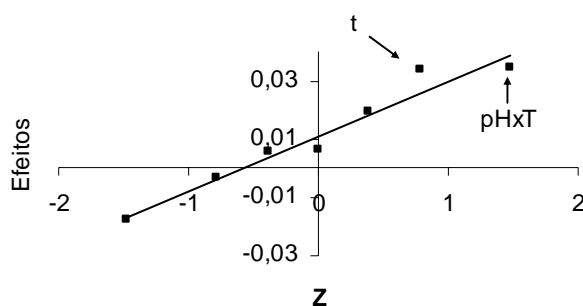


Figura 8 – Gráfico das normais dos efeitos

O gráfico de estudo do tempo de reação está apresentado na Figura 9, sendo adotado como tempo ótimo 40 minutos.

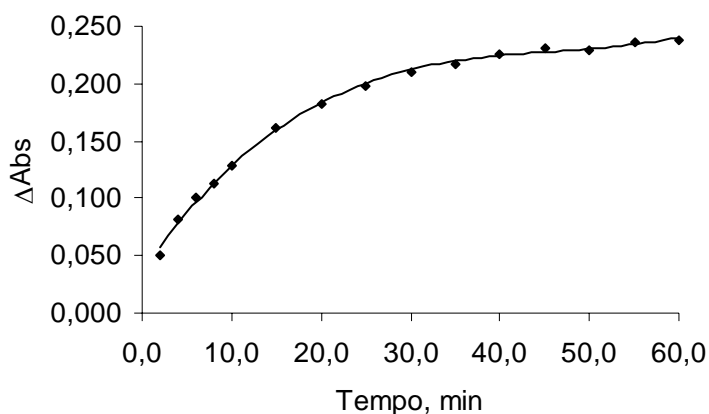


Figura 9 - Estudo do tempo de reação

Condições: $[\text{Se(IV)}] = 10 \text{ mg.L}^{-1}$ na porção aquosa
 Em $\text{pH} = 2,0$, 1,0 mL de DAN - 0,100% m/v e
 Temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Para a otimização das variáveis temperatura e pH utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 , no qual se obtém uma superfície de resposta. A primeira etapa da modelagem fornece a equação da superfície de resposta para ser explorada. Para isso, é necessário executar um conjunto de experimentos que exploram uma região conforme apresentada na Figura 10.

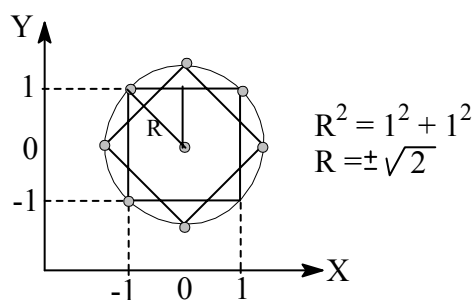


Figura 10 – Representação do planejamento fatorial composto tipo estrela com ponto central

A tabela 5 mostra o planejamento fatorial 2^2 completo das variáveis estudadas pH e temperatura(T) sendo a resposta variação de absorvância (ΔAbs) do sistema. Os níveis menos (-) e mais (+) escolhidos também estão apresentados na tabela.

Tabela 5 – Resultados do planejamento fatorial 2² tipo estrela

Variáveis		Nível baixo	Nível alto		
pH		2,0 (-)	4,0 (+)		
Temperatura (T), °C		30 (-)	45 (+)		
Variáveis		Replicatas (Δ Abs)			
pH	T	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média
-1	-1	0,244	0,248	0,235	0,242
+1	-1	0,168	0,183	0,172	0,174
-1	+1	0,249	0,246	0,257	0,251
+1	+1	0,190	0,198	0,206	0,198
-1,4	0	0,254	0,266	0,260	0,260
+1,4	0	0,172	0,161	0,159	0,164
0	-1,4	0,183	0,189	0,181	0,184
0	+1,4	0,150	0,168	0,180	0,166
0	0	0,142	0,148	0,145	0,145
0	0	0,142	0,145	0,166	0,151
0	0	0,169	0,160	0,165	0,165
Variáveis escalonadas		$X_{pH} = \frac{pH - 3,0}{1,0}$		$Y_T = \frac{T - 37,5}{7,5}$	

As equações de escalonamento apresentadas na Tabela 5 foram obtidas empregando a seguinte expressão matemática⁶⁷:

$$X_n = \frac{X_{real} - X_{médio}}{\frac{\Delta X}{2}}$$

Onde:

X_n = variável codificada

X_{real} = valor real da variável codificada

$X_{\text{m\u00e9dio}}$ = valor m\u00e9dio da amplitude de varia\u00e7\u00e3o da vari\u00e1vel

ΔX = diferen\u00e7a entre o valor superior e inferior da vari\u00e1vel

Para obter a equa\u00e7\u00e3o de modelagem de segunda ordem, conhecida tamb\u00e9m como modelo quadr\u00e1tico, foi empregado o programa Arthur para microcomputadores, disponibilizado gratuitamente na rede mundial de computadores⁶⁸. Uma discuss\u00e3o detalhada para determina\u00e7\u00e3o da equa\u00e7\u00e3o pode ser encontrada em Barros Neto et al⁶⁵.

A equa\u00e7\u00e3o de segunda ordem (equa\u00e7\u00e3o 10) refere-se a equa\u00e7\u00e3o da superf\u00edcie de resposta da otimiza\u00e7\u00e3o das vari\u00e1veis pH e temperatura no sistema \u00e1gua-etanol-clorof\u00f3rmio.

$$Z = 0,1534 - 0,0322X + 0,0010Y + 0,0355X^2 + 0,0166Y^2 + 0,0038XY \quad (10)$$

Na equa\u00e7\u00e3o acima Z representa a varia\u00e7\u00e3o de absorv\u00eancia (ΔAbs), X a vari\u00e1vel escalonada pH e Y a vari\u00e1vel escalonada temperatura (T).

A partir deste modelo obteve-se, com programas gr\u00e1ficos, a superf\u00edcie de resposta e suas linhas de contorno conforme mostra a Figura 11.

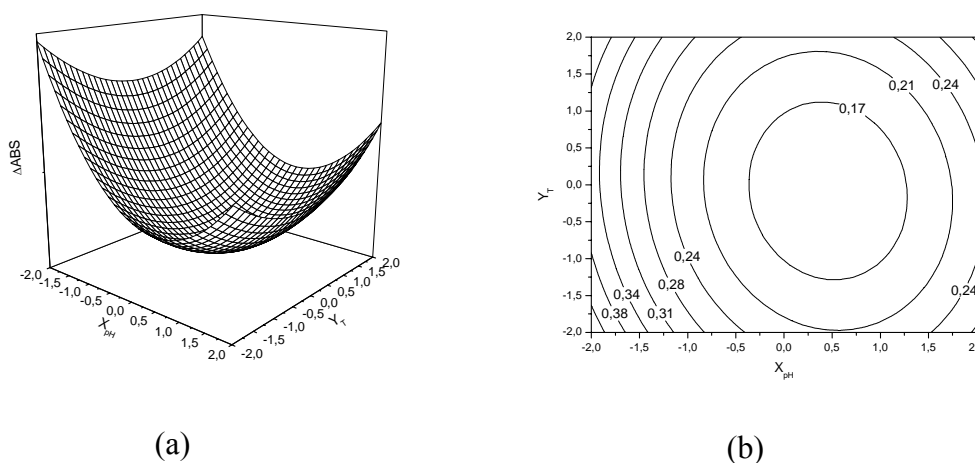


Figura 11 – (a) Superf\u00edcie de resposta e (b) Linhas de contorno

Analisando a superf\u00edcie de resposta e as linhas de contorno (figura 11b) verifica-se que o modelo sugere quatro caminhos de aumento do sinal anal\u00edtico. A dire\u00e7\u00e3o com maior aumento no sinal \u00e9 aquele realizado com a diminui\u00e7\u00e3o da vari\u00e1vel escalonada pH o que est\u00e1 de acordo com os estudos realizados anteriores e tamb\u00e9m conforme a rea\u00e7\u00e3o

de formação do complexo. Como caminho de otimização, para obtermos melhores resultados, têm-se as possibilidades para cada variável:

1 – Aumentar temperatura e diminuir ou aumentar o pH

2 – Diminuir a temperatura e diminuir ou aumentar o pH

Como a temperatura de ebulição dos solventes são relativamente baixas, aumentar a temperatura do sistema empregado torna-se indesejável visto que poderá haver perda dos solventes por evaporação e isto levaria a concentrar a solução ou desestabilizar a solução fase única devido a alteração das proporções dos solventes. Portanto a primeira possibilidade foi descartada. Para a segunda possibilidade podemos diminuir a temperatura de reação e o pH pode ser tanto diminuído como aumentado. Entretanto, aumentar o valor do pH é ação contraditória à reação prevista para o sistema – conforme item IV.2. Portanto avaliamos a possibilidade de diminuir tanto o pH como a temperatura de reação. Os resultados do caminho ao máximo estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Variáveis escalonadas e em valores reais juntamente com as respostas obtidas do caminho de ascensão ao máximo

X_{pH}	Y_T	pH	Temperatura (T), °C	ΔAbs			Média ΔAbs
-1,0	-1,0	2,0	30,0	0,244	0,248	0,235	0,242
-1,5	-1,5	1,5	26,0	0,250	0,242	0,235	0,242
-2,0	-2,0	1,0	23,0	0,260	0,258	0,258	0,259
-2,5	-2,5	0,5	18,8	0,248	0,251	0,245	0,248

Analisando a Tabela 6 verificamos um aumento no sinal (ΔAbs) quando se emprega as variáveis escalonadas -2 e -2 que correspondem a variáveis reais pH = 1,0 e temperatura igual a 23 °C (± 2). Como nestas condições obteve-se um máximo na resposta adotou-se estes valores como ótimos e obteve-se uma curva analítica de calibração preliminar.

A curva analítica de calibração preliminar está a seguir, conforme apresentada na Figura 12.

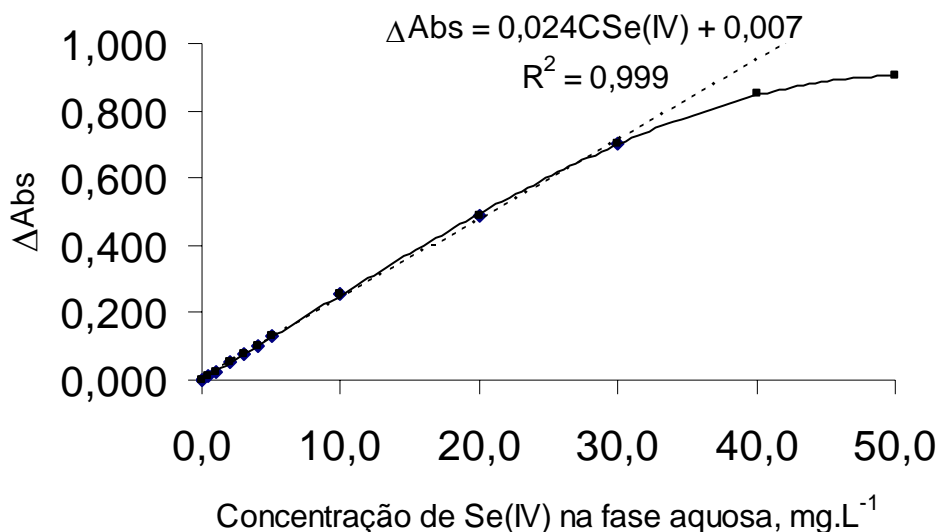


Figura 12 – Curva de calibração preliminar no sistema água-etanol-clorofórmio

Condições: 1,0 mL de DAN - 0,100% m/v, pH = 1,0, tempo de 40 minutos e Temperatura de 23 °C.

