



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Desenvolvimento de métodos não cromatográficos para
especiação de selênio empregando ionização por dessorção e
extração em fase sólida**

Doutoranda: Dayene do Carmo Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Nivia Maria Melo Coelho

Uberlândia

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Desenvolvimento de métodos não cromatográficos para
especificação de selênio empregando ionização por dessorção e
extração em fase sólida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção de título de Doutor em Química.

Doutoranda: Dayene do Carmo Carvalho

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nivia Maria Melo Coelho

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C331d Carvalho, Dayene do Carmo, 1988-
2015 Desenvolvimento de métodos não cromatográficos para especiação
de selênio empregando ionização por desorção e extração em fase sólida
/ Dayene do Carmo Carvalho. - 2015.
94 f. : il.

Orientadora: Nivia Maria Melo Coelho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Selênio - Especiação química - Teses. 3.
Moringa oleifera - Teses. I. Coelho, Nivia Maria Melo. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 35/PPQUI.**

DATA: 27/02/2015

DISCENTE: Dayene do Carmo Carvalho

MATRÍCULA: 11113QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de métodos não cromatográficos para especiação de selênio empregando ionização por dessorção e extração em fase sólida.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

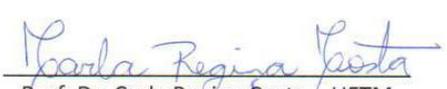
LINHA DE PESQUISA: Espectroanalítica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estratégias não cromatográficas para especiação de selênio.

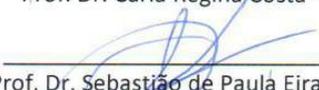
Às treze horas do dia vinte e sete de fevereiro do ano dois mil e quinze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Frederico Garcia Pinto, da Universidade Federal de Viçosa e Carla Regina Costa, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro; Sebastião de Paula Eiras e Waldomiro Borges Neto, do Instituto de Química da UFU e Nívia Maria Melo Coelho, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

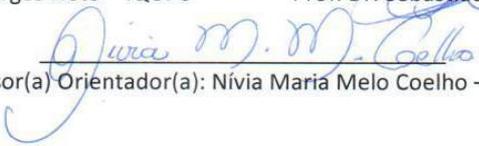
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 20 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Frederico Garcia Pinto – UFV


Prof. Dr. Carla Regina Costa – UFTM


Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto – IQUFU


Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras – IQUFU


Professor(a) Orientador(a): Nívia Maria Melo Coelho – IQUFU

Dedico este trabalho aos responsáveis por me dar apoio, coragem, amor e transmitir os ensinamentos mais valiosos. Aos meus pais, Adimar e Everalda.

AGRADECIMENTOS

Por mais esta etapa de minha vida concluída, agradeço, primeiramente a Deus, por me manter firme apesar das dificuldades, e por ter me dado à graça de mais uma conquista.

Aos meus pais, Adimar e Everalda, mais uma vez obrigada por acreditarem no meu sonho e sonharem comigo. Vocês me ensinaram a ser forte e a correr atrás dos meus sonhos com determinação e humildade. Obrigada pela presença, amor e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

Ao meu namorado, Geraldo José, pelo amor, companheirismo, incentivo e apoio; e a sua família pela atenção e cuidados.

A minha irmã, Luciene, ao meu sobrinho, Gustavo, e a meus familiares pelo carinho, amizade, companheirismo e pelos deliciosos momentos de felicidade.

Agradeço a Elza e a sua família, por me darem um lar e carinho na minha passagem a Belo Horizonte.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, por permitir o desenvolvimento deste trabalho. A CAPES e a FAPEMIG, pela concessão da bolsa e dos demais auxílios utilizados ao longo deste doutorado.

A minha orientadora, professora Dr^a. Nivia Maria Melo Coelho, meu agradecimento mais que especial, pelo apoio e compreensão. Sua confiança e orientação foram fonte de meu bem estar na Universidade Federal de Uberlândia e de êxito neste trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, por todo o ensino e troca de experiências.

Aos parceiros deste projeto, em especial à Prof^a Dr^a. Clésia Cristina Nascentes, por me receber e colaborar com a parte da pesquisa desenvolvida na Universidade Federal de Minas Gerais, e ao Prof. Dr. Rodinei Augusti, que abriu as portas do seu laboratório com muita gentileza.

Às alunas do Laboratório de Espectrometria Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia: Helen, Ione e Simone; com um carinho especial à Vanessa, Thais e ao aluno de Iniciação Científica, Murilo, pela colaboração e parceria.

Aos alunos da Universidade Federal de Minas Gerais, que me receberam com muito carinho e me auxiliaram em todo processo, em especial Leonel, Silveria, Frank, Aline, Deyse e Patrícia.