Composição: 1,0:6,0:2,0 mL respectivamente para água-etanol-clorofórmio

Observa-se na Figura 12 que a curva analítica de calibração é descrita pela equação $\Delta Abs = 0,024C_{Se(IV)} + 0,007$ ($R^2 = 0,999$) e linear até 30 mg.L⁻¹. Calculou-se o limite de detecção e o limite de quantificação, em relação ao desvio padrão do branco, encontrando um valor de 0,4 mg.L⁻¹ e 1,8 mg.L⁻¹ respectivamente, sendo estas concentrações referentes à porção aquosa da solução fase única.

IV.2.3.1.2 – Planejamento fatorial 2³ para o sistema água-etanol-tolueno

O planejamento fatorial 2³ obtido para o estudo das variáveis pH, tempo e temperatura para o sistema água-etanol-tolueno está apresentado na tabela 7. Com base nos valores dos efeitos e seguindo as recomendações do anexo 3 obteve-se a tabela 8 para construção do gráfico das normais que está apresentado na figura 13.

Tabela 7 – Planejamento fatorial 2^3 para o sistema água-etanol-tolueno

Variáveis			Nível baixo (-)				Nível Alto (+)			
pH			2,0				4,0			
Tempo (t), min.			10,0				30,0			
Temperatura (T), °C			30,0				45,0			
Efeitos principais			Interações				Replicatas			
pH	t	T	pHxt	pHxT	txT	pHxtxT	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média
-	-	-	+	+	+	-	0,150	0,142	0,154	0,149
+	-	-	-	-	+	+	0,073	0,081	0,079	0,078
-	+	-	-	+	-	+	0,202	0,192	0,201	0,198
+	+	-	+	-	-	-	0,131	0,136	0,134	0,134
-	-	+	+	-	-	+	0,170	0,178	0,187	0,178
+	-	+	-	+	-	-	0,118	0,124	0,122	0,121
-	+	+	-	-	+	-	0,241	0,227	0,235	0,234
+	+	+	+	+	+	+	0,181	0,195	0,183	0,186
Efeitos:										
-0,060	0,057	0,040	0,004	0,008	0,004	0,001				

Tabela 8 – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2^3 e os valores de probabilidade cumulativa

Ordem	Efeito	Região de probabilidade cumulativa (%)	Ponto central	Z
1	-0,060	0,00 – 14,28	07,14	-1,47
2	0,001	14,28 – 28,56	21,42	-0,79
3	0,004	28,56 – 42,84	35,70	-0,38
4	0,004	42,84 – 57,12	49,98	0,00
5	0,008	57,12 – 71,40	64,26	0,38
6	0,040	71,40 – 85,68	78,54	0,79
7	0,057	85,68 – 100,00	92,84	1,47

Observa-se na figura 13 que as variáveis que apresentam efeitos significativos são tempo(t), temperatura (T) e pH, pois estes se afastam da população de média zero. Portanto não há efeito de interação e as variáveis podem ser otimizadas de forma univariadamente, conforme apresentado na Tabela 9.

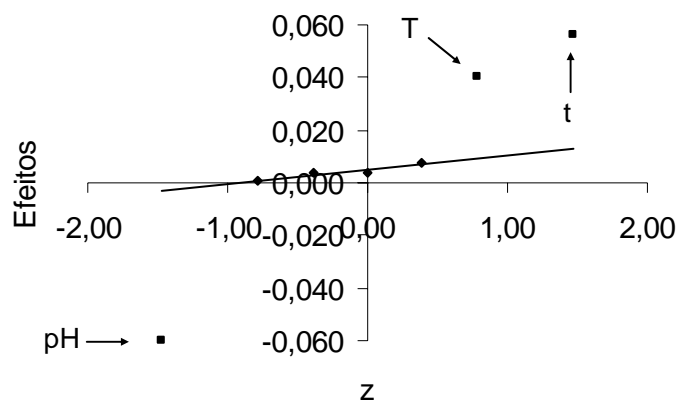


Figura 13 – Gráfico das normais dos efeitos

Tabela 9 – Resultados da otimização univariada do tempo, temperatura e pH

pH	t	T	Respostas (Δ Abs)			Média
2,0	30	45	0,241	0,227	0,235	0,234
1,5	30	45	0,257	0,252	0,255	0,255
1,0	30	45	0,254	0,259	0,261	0,258
0,5	30	45	0,250	0,255	0,262	0,256
1,0	10	45	0,198	0,199	0,199	0,199
1,0	20	45	0,244	0,239	0,245	0,243
1,0	30	45	0,254	0,259	0,261	0,258
1,0	40	45	0,261	0,255	0,261	0,259
1,0	50	45	0,255	0,254	0,253	0,254
1,0	60	45	0,261	0,263	0,260	0,261
1,0	30	25	0,204	0,203	0,200	0,202
1,0	30	35	0,251	0,237	0,244	0,244
1,0	30	45	0,254	0,259	0,261	0,258
1,0	30	55	0,248	0,250	0,248	0,249

Analisando a tabela 9 adotou-se como ótimo os seguintes valores das variáveis 1,0, 30 minutos e 45 °C, respectivamente para pH da porção aquosa, tempo e temperatura. Após definidas as variáveis obteve-se uma curva analítica de calibração preliminar que está apresentada na figura 14. A equação da reta é descrita por $\Delta\text{Abs} = 0,024C_{\text{Se(IV)}} + 0,004$ ($R^2 = 0,999$) e linear até 20 mg.L⁻¹. Calculou-se o limite de detecção e o limite de quantificação, em relação ao desvio padrão do branco, encontrando um valor de 0,2 mg.L⁻¹ e 1,1 mg.L⁻¹ respectivamente, sendo estas concentrações referentes à porção aquosa da solução fase única.

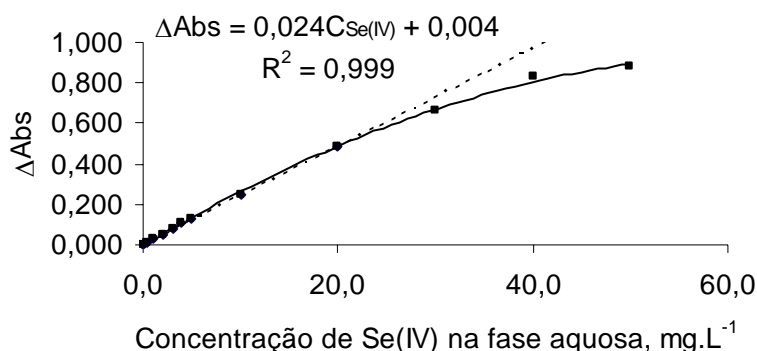


Figura 14– Curva de calibração para o sistema água-etanol-tolueno
 Condições: 0,5 mL de DAN - 0,100% m/v, pH = 1,0,
 tempo de 30 minutos e temperatura de 45 °C.
 Composição: 1,0:6,0:2,0 mL respectivamente para
 água-etanol-tolueno

IV.2.4 – Estudo de misturas

As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções dos componentes e não pela sua quantidade relativa. As proporções dos diversos componentes de uma mistura não são independentes. A soma de todas elas é sempre igual a 1. Portanto, para uma mistura de “q” componentes podemos escrever a seguinte expressão matemática⁶⁵:

$$\sum_{i=1}^q X_i = 100\% = 1$$

onde X_i representa a proporção do i -ésimo componente.

Como os sistemas estudados são misturas de três componentes tem-se que $X_1 + X_2 + X_3 = 1$, que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, conforme apresentado na Figura 15.

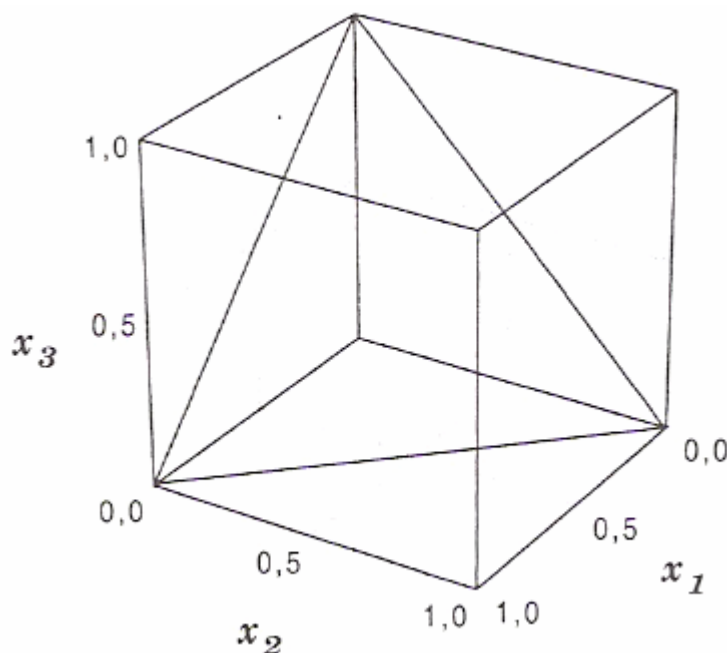


Figura 15 – Triângulo equilátero inscrito no cubo

Nos experimentos iniciais para o desenvolvimento da metodologia foi escolhida na região de fase única dos sistemas estudados uma determinada proporção dos solventes, pois a variação da proporção dos solventes pode proporcionar uma melhora na sensibilidade analítica. O estudo da influência dos solventes pode ser realizada empregando o planejamento de misturas⁶⁵.

O espaço experimental a ser estudado é a região de fase única dos sistemas em estudo. Então é necessário fazer um planejamento de mistura na região de fase única para verificar a influência dos solventes na reação de formação do 4,5-BPS. Como as composições pertencem ao diagrama ternário uma quarta variável (a resposta) forneceria uma provável superfície de resposta e suas linhas de contorno sobre o triângulo equilátero como ilustrado na Figura 16. A partir da análise da superfície e das linhas de contorno retiram-se as devidas conclusões.

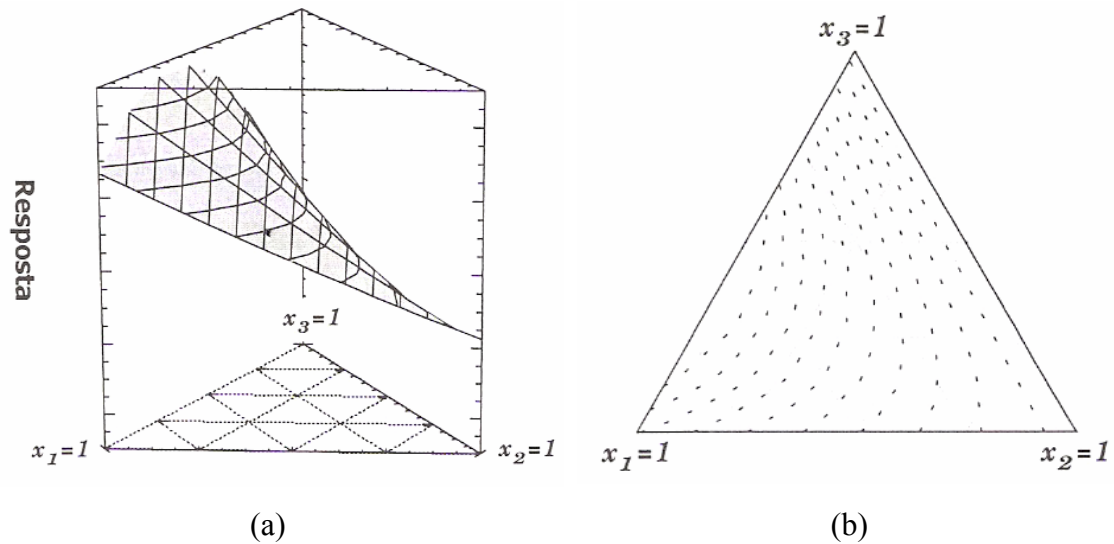


Figura 16 – (a) Uma provável superfície de resposta para uma mistura de três componentes. (b) Suas linhas de contorno ou curvas de nível

IV.2.4.1 – Influência da composição no sistema ternário água-etanol-clorofórmio

O planejamento de misturas com 11 pontos na região fase única, conforme ilustrado na Figura 17, forneceram as respostas apresentadas na Tabela 10.

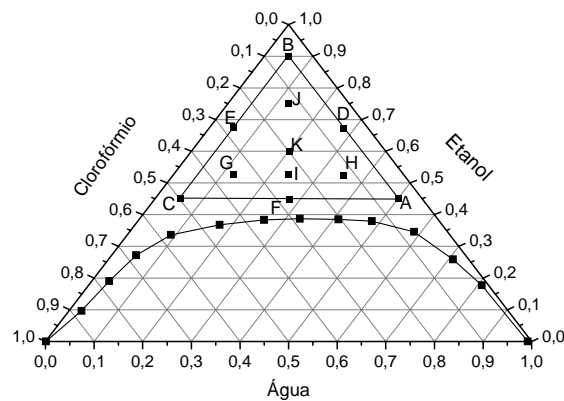


Figura 17 - Diagrama ternário água-etanol-clorofórmio com os pontos do planejamento experimental das misturas.

Tabela 10 – Matriz da composição do sistema ternário homogêneo de solventes água-etanol-clorofórmio e matriz resposta

Ponto	Matriz composição			Matriz resposta
	Fração de água	Fração de etanol	Fração de clorofórmio	Δ Abs
A	0,500	0,450	0,050	0,220
B	0,050	0,900	0,050	0,180
C	0,050	0,450	0,500	0,182
D	0,275	0,675	0,050	0,200
E	0,050	0,675	0,050	0,174
F	0,275	0,450	0,275	0,223
G	0,125	0,525	0,350	0,211
H	0,350	0,525	0,125	0,212
I	0,237	0,526	0,237	0,229
J	0,125	0,750	0,125	0,211
K*	0,200	0,600	0,200	0,210
K*	0,200	0,600	0,200	0,208
K*	0,200	0,600	0,200	0,210

* Triplicata no ponto central

Através de programas estatísticos⁶⁸ obteve-se a equação do modelo quadrático conforme mostra a equação 11.

$$\Delta\text{Abs} = 0,1767X + 0,1728Y + 0,1382Z + 0,1180XY + 0,0345XZ + 0,6003YZ \quad (11)$$

Onde X = fração de etanol; Y = fração de água e Z = fração de clorofórmio.

Analisando os coeficientes da equação 11 observa-se que o alto valor do coeficiente YZ sugere imediatamente uma forte interação sinérgica entre os componentes água e clorofórmio. Porém a componente água contribui mais para o aumento do sinal. Isto quer dizer que a presença simultânea dos dois componentes na mistura aumenta mais acentuadamente o sinal analítico. Então se deve ter mais água do que clorofórmio sendo que isto é condizente com o sistema visto que aumentar a

quantidade de clorofórmio no sistema este tende em direção à região bifásica desfavorecendo o contato íntimo dos reagentes.

A partir da equação do modelo (equação 11) obtiveram-se as linhas de contorno apresentadas na Figura 18.

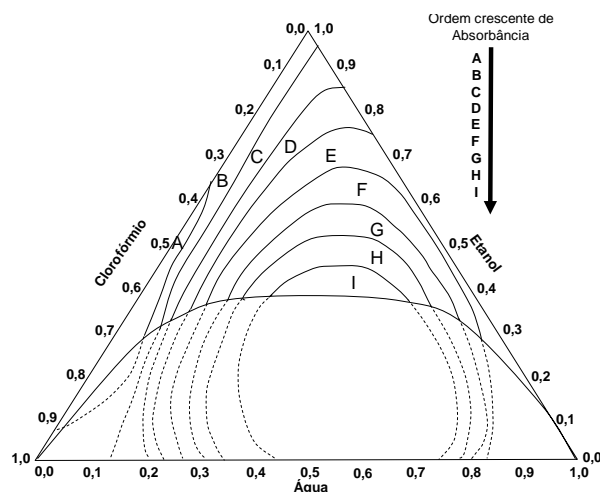


Figura 18 – Linhas de contorno^{iv} obtida com o planejamento de misturas para o sistema água-etanol-clorofórmio

Observa-se que a região central do triângulo é a que apresenta máxima absorvância, ou seja, a região representada pela letra I. Assim escolheu-se nesta região a fração em massa 0,34:0,40:0,26, respectivamente para os solventes água, etanol e clorofórmio, que corresponde em volumes a 2,0; 3,0 e 1,0 mL, para obter uma nova curva analítica de calibração.

A curva analítica de calibração apresentada na Figura 19 é descrita pela equação $\Delta\text{Abs} = 0,273C_{\text{Se(IV)}} + 0,023$ ($R^2 = 0,999$) e linear até $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Apresenta um limite de detecção de $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ e um limite de quantificação igual a $0,43 \text{ mg.L}^{-1}$, calculados em relação ao desvio padrão do branco, sendo estas concentrações referentes à fase única. Desta forma, para comparar esta curva de calibração com a obtida antes do planejamento de misturas deve-se transformar a concentração referente a fase única para fase aquosa. Após a conversão encontrou-se que o limite de detecção e de quantificação, referente à fase aquosa, são $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. A comparação das duas curvas de calibração está apresentada na Figura 20.

^{iv} As linhas de contorno pontilhadas são hipóteses para tendência da superfície

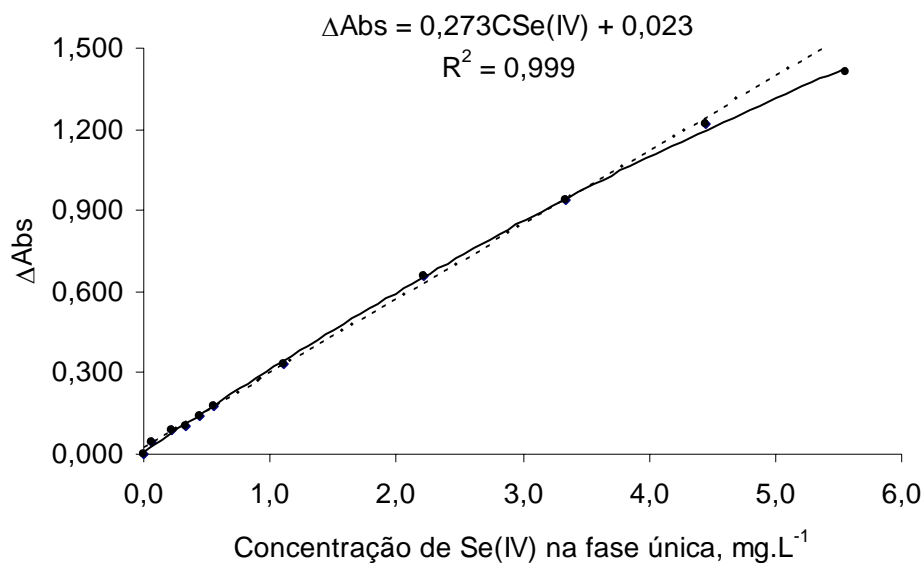


Figura 19 – Curva analítica de calibração no sistema água-etanol-clorofórmio após planejamento de misturas

Condições: 1,0 mL de DAN - 0,100% m/v, pH = 1,0, tempo de 40 minutos e temperatura de 23 °C.

Composição: 2,0:3,0:1,0 mL respectivamente para água-etanol-clorofórmio

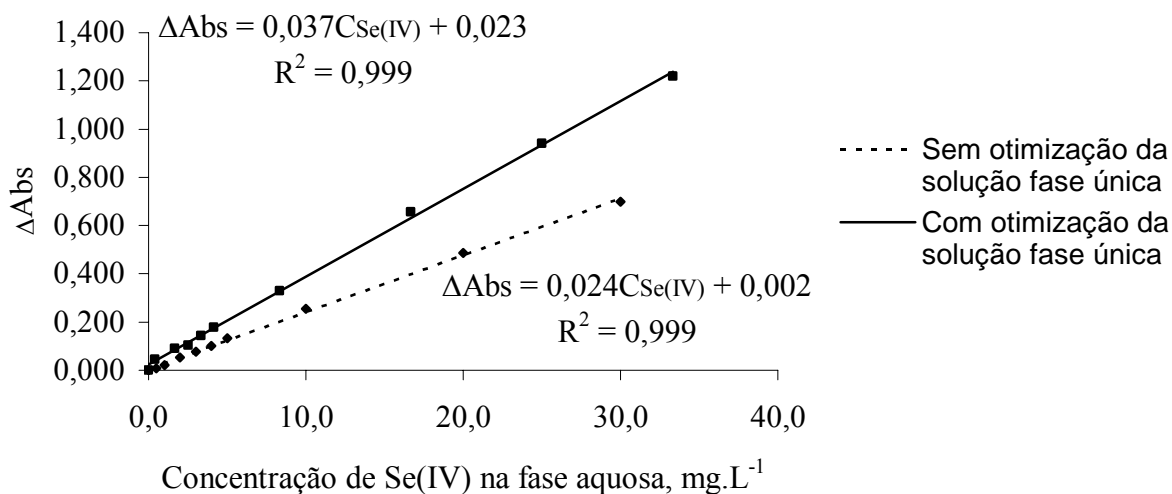


Figura 20 – Comparação das curvas analíticas de calibração no sistema água-etanol-clorofórmio

Comparando-se os coeficientes angulares observa-se que a curva obtida após a otimização da composição das misturas apresenta maior sensibilidade. O ganho referente a esta otimização foi de aproximadamente 54 %. Então a fração em massa

0,34:0,40:0,26, respectivamente para os solventes água, etanol e clorofórmio, que corresponde em volumes a 2,0:3,0:1,0 mL, foi adotada como condição ótima para dar prosseguimento ao estudo.

IV.2.4.2 – Influência da composição no sistema ternário água-etanol-tolueno

Realizando o mesmo estudo de misturas, porém, para o sistema água-etanol-tolueno obteve-se as respostas para o planejamento com 9 pontos na região fase única (Figura 21) que estão apresentadas na Tabela 11.