Agradeço também a todos os funcionários e técnicos da Universidade Federal de Uberlândia, em especial a Mayta, que sempre se esforça para nos ajudar.

Ao Prof. Dr. Valdir Peres e ao Prof. Dr. Antônio Taranto Goulart, que me ensinaram a dar os primeiros passos para explorar, respeitar e valorizar a Química em seu todo.

A todos os amigos e amigas, em especial à Thais, que foi uma grande amiga, parceira e companheira em todos os momentos desta minha trajetória e à Isabel por me receber de coração em sua vida.

Aos meus colegas de trabalho da UFU, *campus* Patos de Minas, que me deram alegrias e foram bons companheiros em diversos momentos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.”

Dalai Lama

RESUMO

O trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos não cromatográficos para especiação de selênio, orgânico e inorgânico, utilizando metodologia de dessorção e ionização por electrospray (DESI) e extração em fase sólida (SPE), com *Moringa oleifera* impregnada com tiosemicarbazida. Para os estudos de análise com DESI, foi utilizada uma fonte acoplada a um Espectrômetro de Massas, sendo avaliada a temperatura do capilar, voltagem do spray, fluxo do solvente, e testes com padrões das espécies em estudo: selenometilonina, selenometilcistina, selenocisteína, selenito e selenato. O método foi aplicado em amostras de castanha-do-pará, couve, alho e espinafre. Para especiação de selênio com SPE, utilizaram-se sementes de *Moringa oleifera* impregnadas com tiosemicarbazida e foram estudados pH, concentração dos reagentes envolvidos, isoterma de adsorção, massa de adsorvente, tempo de contato e otimizações com padrões de selenito e selenato. Além disso, a caracterização físico-química do material e a otimização dos parâmetros da técnica de detecção foram realizados. Os resultados obtidos por DESI apresentaram quantidade mínima detectável na ordem de picograma; todas as espécies foram detectadas nas amostras, exceto na amostra de espinafre, onde não foi encontrado selenometilcisteína. Todas as espécies orgânicas foram confirmadas pela fragmentação do íon, quando comparadas aos padrões. Nos estudos com *Moringa oleifera*, houve remoção seletiva de Se^{+4} com massa do adsorvente de 0,25g, tempo de contato do adsorvente com a solução de 60 min, concentração do NaBH_4 0,5% (m/v), HCl 1,0%(v/v), e o melhor pré-redutor foi L-cisteína. Observou-se que, em pH=3,5, a espécie Se^{+4} é retida pelas sementes, enquanto a adsorção de Se^{+6} ocorre em menor porcentagem. O processo de adsorção da espécie Se^{+4} pelas sementes impregnadas com tiosemicarbazida foi estudado a partir da construção de isotermas de adsorção, sendo ajustável aos modelos de Langmuir e Freundlich. Os resultados obtidos dos parâmetros avaliados estão de acordo com a legislação, e as duas metodologias podem ser empregadas na especiação de selênio. Melhorias são necessárias para a quantificação no caso do uso da fonte DESI, e para a especiação de espécies orgânicas no caso dos estudos de SPE.

Palavras-chave: *Especiação, Selênio, DESI, SPE, Moringa oleifera.*

ABSTRACT

The study aimed to develop non-chromatographic methods for selenium speciation, organic and inorganic, using desorption methodology and ionization electrospray (DESI) and solid phase extraction (SPE), *Moringa oleifera* impregnated with thiosemicarbazide. For the studies of analysis with DESI source was used coupled to Mass Spectrometer, and evaluated the temperature of the capillary, the spray voltage, the solvent flow, and testing standards of the species studied: selenomethionine, selenomethylcystine, selenocysteine, selenite and selenate. The method was applied to Brazil-nut samples, cabbage, garlic and spinach. For speciation of selenium in SPE is used *Moringa oleifera* seeds impregnated with thiosemicarbazide were studied pH, concentration of reactants involved, the adsorption isotherm, adsorbent mass, contact time and optimizations with patterns of selenite and selenate. In addition, the physicochemical characterization of the material and the optimization of detection technique parameters were performed. The results obtained showed minimal detectable amount DESI in the picogram order; all species were detected in the samples except the spinach sample, which was not found selenometilcisteina. All organic species were confirmed by ion fragmentation when compared to standards. In studies of *Moringa oleifera* was selective removal of Se^{+4} with 0.25 g of the adsorbent mass, contact time of the adsorbent with the solution for 60 min, concentration of NaBH_4 0.5% (w/v), HCl 1 0% (v/v) and pre-reducing L-cysteine was better. Observed was found that at pH = 3.5, the species Se^{+4} is retained by the seed, while the adsorption of Se^{+6} occurs to a lesser extent. The process of adsorption of the species Se^{+4} the seed impregnated with thiosemicarbazide was studied from the construction of adsorption isotherms, being adjustable to the models of Langmuir and Freundlich. The results of the evaluated parameters are in accordance with the law, and the two methodologies can be employed in selenium speciation. Improvements are needed for quantification in the case of using DESI source for speciation and organic species in the case of SPE studies.