A equação do modelo quadrático obtido para este planejamento está apresentada na equação 12.

$$\Delta\text{Abs} = 0,1830X - 0,1972Y - 0,1661Z + 0,5117XY + 0,2259XZ + 1,0245YZ \quad (12)$$

Onde X = fração de etanol; Y = fração de água e Z = fração de tolueno.

Observa-se no modelo que o efeito de interação YZ é mais pronunciado. Isto significa que a resposta é mais influenciada através das frações de água e tolueno.

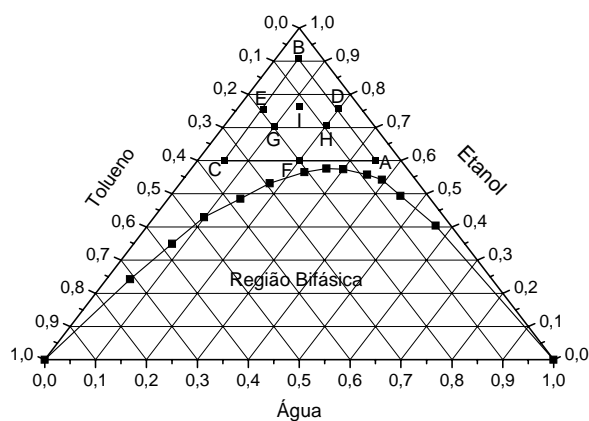


Figura 21 - Diagrama ternário água-etanol-tolueno com os pontos do planejamento experimental das misturas.

Tabela 11 – Matriz da composição do sistema ternário homogêneo de solventes água-etanol-tolueno e matriz resposta

Ponto	Matriz composição			Matriz resposta
	Fração de água	Fração de etanol	Fração de clorofórmio	Δ Abs
A	0,350	0,600	0,050	0,165
B	0,050	0,900	0,050	0,181
C	0,050	0,600	0,350	0,123
D	0,200	0,750	0,050	0,185
E	0,050	0,750	0,200	0,158
F	0,200	0,600	0,200	0,168
G	0,100	0,700	0,200	0,158
H	0,200	0,700	0,100	0,176
I*	0,120	0,760	0,120	0,175
I*	0,120	0,760	0,120	0,180
I*	0,120	0,760	0,120	0,185

* Triplicata no ponto I

A partir da equação 12 se obteve as linhas de contorno que estão apresentadas na Figura 22.

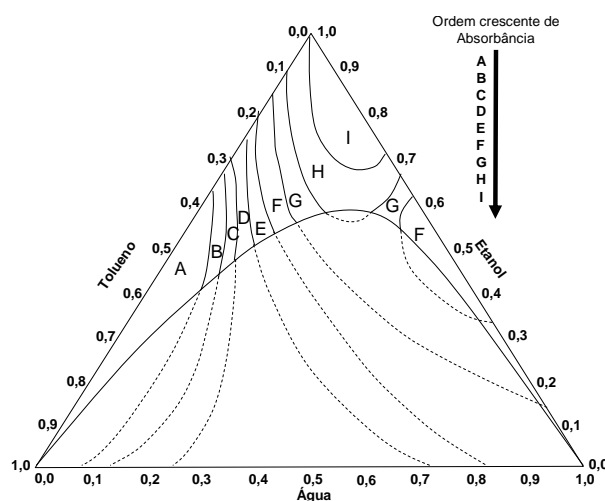


Figura 22 – Linhas de contorno^v obtida com o planejamento de misturas para o sistema água-etanol-tolueno

^v As linhas de contorno pontilhadas são hipóteses para tendência da superfície

Analisando as linhas de contorno observa-se que a região de máxima absorvância está situada na área representada pela letra I. Assim escolheu-se como ponto ótimo a seguinte composição 0,16:0,77:0,07, em fração m/m respectivamente para os solventes água, etanol e tolueno, que corresponde em volumes a 2,0:12,0:1,0 mL. Nesta proporção obteve-se uma nova curva analítica de calibração que está apresentada na Figura 23.

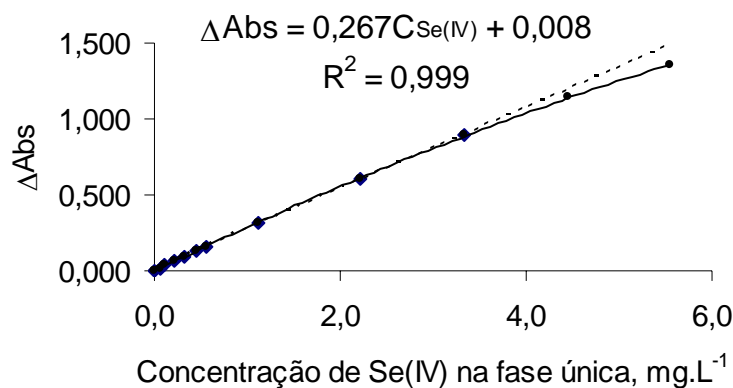


Figura 23 – Curva de calibração após o planejamento de misturas no sistema água-etanol-tolueno
 Condições: 0,5 mL de DAN - 0,100% m/v, pH = 1,0, tempo de 30 minutos e temperatura de 45 °C.
 Composição: 2,0:12,0:1,0 mL respectivamente para água-etanol-tolueno

A curva analítica de calibração apresentada na Figura 23 é descrita pela equação $\Delta Abs = 0,267C_{Se(IV)} + 0,008$ ($R^2 = 0,999$) e linear até 3,5 mg.L⁻¹. Apresenta um limite de detecção de 0,004 mg.L⁻¹ e um limite de quantificação igual a 0,082 mg.L⁻¹, calculados em relação ao desvio padrão do branco, sendo estas concentrações referentes à fase única. Desta forma, para compararmos esta curva de calibração com a obtida antes do planejamento de misturas devemos transformar a concentração referente a fase única para fase aquosa. O limite de detecção e de quantificação, referente à fase aquosa, obtidos foram 0,03 mg.L⁻¹ e 0,62 mg.L⁻¹. Assim a comparação das duas curvas de calibração está apresentada na Figura 24.

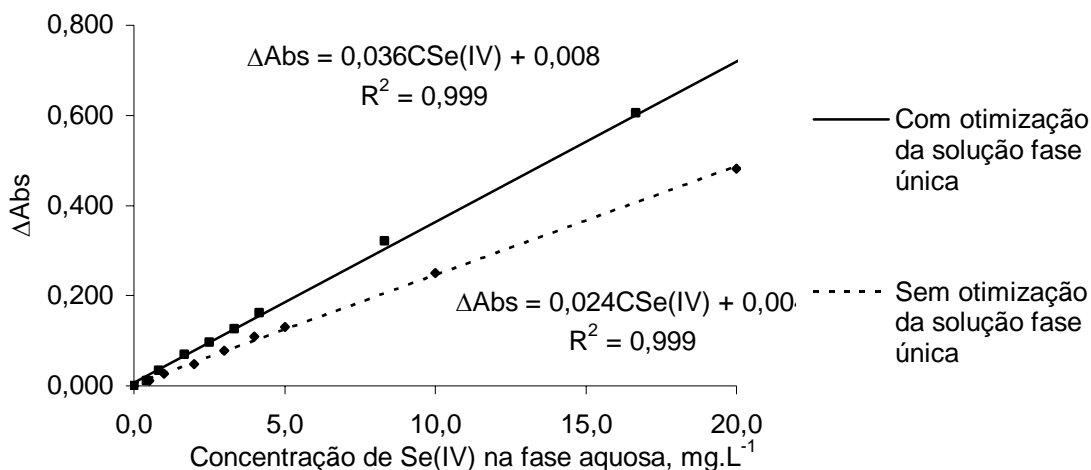


Figura 24 – Comparação das curvas de calibração referente a otimização do planejamento de misturas

Comparando-se os coeficientes angulares observa-se que a curva obtida após otimização da composição das misturas apresenta maior sensibilidade. O ganho referente a esta otimização foi de aproximadamente 50 %. Então a composição 0,16:0,77:0,07 em fração m/m, que corresponde em volumes a 2,0:12,0:1,0 mL, respectivamente para os solventes água, etanol e clorofórmio, foi adotada como condição ótima para dar prosseguimento ao estudo.

IV.2.5 – Avaliação do emprego de dodecilsulfato de sódio na sensibilidade analítica

Sabe-se que surfactantes apresentam propriedades não apenas para aumentar a solubilidade de compostos não polares ou pouco polares, mas também melhorar a sensibilidade de medidas espectrofotométricas⁶⁹.

Com base nesta informação, surfactantes tem sido testado incluindo SDS (dodecilsulfato de sódio), SDBS (dodecilbenzenosulfonato de sódio), CTMAB (brometo de cetiltrimetilamônio), CPB (brometo de cetilpiridina), Triton X-100 e Tween – 20. Os resultados indicaram que todos estes surfactantes exceto SDS tem pequeno efeito na medida de sensibilidade próximo a concentração micelar crítica (CMC). A relação positiva do SDS pode ser devido ao seu grupo hidrofílico carregado negativamente. A elevada interação eletrostática entre o grupo hidrofílico carregado

negativamente e a carga positiva protonada do piazoselenol, formado no meio ácido, pode resultar na formação de uma associação íon-complexo, que pode favorecer a melhora de sensibilidade particularmente devido a grande área seccional formada entre eles. Já a incapacidade do SDBS pode ser atribuída ao impedimento estérico do anel benzênico aumentando a distância de interação e conseqüentemente desfavorecendo a interação íon-complexo⁶⁹.

IV.2.5.1 – Efeito da adição de dodecilsulfato de sódio no sistema água-etanol-clorofórmio

A Tabela 12 apresenta os resultados da adição de SDS no sinal analítico (Δ Abs).

Tabela 12 – Massa de SDS adicionada em função da resposta variação de absorvância

Massa de SDS, mg	Δ ABS
0	0,229
15	0,236
30	0,258
45	0,260
60	0,267

Observa-se que a partir de 30 mg de SDS adicionados não se tem variação significativa na resposta. Então adotou-se como condição ótima uma massa adicionada de 40 mg no sistema em estudo. A partir desta informação obteve-se uma nova curva analítica de calibração, com adição de SDS, conforme apresentada na Figura 25.

A curva analítica de calibração com adição de SDS é descrita pela equação Δ Abs = $0,304C_{Se(IV)} - 0,0002$ ($r^2 = 0,9998$) e linear até $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Calculando o limite de detecção e quantificação, em relação ao desvio padrão do branco, encontrou-se respectivamente $0,004 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,082 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo estas concentrações referentes à solução fase única. Convertendo estes valores em relação à fase aquosa o limite de detecção (*l.d*) é igual a $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ e o limite de quantificação (*L.Q*) é igual a $0,23 \text{ mg.L}^{-1}$. Em relação à sensibilidade teve-se um ganho de aproximadamente 10%.

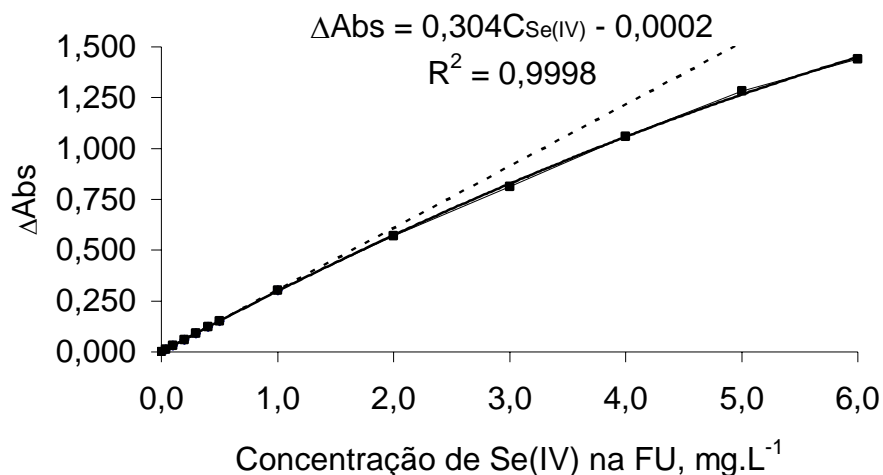


Figura 25 – Curva de calibração com adição de SDS no sistema

água-etanol-clorofórmio

Condições: 1,5 mL de DAN - 0,100% m/v, pH = 1,0,
tempo de 40 minutos e temperatura de 23 °C.

Composição: 2,0:4,0:1,0 mL respectivamente para
água-etanol-clorofórmio

IV.2.5.2 – Efeito da adição de dodecilsulfato de sódio no sistema água-etanol-tolueno

A Tabela 13 apresenta os resultados da adição de SDS no sinal analítico (ΔAbs).

Tabela 13 – Massa de SDS adicionada em função da resposta variação de absorvância

Massa de SDS, mg	ΔABS
0	0,279
30	0,284
60	0,287
90	0,291
100	0,288
200	0,273

Observa-se na tabela que não há ganho significativo na resposta variação de absorvância. Portanto, nestas condições avaliadas a adição de SDS no sistema não melhora a sensibilidade. Este fato pode ser atribuído devido à presença do solvente tolueno que apresenta um anel aromático que pode estar impedindo a formação da interação íon-complexo, ou seja, há um impedimento estérico no efeito de solvatação do complexo, como no caso do surfactante SDBS.

IV.2.6 – Comparação dos resultados

A Tabela 14 mostra um resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 14 – Resumo dos resultados

Sistema	Curva de calibração	Figuras de mérito				Ganho*
		Sensibili- dade	Linearidade	<i>l.d</i>	<i>L.Q</i>	
	Preliminar	0,024	30	0,4	1,8	---
A-E-C	Após otimização de misturas	0,037	30	0,2	1,3	54%
	Após adição de SDS	0,041	7,5	0,07	0,23	70%
	Preliminar	0,024	20	0,2	1,1	---
A-E-T	Após otimização de misturas	0,036	25	0,03	0,63	50%

* Ganho de sensibilidade em relação à curva analítica preliminar

A-E-C sistema água-etanol-clorofórmio

A-E-T sistema água-etanol-tolueno

Analisando a Tabela 14 verifica-se que o ganho de sensibilidade nos sistemas até a otimização de misturas não se tem diferenças significativas entre eles. Mas no sistema contendo tolueno verifica-se melhores *l.d* e *L.Q*, este fato pode ser atribuído devido ao tolueno estabilizar melhor o sinal do branco, provavelmente devido às interações entre o anel aromático do solvente tolueno com o grupo naftil do complexo. Apenas o sistema contendo clorofórmio foi otimizado com adição de SDS. Assim o sistema contendo este solvente apresenta melhor sensibilidade e melhor limite de quantificação. A partir de suas figura de mérito comparou-se este sistema com outros métodos espectrofotométricos de determinação de selênio, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 – Comparação com outros métodos espectrofotométricos⁷⁰

Reagentes	Meio/pH	$\lambda_{\text{máx}}$, nm	Lei de Beer's (mg.L ⁻¹)
3,3'-diaminobenzidina	Aquoso pH 2-3	420	0,1-10
4,5-diamino-6- tiopiridina	Aquoso pH 1,5-2,5	380	0,1-2,5
2,3-diaminonaftaleno	Aquoso pH 1,5-2,5	380	1-12
1-feniltiosemicarbazida	Butanol + CHCl ₃ 0,05-2N HCl	380-400	1-2
1,2-diaminobenzeno	Tolueno 1,5-2,5	335	Até 4
Ditio-oxamida	Aquoso 3-4 M HCl	410-415	0,2-2
4-nitrofenilhidrazina	Aquoso	550	0,28-1,8
8-quinolinol	9-11		
Ácido J	Aquoso 1-2,5	392	0,08-0,8
Ácido J	Butanol 1,5-6,2	520	0,03-0,3
2,3-diaminonaftaleno (método em estudo)	Água-etanol- clorofórmio Água-etanol- tolueno pH 1,0	380	0,07-7,5 0,03-17

Analisando a Tabela 15 verifica-se que o método ora em estudo apresenta uma faixa linear mais ampla que vários métodos espectrofotométricos. Se comparado com o método do 2,3-diaminonaftaleno em meio aquoso houve um ganho na faixa linear de 100 vezes.

Além disso, se comparamos tempo de reação, em relação a 3,3'-diaminobenzidina, o tempo reacional é de 2 horas⁷⁰ enquanto que para o método em estudo um tempo reacional de 30 a 40 minutos é suficiente para a máxima sensibilidade na determinação de selênio. Assim, o emprego da mistura homogênea de solventes (solução fase única), avaliada nesse trabalho, mostra-se adequada para o desenvolvimento de uma metodologia determinativa de selênio.

V – CONCLUSÃO

Conclui-se que a formação do 4,5-benzopiazoselenol nos sistemas estudados permite desenvolver metodologia determinativa de selênio nos dois sistemas avaliados. E que as condições experimentais para a realização da reação são dependentes das variáveis tempo, temperatura, pH e composição da solução fase única.

Assim empregando as técnicas quimiométricas de otimização (planejamento fatorial e estudo de misturas) foi possível obter de forma rápida e eficaz as melhores condições a serem empregadas no estudo das variáveis que afetam a reação entre o Se(IV) e 2,3-diaminonaftaleno na reação de formação do complexo 4,5-benzopiazoselenol.

No sistema água-etanol-clorofórmio as melhores condições experimentais encontradas foram:

- a) composição do sistema: 0,29:0,50:0,21 (fração m/m) ou 2,0:4,0:1,0 v/v
- b) concentração de DAN: 0,017 % m/v na fase única
- c) tempo de reação: 40 minutos
- d) temperatura de reação: 23 °C
- e) pH da porção aquosa: 1,0
- f) adição de 40 mg de SDS

Sob estas condições o sistema é linear até $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e descrito pela equação $\Delta\text{Abs} = 0,041C_{\text{Se(IV)}} + 0,002$ ($R^2 = 0,999$). Apresenta *l.d* e *L.Q* igual a $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,23 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente na fase aquosa.

E no sistema água-etanol-tolueno as melhores condições experimentais foram:

- a) composição do sistema: 0,16:0,77:0,07 (fração m/m) ou 2,0:12,0:1,0 v/v
- b) concentração de DAN: 0,003 % m/v na fase única
- c) tempo de reação: 30 minutos
- d) temperatura de reação: 45 °C
- e) pH da porção aquosa: 1,0

Sob estas condições o sistema é linear até 25 mg.L^{-1} e descrito pela equação $\Delta\text{Abs} = 0,036C_{\text{Se(IV)}} + 0,008$ ($R^2 = 0,999$). Apresenta *l.d* e *L.Q* igual a $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,62 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente na fase aquosa.

VI – PRETENSÕES FUTURAS

Em virtude dos resultados encontrados, podem-se propor como estudos futuros:

- a) Os possíveis interferentes em uma dada matriz, o grau de interferência e propor meios para diminuir ou minimizar seus efeitos;
- b) Possibilidade de uma aplicação em amostras reais;
- c) Viabilidade do processo de extração por fase única no intuito de pré-concentração o que poderia melhorar o limite de detecção e quantificação.

ANEXOS

ANEXO 1: Características dos solventes das soluções fase única

a) Etanol

O etanol é um líquido incolor, de massa molar igual a $46,07 \text{ g.mol}^{-1}$. Possui densidade de $0,7893 \text{ g.cm}^{-3}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição de $78,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ^{71,72}. Apresenta extensa solubilidade em água devido às interações de ligações de hidrogênio efetuadas entre o seu grupo hidroxila e os pólos negativos e positivos da(s) molécula(s) de água. Também apresenta extrema solubilidade em solventes orgânicos devido às interações do tipo dipolo-dipolo induzido que se estabelecem entre a sua parte apolar e a parte apolar do(s) outro(s) solventes(s) orgânicos(s) empregados no sistema.

A toxicidade do etanol é considerada moderada-baixa por vias orais, intravenosas, cutâneas e provavelmente também por inalação⁷³. O etanol oxida-se rapidamente no corpo produzindo dióxido de carbono e água e, nenhum efeito cumulativo ocorre^{73,74}. O Etanol também possui uma grande importância comercial como solvente e intermediário químico. É um solvente industrial e farmacêutico muito importante, sendo ainda utilizado como matéria prima para a obtenção de outros produtos como, por exemplo, (em reações com ácidos carboxílicos) obtenção de ésteres^{73,75,76}.

b) Clorofórmio

O triclorometano também conhecido como clorofórmio é um líquido incolor de sabor adocicado, cuja massa molar é de $119,38 \text{ g.mol}^{-1}$, apresenta densidade igual a $1,483 \text{ g.cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição de $61,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ^{71,72}. Devido à sua alta pressão de vapor (160 mmHg a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), é aconselhável mantê-lo em frascos bem fechado, uma vez que é extremamente tóxico⁷⁷. Por ingestão e/ou inalação, os vapores são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal^{78,79}. Após ingestão pela via oral, é rapidamente e quase que totalmente absorvido tanto pelos animais como pelo homem. As concentrações sanguíneas máximas de clorofórmio são atingidas dentro de 1 a 1,5 horas após a ingestão. A exposição humana por inalação, 60 a 80% de todo o clorofórmio inalado é absorvida⁸⁰. A exposição ao clorofórmio, em um ambiente contendo 13,2 a

31,8 g de CHCl_3 / m^3 de ar, durante 3 a 10 minutos, resulta numa absorção de 73%. O triclorometano também pode ser absorvido pela pele. Em estudo para se verificar a contribuição relativa da absorção dérmica e pulmonar, durante um banho de ducha, foi constatado que ambos os tipos de absorção são equivalentes⁸⁰.