Keywords: *Speciation, Selenium, DESI, SPE, Moringa oleifera.*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica
BET	Método de Brunauer, Emmett e Teller
CE	Eletroforese Capilar
DESI	Dessorção e Ionização por Electrospray
DESI-MS	Dessorção e Ionização por Electrospray acoplado a Espectrômetro de Massas
DEtSe	Dietselenito
DMDS _e	Dimetildiselenito
DMSe	Dimetilselenito
EDX	Dispersão de Energia Raio X
ESI	Ionização por Electrospray
FT-MIR	Transformada de Fourier – Infravermelho Médio
GC	Cromatografia Gasosa
HGAAS	Espectrômetro de Absorção Atômica com Geração de Hidreto
HPAEC	Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance
HPLC-ICP	Cromatografia Líquida de Alta Performance – Plasma Indutivamente Acoplado
HS-HF-LPME	Headspace – Microextração em Fase Líquida Protegida com Fibra Oca
ITMS	Espectrometria de Massas com Armadilha de Íons
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MALDI	Ionização por dessorção com Matriz Assistida por Laser
MeSeA	Ácido metilseleníco
MeSeOOH	Ácido Metano seleníco
MIP-AES	Plasma induzido por Micro-ondas – Espectrometria de Emissão Atômica
MS	Espectrometria de Massas
PCZ	Ponto de Carga Zero
Q-TOF	Quadrupolo- Tempo de Voo
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SPE	Extração em Fase Sólida

Se(Cys) ₂	Selenocistina
SeAHCys	Selenoadenosilmonocisteina
SeAMet	Selenoadenosilmetionina
SeCys	Selenocisteina
SeMet	Selenometionina
SeMetCys	Selenometilcisteina
SPME	Microextração em fase sólida
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
XANES	Espectroscopia de Absorção de Raios X

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies de selênio comumente encontradas em alimentos.	21
Tabela 2	Alimentos-fonte de selênio e seu teor por porção do alimento.	24
Tabela 3	Comparação de metodologias analíticas para a especiação de selênio.	29
Tabela 4	Trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Espectroscopia Aplicada – IQUFU utilizando <i>Moringa oleifera</i> e seus derivados.	34
Tabela 5	Programa de aquecimento do GFAAS.	39
Tabela 6	Dados obtidos da técnica de BET.	57
Tabela 7	Tabela com porcentagem de C, H, N e S presente nos materiais.	58
Tabela 8	Parâmetros de linearização das isotermas de adsorção segundo os modelos de Langmuir e Freundlich.	70
Tabela 9	Estudo de interferentes na determinação de Se^{+4} $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$.	74
Tabela 10	Parâmetros avaliados do método de extração seletiva de Se^{+4} .	76
Tabela 11	Teste de recuperação de Se^{+4} e Se total em amostras de água mineral.	77
Tabela 12	Aplicação das amostras certificadas no método desenvolvido para determinação de Se^{+4} e Se total.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da fonte de DESI estudada por COOK et al., 2006.	27
Figura 2	Diagrama esquemático do mecanismo de troca iônica.	31
Figura 3	Árvore de <i>Moringa oleifera</i> .	31
Figura 4	Estrutura química da tiosemicarbazida.	33
Figura 5	Fonte DESI, utilizada neste trabalho. (A) Imagem capturada da parte de cima; (B) imagem capturada da parte frontal.	35
Figura 6	Esboço do sistema utilizado para a determinação de Se^{+4} e Se total.	41
Figura 7	(A) Espectro MS com a mistura ternária ($\text{SeMeCys} + \text{SeMet} + \text{Se}(\text{Cys})_2$) (25 ng de cada composto); e MS^2 dos íons filho: (B) $[\text{SeMeCys} + \text{H}]^+$ m/z 184; (C) $[\text{SeMet} + \text{H}]^+$ m/z 198; (D) $[(\text{Se}(\text{Cys})_2 + \text{H})]^+$ m/z 334.	47
Figura 8	(A) Espectro MS da mistura binária composta de Se^{+4} e Se^{+6} (25 ng de cada composto). Espectro MS^2 dos íons: (B) $[\text{HSeO}_4]^-$ m/z 145; (C) $[\text{HSeO}_3]^-$ m/z 129.	47
Figura 9	Otimização univariada dos parâmetros típicos de uma fonte DESI: (A) fluxo do solvente (metanol: água 1:1 v/v), (B) temperatura do capilar e (C) voltagem do spray.	49
Figura 10	Espectros obtidos da couve (modo positivo Figura A e modo negativo Figura B) e espinafre (modo positivo: Figura C e modo negativo: Figura D).	51
Figura 11	Espectros obtidos da amostra de Castanha do Para (modo positivo: Figura A; modo negativo: Figura B).	52
Figura 12	DESI obtido das amostras de alho (modo positivo: Figura A; modo negativo: Figura B).	52
Figura 13	(A) <i>Moringa oleifera</i> triturada sem impregnação; e (B) após a impregnação com a tiosemicarbazida.	53
Figura 14	Espectro de Infravermelho Médio da <i>Moringa oleifera in natura</i> e após impregnação com tiosemicarbazida.	54
Figura 15	Estudo do EDX feito com o material bioadsorvente, (A) <i>Moringa oleifera in natura</i> ; (B) impregnada com reagente tiosemicarbazida.	55
Figura 16	Imagem de SEM, (A) <i>Moringa oleifera in natura</i> ; (B) <i>Moringa oleifera</i> modificada com reagente tiosemicarbazida. Aumento de 500 vezes e	56