O clorofórmio quando absorvido entra rapidamente na corrente sanguínea e é transportado para os tecidos. Devido a sua predominante lipossolubilidade, acumula-se em tecidos com alto teor lipídico, como o tecido adiposo, fígado e rins⁷⁸. Em estudos de concentrações do clorofórmio (mg/Kg de peso seco), foram encontrados as seguintes distribuições: tecido adiposo: 5 a 68, fígado: 1 a 10, rins: 2 a 5 e cérebro: 2 a 4. Dentre os trihalometanos, o clorofórmio é biotransformado no fígado levando a formação de fosgênio. O fosgênio pode reagir rapidamente com a água levando a formação de dióxido de carbono e cloreto de hidrogênio. Uma outra via de biotransformação é a reação com a cisteína ou glutatona dando produtos secundários ou com macromoléculas intracelulares induzindo danos celulares. Os sintomas de exposição a esta substância incluem náuseas, vômitos, irritação dos olhos e pele, inconsciência e morte. Os efeitos crônicos observados são caracteristicamente retardados quando a exposição ocorre em concentrações baixas, admitindo-se período de latência para a carcinogenicidade. Existem evidências que o clorofórmio é carcinogênico para ratos e camundongos^{81,82}, sem contudo haver qualquer indicação para o homem. Todavia, pode-se considerar que apresenta risco para exposições humanas⁸¹. Um outro fator a considerar, é que pessoas consideradas alcoólatras sofrem os efeitos dessa substância prematuramente e com mais intensidade⁷⁴.

c) Tolueno⁸³

O tolueno ou metilbenzeno é um hidrocarboneto aromático, incolor e de odor característico. Sua fórmula é $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ e possui peso molecular de 92,15. Esta substância sofre ebulição a 110,6 °C; sua pressão de vapor é de 22mmHg a 20 °C; se autoinflama a 480 °C; e o limiar de odor dos vapores de tolueno ocorre entre 0,04 e 1 mg/L na água e 8 mg/ m^3 no ar.

Os produtos metabólicos do tolueno são o cresol (menos de 1%) e o metabólito intermediário benzaldeído. O benzaldeído é metabolizado a ácido benzóico o qual se conjuga com a glicina e forma o ácido hipúrico. Em humanos, mais de 75% do tolueno inalado é metabolizado a ácido hipúrico e é excretado na urina 12 horas após a

exposição. Alguns trabalhos incluem dosagens desse metabólito para confirmação da efetividade da exposição ao tolueno. Porém outros autores afirmam que não há valor diagnóstico nas dosagens de ácido hipúrico pois este é um constituinte normal da urina e pode ser influenciado pela dieta, sugerindo então dosagens diretas de tolueno no sangue. No entanto, é importante que se observe o intervalo entre a exposição ao tolueno e a coleta da amostra. Concentrações de tolueno podem ser bifásicas; um pico inicial é seguido por uma baixa refletindo ligação aos lipídios no sistema nervoso central e um pico subsequente pode ocorrer em decorrência da liberação lenta do tolueno na corrente sanguínea. O exame pode ser positivo mesmo muitos dias após a retirada do tolueno. Níveis plasmáticos de tolueno têm sido obtidos em autópsias após morte decorrente do abuso de tolueno por via inalatória.

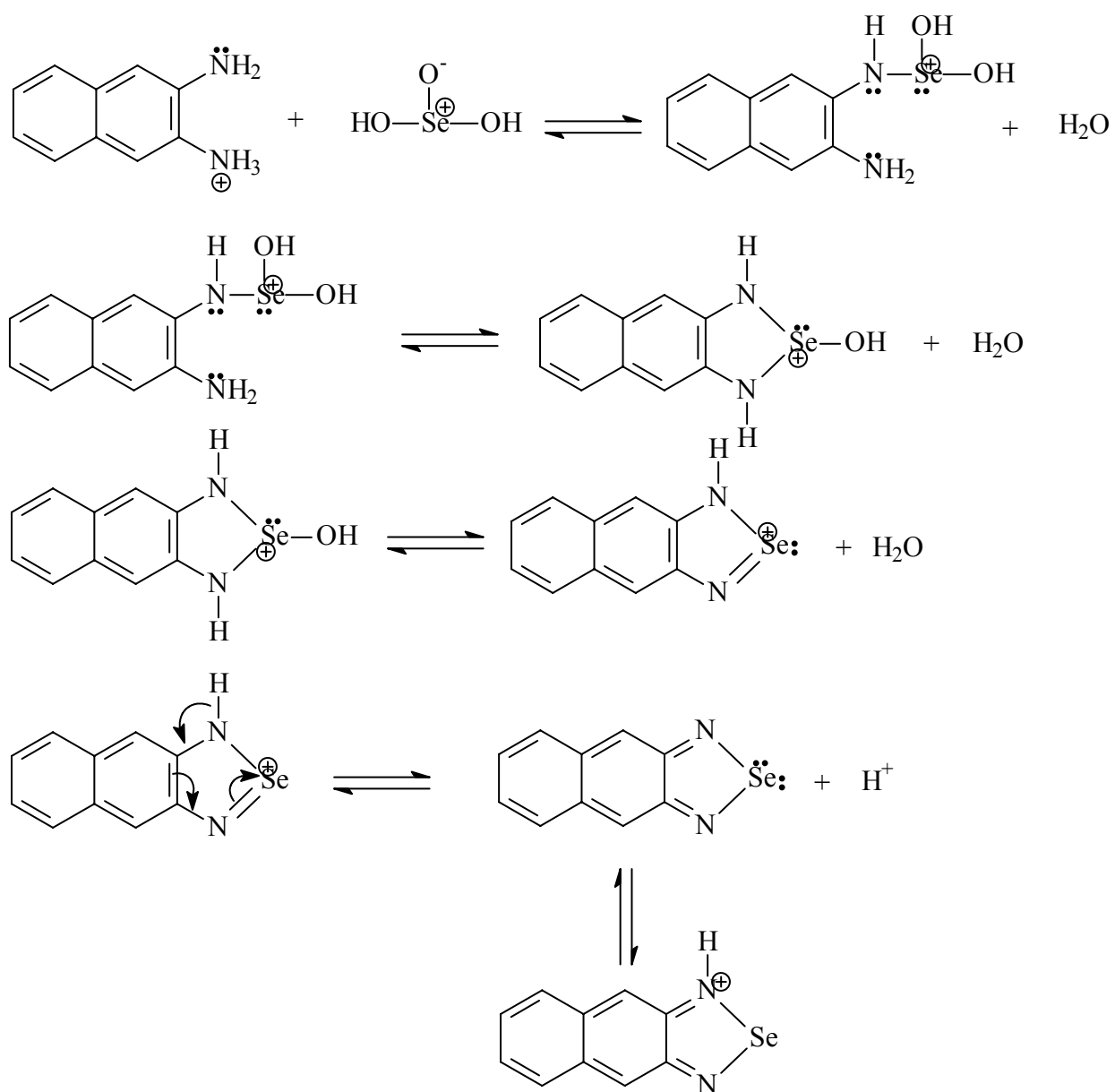
O tolueno é distribuído nos tecidos ricos em gordura e tecidos altamente vascularizados após a absorção, e é encontrado em concentrações 80 vezes maiores nos tecidos gordurosos do que no sangue. Esses tecidos incluem o cérebro, particularmente a substância branca, a medula óssea, fígado, rins e tecidos nervosos.

As concentrações de gases no ar são expressas em volume/volume, como por exemplo vol%, partes por milhão (ppm) e outros. Um princípio fundamental em toxicologia é de que a relação dose-resposta requer que haja exposição e efeito tóxico. O potencial para intoxicação aumenta à medida que a exposição aumenta, e a exposição a misturas de solventes leva à possibilidade de efeito aditivo, sinérgico ou potenciador imprevisíveis. Sabe-se que o tolueno é um depressor do sistema nervoso central (SNC), mas seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. Foi observado que ele provoca uma fase inicial de excitação seguida de depressão leve à intensa. Quanto aos efeitos de exposição aguda ao tolueno podemos fazer uma correlação entre os níveis de exposição e efeitos decorrentes da mesma. Os efeitos da inalação voluntária variam muito em severidade e duração dependendo da intensidade da exposição; a duração pode variar de 15 min a algumas horas. Com doses relativamente baixas (200 ppm) é descrita irritação dos olhos e garganta, podendo ocorrer lacrimejamento com doses maiores (400 ppm). Nessas mesmas doses, pode-se observar aumento do tempo de reação (visuomanual), sinais de incoordenação, cefaléia, confusão, tonturas e sensação de intoxicação, quando a exposição se prolonga por mais de oito horas.

Com doses crescentes (500-800 ppm), observa-se náusea, anorexia, confusão, hilaridade, perda do autocontrole, perdas momentâneas de memória, nervosismo, fadiga muscular, parestesia e insônia.

Doses de 1.500 ppm ou mais causam efeitos agudos com exposições relativamente curtas (poucas horas ou minutos nas doses de 10.000-30.000 ppm), como fraqueza acentuada, incoordenação e ataxia, euforia, às vezes alucinações, desorientação, até a narcose e morte com altas concentrações.

Os efeitos agudos são reversíveis, mas tornam-se mais severos e persistentes com o aumento da concentração e/ou duração da exposição. Não se tem relatado efeito tóxico em humanos expostos a níveis menores que 50 ppm por curtos períodos de tempo ou expostos uma única vez a 100 ppm por poucas horas. No entanto, há relatos de convulsões até mesmo chegando ao status epilépticos, como primeira manifestação de intoxicação aguda por tolueno.

ANEXO 2: Mecanismo da reação de formação do 4,5-benzopiazoselenol⁶⁴


ANEXO 3: Análise dos efeitos pelo método das normais⁶⁵

A análise por meio de gráficos normais é uma técnica alternativa para distinguir nos resultados de um planejamento, os valores que correspondem realmente aos efeitos daqueles outros valores que são devidos apenas ao ruído. Seu funcionamento se baseia na noção de probabilidade cumulativa.

Uma variável aleatória x distribuída normalmente obedece à equação:

$$f(x)dx = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-u)^2}{2\sigma^2}} dx$$

A representação gráfica desta equação é uma curva em forma de sino, semelhante a que aparece na figura 26a.

Consideremos um valor numérico específico para a variável x e chamemos esse valor de x_1 . A área da cauda a esquerda de x_1 , é o que chamamos de probabilidade cumulativa (ou probabilidade acumulada) do valor x_1 . Essa área, que corresponde a probabilidade de se observar um valor de x menor ou igual a x_1 , aumenta continuamente à medida que x se desloca para a direita, tendendo para 1, que é o valor da área total sob a curva da figura 26a, quando x tende para $+\infty$. Um gráfico da probabilidade cumulativa numa distribuição normal é uma curva monotonicamente crescente, em forma de S^3 que vai (de forma assintótica) de zero à esquerda para 1 à direita, como mostra a figura 26b.

A curva da figura 26b pode ser transformada numa reta, por meio de uma modificação na escala simetricamente em torno do ponto representando 0,5 (isto é, 50% de probabilidade acumulada), de modo a “esticar” as duas pontas do S (figura 26c). O procedimento é semelhante ao que se usa para fabricar o papel logarítmico. A função $y = \log x$, que num papel milimetrado comum é representado por uma curva, num papel logarítmico passa a ser representado por uma reta. Da mesma forma, se x se distribuir normalmente, o gráfico de suas probabilidades acumuladas será uma sigmóide numa escala cartesiana comum, mas passará a ser uma reta se fizermos a escala vertical correspondente à da figura 26c. Observe que as probabilidades acumuladas 0 e 1, que correspondem respectivamente a $-\infty$ e $+\infty$ sobre o eixo das abscissas, a rigor não podem ser representadas nesse gráfico, porque a escala é finita.

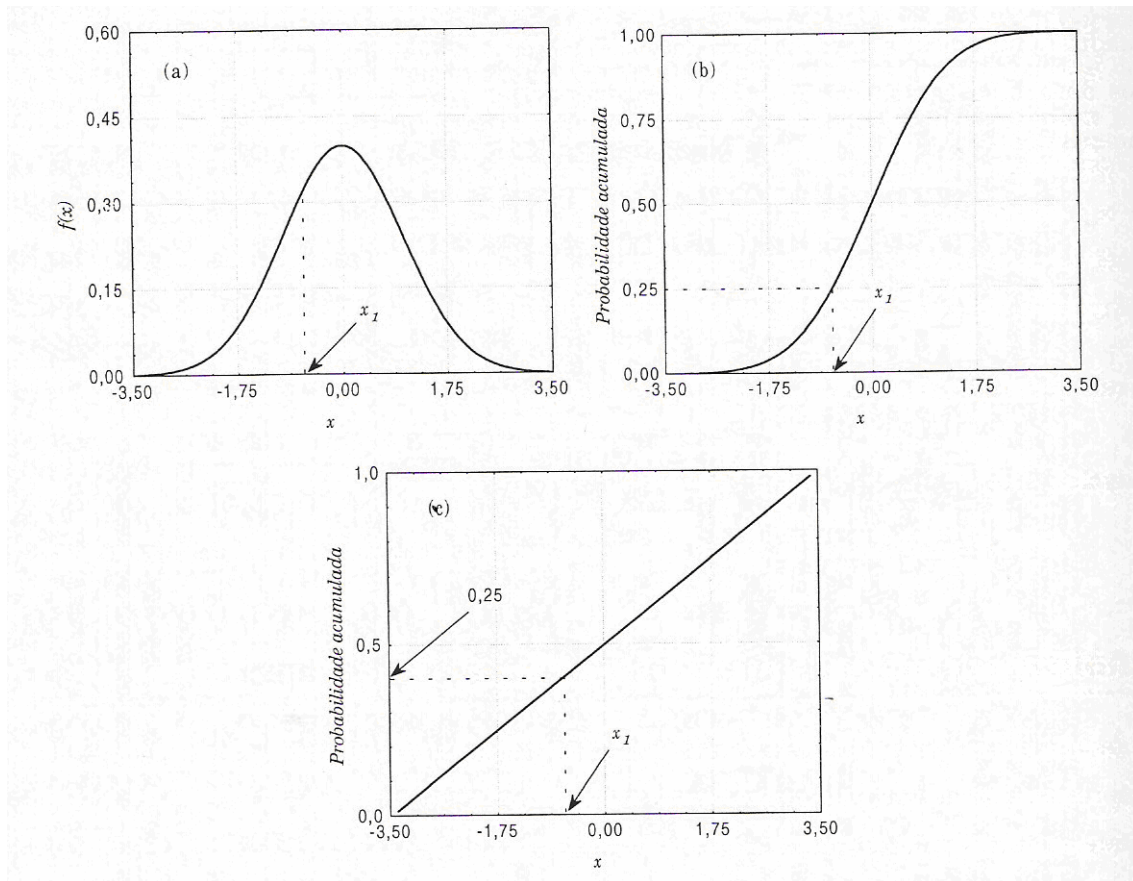


Figura 26 – (a) Gráfico de densidade de probabilidade numa distribuição normal padronizada. A probabilidade acumulada correspondente a um valor x_1 é a área sob a curva à esquerda de x_1 . (b) Probabilidade acumulada na escala cartesiana usual. (c) O gráfico da figura (b), num eixo de probabilidade normal.

Consideremos uma amostra aleatória de dez elementos, extraída de uma população normal. Para representar essa amostra num gráfico normal, a primeira coisa que devemos fazer é colocar seus elementos em ordem crescente. Assim, o primeiro elemento será o menor de todos, e o décimo será o maior. Usando um índice para indicar a ordem de cada elemento, chamaremos o menor deles de x_1 e o maior de x_{10} . Como a amostragem foi aleatória, podemos imaginar que cada um desses dez elementos seja o representante de uma fatia equivalente a 10% da área total da distribuição. O primeiro elemento, que é o menor, representaria os primeiros 10% de cauda à esquerda, o segundo a região entre 10% e 20%, e assim por diante. Ao décimo elemento, o maior de todos, caberia a cauda de 10% a direita, isto é, a região indo de 90% a 100% de

probabilidade acumulada. Essa concepção está ilustrada graficamente na figura 26, com a curva de densidade de probabilidade.

O próximo passo é associar, a cada ponto, a probabilidade acumulada do centro o intervalo que ele representa. Assim, x_1 , que está no intervalo que vai de 0 a 10%, corresponderia à probabilidade acumulada de 5%, x_2 corresponderia a 15%, e assim por diante. Num gráfico destas probabilidades contra os valores x_1, \dots, x_{10} numa escala linear, os pontos devem cair aproximadamente sobre uma curva sigmóide, como na figura 25b. Mudando o eixo para uma escala de probabilidade normal, esperamos que os pontos se ajustem razoavelmente a uma reta, figura 26c. Se essas expectativas não forem confirmadas, desconfiaremos que algo está errado com as nossas suposições. Isso nos permitirá chegar a conclusões de grande importância prática, conforme discutido na análise do gráfico das normais de cada sistema estudado.

Para a análise do gráfico das normais é testada uma hipótese nula que admite que nenhum dos efeitos calculados exista de fato, isto é, que o verdadeiro valor de cada um deles seja zero. Dentro destas suposições, os valores numéricos que se obtém devem refletir apenas a erros aleatórios do processo. Se no gráfico das normais os pontos se ajustarem em uma reta sobre o ponto zero do eixo das abscissas faz sentido, portanto, considerar esses pontos como vindos de uma população normal de média zero. Ou seja, eles representam efeitos sem nenhum significado físico. O mesmo já não pode ser dito para valores que se afastam ou que não se ajustam a esta reta.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Semenova, N. V.; Leal, L. O.; Forteza, R.; Cerda, V.. Multisyringe flow injection system for total inorganic selenium determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 486(2), p. 217 – 225.
2. Ullrey, D. et al. *Selenium in Nutrition*, National Academy Press: Washington, **1983**.
3. Nelson, D. L.; Cox, M. M.. *Lehninger : Principles of Biochemistry*, 3rd edition, Worth Publishers: New York, **2000**.
4. Carroll, B.. Microbial and geochemical aspects of selenium cycling in an estuarine system – Lake Macquarie, NSW; *Tese de Doutorado*. University of Sydney, United States, **1999**.
5. Geenwood, N. N.; Earnshaw, A.. *Chemistry of the Elements – Department of Inorganic and Structural Chemistry*, University of Leeds, U. K, **1984**.
6. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edition, Wiley-VCH – John Wiley: New York, **2003**. CD-Version.
7. Nogueira, J. M.. Emprego do selênio e do dióxido de selênio em química orgânica; *Tese de concurso à Cadeira n° 26, "Química Orgânica, 1ª e 2ª partes"*, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Brasil, **1957**.
8. Kudryavtsev, A. A.. *The Chemistry & Technology of Selenium and Tellurium*, translated and revised by E. M. Elkin, Collet's (Publishers), London, 1974. IN: Carroll, B.. Microbial and geochemical aspects of selenium cycling in an estuarine system – Lake Macquarie, NSW; *Tese de Doutorado*. University of Sydney, United States, **1999**.

9. Elkin, E. M., “Kirk-Opther Encyclopedia of Chemical Technology”, Vol. 20, in Kroschwitz, J. I. and Howe-Grant, M. (Eds.), 3rd Ed, Wiley-Interscience, New York, 1982. IN: Carroll, B.. Microbial and geochemical aspects of selenium cycling in an estuarine system – Lake Macquarie, NSW; *Tese de Doutorado*. University of Sydney, United States, **1999**.
10. Combs Jr, G. F. and Combs, S. B.. *The Role of Selenium in Nutrition*, Academic Press, Inc., Orlando, 1986. IN: Carroll, B.. Microbial and geochemical aspects of selenium cycling in an estuarine system – Lake Macquarie, NSW; *Tese de Doutorado*. University of Sydney, United States, **1999**.
11. Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G. and Hoekstra, W. G.. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, **1973**, 179, p. 558.
12. van Vleet, J. F. and Ferrans, V. J.. Etiologic factors and pathologic alterations in selenium-vitamin E deficiency in animals and humans, *Biol. Trace Elem., Res.*, **1992**, 33, 1.
13. Morais, S. S.. Embrapa Gado de Corte – Disponível em: www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc112/034icose.html. Acesso em junho-julho de **2006**
14. Diaz, D. E.; Casagrandi, M.; Tampieri, A.; Piccinni, L.; Géliot, P.. Aumento da concentração de selênio no leite e redução da contagem de células somáticas em bovinos de leite suplementados com Sel-Plex®. Disponível em: http://12.44.217.241/Brasil/artigos/Pics/Diaz-Dairy_port.pdf. Acesso em: julho de **2006**
15. Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D.. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2003**, 57, p. 134 – 144.

16. Cheng, Y. Y.; Qian, P. C.. The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million, *Biomed. Environ. Sci.*, **1990**, p. 422 – 428.
17. Shamberger, R. J.. *Biochemistry of Selenium*, Plenum Press, New York, 1983.
IN: Carroll, B.. Microbial and geochemical aspects of selenium cycling in an estuarine system – Lake Macquarie, NSW; *Tese de Doutorado*. University of Sydney, United States, **1999**.
18. Reid, M. E.; Stratton, M. S.; Lillico, A. J.; Fakin, M.; Natarajan, R.; Clark, L. C.; Marshall, J. R.. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **2004**, 18, p. 69 – 74.
19. Goldhaber, S.. Trace element risk assessment: essentiality vs toxicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2003**, 38, p. 232 – 242.
20. Jaffe, W. G.. Selenium in plants and feeds. Toxicology and nutrition. *Qual. Plant. Foods. Hum. Nutri.***1973**, 23, p. 191 – 204.
21. Correia, P. R. M.. Determinação simultânea de manganês/selênio e cobre/zinco em soro sanguíneo por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; *Dissertação de mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2001**.
22. Patriarca, M.; Mendito, A.; Di Felice, G.; Petrucci, F.; Caroli, S.; Merli, M.; Valente, C.. Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis and treatment of diseases, *Microchem. J.*, **1998**, 59, p. 194 – 202.
23. Taylor, E. W.; Ramanathan, C. S.; Jalluri, R. K.; Nadimpalli, R. G.. A basis for new approaches to the chemotherapy of AIDS: Novel genes in HIV-1 potentially encode selenoproteins expressed by ribosomal frameshifting and termination suppression, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37(17), p. 2637 – 2654.

24. Ramachandran, K. N.; Kumar, G. S.. Modified spectrophotometric method for the determination of selenium in environmental and mineral mixtures using 2,3-diaminonaphthalene, *Talanta*, **1996**, 43, p. 1711 – 1714.
25. Watkinson, J. H.. Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene, *Analytical Chemistry*, **1966**, 38, p. 92 – 97.
26. Machado, L. F. R.; Jacintho, A. O.; Giné, M. F.. Geração eletroquímica do hidreto de selênio em sistema de injeção em fluxo com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama AR-GLP, *Química Nova*, **2000**, 23(1), p. 30 – 33.
27. Cava-Montesinos, P.; Cervera, M. L.; Pastor, A.; De la Guardia, M.. Hydride generation atomic fluorescence spectrometric determination of ultratraces of selenium and tellurium in cow milk, *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 481, p. 291 – 300.
28. Gil, S.; Hevia, S.; Dallorso, M.; Resnizky, S.. Selenium in bovine plasma, soil and forage measured by neutron activation analysis, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, **2004**, 56(2), p. 264 – 266.
29. Tôei, K.; Shimoishi, Y.. Determination of ultramicro amounts of selenium by gas chromatography with electron-capture detection, *Talanta*, **1981**, 28, p. 967 – 972.
30. Zheng, O.; Pei-Yi, X.; Guan-Lan, X.; Yue, L.. A new reagent for determining trace selenium by gas chromatography: 1,4-dibromo-2,3-diaminonaphthalene, *Talanta*, **1986**, 33(5), p. 443 – 444.
31. Elaseer, A.; Nickless, G.. Determination of selenium by chromatography-electron-capture detection using a rapid derivatization procedure, *Journal of Chromatography A*, **1994**, 664, p. 77 – 87.

32. Hawkes, W. C.; Hutnink, M. A.. High-performance liquid chromatography-fluorescence determination of traces of selenium in biological materials, *Analytical Biochemistry*, **1996**, 241, p. 206 – 211.
33. Breyer, P. H.; Gilbert, B. P.. Determination of selenium(IV) by differential pulse voltammetry of the 3,3'-diaminobenzidine piarselenol, *Analytical Chimica Acta*, **1987**, 201, p. 23 – 32.
34. Inam, R.; Somer, Güler.. A direct method for the determination of selenium and lead in cow's milk differential pulse stripping voltammetry, *Food Chemistry*, **2000**, 69, p. 345 – 350.
35. Dugo, G.; La Pera, L.; Lo Turco, V.; Mavrogeni, E.; Alfa, M.. Determination of selenium in nuts by cathodic stripping potentiometry (CSP), *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, p. 3722 – 3725.
36. Arikan, B.; Tunçay, M.; Apak, R.. Sensitivity enhancement of the methylene blue catalytic-spectrophotometric method of selenium(IV) determination by CTAB, *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 335, p. 155 – 167.
37. Ariyoshi, H.; Kiniwa, M.; Tōei, K.. UV spectrophotometric determination of trace amounts of selenium with *o*-phenylenediamine, *Talanta*, **1960**, 5, p. 112 – 118.
38. Throop, L. J.. Spectrophotometric determination of selenium in steroids, *Analytical Chemistry*, **1960**, 32(13), p. 1807 – 1809.
39. Tanaka, M.; Kawashima, T.. Some 4-substituted *o*-phenylenediamines as reagents for selenium, *Talanta*, **1965**, 12, p. 211 – 219.
40. Tōei, K.; Itō, K.. Spectrophotometric determination of selenium in technical sulphuric acid by *o*-phenylenediamine, *Talanta*, **1965**, 12, p. 773 – 780.

41. Cheng, K. L.; Determination of traces of selenium 3,3'-diaminobenzidine as selenium(IV) organic reagent, *Analytical Chemistry*, **1956**, 28(11), p. 1738 – 1742.
42. Lott, P. F.; Cukor, P.; Moriber, G.; Solga, J.. 2,3-diaminonaphthalene as a reagent for the determination of milligram to submicrogram amounts of selenium, *Analytical Chemistry*, **1963**, 35, p. 1159 – 1163.
43. Bodini, M. E.; Alzamora, O. E.. Spectrophotometric determination of trace amounts of selenium with 4,5,6-triaminopyrimidine, *Talanta*, **1983**, 30(6), p. 409 – 412.
44. Al-Attar, A.; Nickless, G.. 1,2-diaminobenzene derivatives for the determination of selenium by chromatography, *Journal of Chromatography*, **1988**, 440, p. 333 – 352.
45. Ramachandran, K. N.; Kaveeshwar, R.; Gupta, V. K.. Spectrophotometric determination of selenium with 6-amino-1-naphthol-3-sulphonic acid (J-acid) and its application in trace analysis, *Talanta*, **1993**, 40(6), p. 781 – 784.
46. Pires, N. J.. Determinação catalítica de selênio em cabelo humano empregando a redução de TAN a DHTAN com íon brometo como ativador em sistema de AFCM com detecção espectrofotométrica; *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, **2005**.
47. Nieniewska, J.; Curtius, A. J.. Determinação de arsênio em plantas por geração de hidreto e absorção atômica, *Química Nova*, **1986**, 9, p. 194 – 197.
48. Coelho, N. M. M.. Pré-concentração e determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto em um sistema de análise por injeção em fluxo; *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **1995**.

49. Babko, A. K.; Pilipenko, A. T.. Photometric analysis – methods of determining non-metals. Translated from the Russian by A. Rosinkin. Mir Publishers, Moscow, **1976**.
50. Martins J. C.. Extração líquido-líquido por fase única. Estudo de separação no sistema Fe-Cu-Co com tenoiltrifluoroacetona e água-acetona-ciclohexano (ou benzeno); *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **1974**.
51. Silva, J. F.. Extração líquido-líquido por fase única. Sistema água-etanol-metilisobutilcetona no estudo da separação d Fe, Co, Ni, Cu e Pb com tenoiltrifluoroacetona; *Tese de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **1978**.
52. Da Silva, J.. Extração líquido-líquido por fase única de Fe, Cu e estudo de sinergismo para Co, Ni, Zn e U; sistema água-acetona-benzeno com tenoiltrifluoroacetona e fosfato de tri-n-butila; *Tese de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **1978**.
53. Manzano, M. F. F. L.. Extração líquido-líquido por fase única. Estudo do comportamento de Cr, Mn, Fe, Co, Ni e Cu no sistema água-acetona-benzeno com acetilacetona; *Tese de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **1978**.
54. Barbosa, A. B.. Pré-concentração e determinação de Hg(II) com ditizona empregando sistema ternário homogêneo de solventes; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, **2001**.
55. Gonçalves, F. F.. Extração por fase única: estudo da influência da composição da mistura água-etanol-clorofórmio na extração de chumbo com ditizona; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, **2002**.

56. Freitas, H. C.. Estudo da determinação e extração de cádmio(II) empregando o 1-(2-piradilazo)-2-naftol e a mistura homogênea dos solventes água-etanol-clorofórmio; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, **2005**.
57. Andrade, J. C.; Cuelbas, C. J.; Eiras, S. P.. Spectrophotometric determination of Mo(VI) in steel using a homogeneous ternary solvent system after single-phase extraction, *Talanta*, **1998**, 47, p. 719 – 727.
58. Eiras, S. P.; Custódio, U. M.; Pavanin, L. A.. Determination of chromium (III) using homogeneous mixture of water-ethanol-methylisobutylketone solvents, *Talanta*, **2003**, 59, p. 621 – 625.
59. Ozcan, M.; Akman, S.. Determination of Cu, Co and Pb in gasoline by electrothermal atomic absorption spectrometry using aqueous standard addition in gasoline-ethanol-water three-component system, *Spectrochimica Acta Part B*, **2005**, 60, p. 399 – 402.
60. Eiras, S. P.; Cruz, W. O.; Pires, N. J.. Avaliação da clivagem oxidativa do cicloexeno em solução fase única com KMnO_4 para obtenção de ácido adípico, *Ciência & Engenharia (Science & Engineering Journal)*, **2004**, 13(1), p. 07 – 11.
61. Borges, M. S; Gontijo, L. C.; Almeida, A. M; Eiras, S. P.. Determinação do teor alcoólico de cachaça empregando titulação de fases. In: XIX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Ouro Preto-MG, Resumo em CD, **2005**.
62. Atkins, P. W.. Physical Chemistry, Oxford: University Oxford Press, **1994**.
63. Morita, T.; Assumpção, R. M. V.. Manual de Soluções, Reagentes & Solventes, São Paulo: Edgard Blücher, **1972**.

64. Cukor, P.; Lott, P. F.. The kinetics of the reaction of selenium(IV) with 2,3-diaminonaphthalene, *The Journal of Physical Chemistry*, **1965**, 69 (10), p. 3232 – 3239.
65. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.. Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª edição – Campinas, SP: Editora da UNICAMP, **2003**.
66. Eiras, S. P.. Determinação catalítica de molibdênio em plantas, usando análise em fluxo contínuo monossegmentado com detecção espectrofotométrica. *Tese de Doutorado*, Universidade de Campinas, **1991**.
67. Eiras, S. P.; Coscione, A. R.; Andrade, J. C.; Custódio, R.. Métodos de otimização em química. Net, Campinas. Abr. 1999. Disponível: http://www.chemkeys.com/bra/md/peeo_6/mdoeq_1/mdpf_3/mdpf_3.htm. Acesso em Junho-Julho de **2006**.
68. Programas de domínio público para microcomputadores. In: Barros Neto, B. et al.; Planejamento e otimização de experimentos. Editora da Unicamp, Campinas, **1995**.
69. Huang, X.; Jie, N.; Zhang, W.; Yin, Y.; Shao, H.. Study on the spectrophotometric determination of micro amounts of selenium(IV) with 2,3-diaminonaphthalene in the presence of sodium dodecylsulphate, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 354, p. 195 – 199.
70. Manish, R.; Ramachandran, K. N.; Gupta, V. K.. Extraction spectrophotometric determination of selenium(IV) with J acid in environmental samples, *Talanta*, 41(10), p. 1623 – 1626.
71. Weast, C. R.. Handbook of chemistry and physical: 57ª edição, CRC Press, EUA, **1976**.

72. McMurry, J.. Química Orgânica, Tradução: Ana Flávia Nogueira et al: 6ª edição, Norte-Americana, edição Combo, Editora: Thomson, São Paulo, **2005**.
73. Gana Soto, J. M. O.. Riscos Químicos: Fundacentro, São Paulo, **1982**.
74. Solomons, T. W.; et. al; Química Orgânica: 6ª edição, Editora Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, **1996**.
75. Allinger, N. L. et al; Química Orgânica : 2ª edição, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, **1985**.
76. Tominaga, M. Y.; Mídio, A. F.. Exposição humana a trihalometanos presentes em água tratada, *Revista de saúde pública (Journal of Public Health)*, **1999**, 33, p. 413 – 421.
77. Tomnaga, M. Y.; Trihalometanos em água de abastecimento-validação e correlação de dois métodos de análises por cromatografia em fase gasosa, *Dissertação de mestrado*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, **1998**.
78. Wang, R. G. M.; Water contamination and health: Marcel Dekker, New York, **1994**.
79. Jo et all apud WHO; World Health organization, Chloroform: [Environmental Health Criteria, 163], Geneva, **1994**.
80. Bull, R. J.; Health effects of drinking water disinfectants and disinfectant by products, *Environ. Sci. Technol*, **1982**, 16, p. 554 – 559.
81. Dunnick; J. K., Melnic, R. L.; Assesment of the Carcinogenic potential of Chlorinated water: Experimental studies of Chlorine, Chloroamine and trihalomethanes, *J. Natl. Cancer Inst*, **1993**, 85, p. 817 – 822.

82. Shibata, S.. Solvente extraction and spectrophotometric determination of metals with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol, *Analytica Chimica Acta*, **1961**, 25, p. 348 – 359.

83. Forster, L. M. K.; Tannhauser, M.; Tannhauser, S. L.. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso, *Revista Saúde Pública*, **1994**, 28(2), p. 167 – 172.