escala de 20 μ m.

- Figura 17** Representação dos PCZ da (A) *Moringa oleifera in natura* e (B) da *Moringa oleifera* modifica com tiosemicarbazida. 61
- Figura 18** Distribuição das espécies de Se⁺⁴ e Se⁺⁶ em função do pH. 60
- Figura 19** Efeito do pH na adsorção de Se⁺⁴ e Se⁺⁶ utilizando a semente da *Moringa oleifera* modificada com o reagente tiosemicarbazida. 61
- Figura 20** Efeito do pH na adsorção de Se⁺⁴ e Se⁺⁶, utilizando a semente da *Moringa oleifera* modificada com o reagente tiosemicarbazida. 61
- Figura 21** Estudo da concentração do reagente tiosemicarbazida para modificação da *Moringa oleifera*. Parâmetros utilizados: 25 μ g L⁻¹ de Se⁺⁴, 60 minutos de agitação a 250 rpm, volume da solução de 25,0 mL, massa do adsorvente 0,25 mg. Condições da análise: pH=3,5 e 27°C. 63
- Figura 22** Estudo da variação da massa da semente da *Moringa oleifera oleifera* modificada com o reagente tiosemicarbazida. Parâmetros utilizados: 25 μ g L⁻¹ de Se⁺⁴, 60 minutos de agitação a 250 RPM, volume da solução de 25 mL. 64
- Figura 23** Variação da porcentagem de remoção de Se⁺⁴ em função da variação do tempo de adsorção. Parâmetros utilizados: 25 μ g L⁻¹ de Se⁺⁴, 250 rpm, volume da solução de 25 mL. Condições da análise: pH=3,5 e 27°C. 64
- Figura 24** Estudo da concentração da solução de Selênio para remoção dos íons de Se⁺⁴ com *Moringa oleifera* modificada com tiosemicarbazida. Parâmetros utilizados: 25 μ g L⁻¹ de Se⁺⁴, 250 rpm, volume da solução de 25 mL, tempo de adsorção 45 min. Condições da análise: pH=3,5 e 27°C. 65
- Figura 25** Estudo do volume da solução de selênio para remoção dos íons de Se⁺⁴ com *Moringa oleifera* modificada com tiosemicarbazida. Parâmetros utilizados: 25 μ g L⁻¹ de Se⁺⁴, 250 rpm, tempo de adsorção 45 min. Condições da análise: pH=3,5 e 27°C. 66
- Figura 26** Grafico com a concentração de Se⁺⁴ em solução com e sem adsorção 67
- Figura 27** Isoterma de adsorção de íons Se⁺⁴ utilizando semente de *Moringa oleifera* impregnada com reagente tiosemicarbazida como bioadsorvente. Resultados obtidos com as condições otimizadas. 68
- Figura 28** Linearização das isotermas de adsorção de Se⁺⁴ aplicadas aos modelos 69

de Langmuir (a) e Freundlich (b).

Figura 29	Otimização da concentração de NaBH_4 .	73
Figura 30	Otimização da concentração de HCl.	72
Figura 31	Estudo da eficiência do redutor na redução de Se^{+6} para Se^{+4} .	73
Figura 32	Curvas de calibração do Se^{+4} sem adsorção.	76

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	<i>i</i>
	LISTA DE TABELAS	<i>ii</i>
	LISTA DE FIGURAS	<i>iii</i>
1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1.	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR DESI	21
3.1.1.	Selênio	21
3.1.2.	Fontes de Selênio	23
3.1.3.	Especiação de Selênio	25
3.1.4.	Espectrometria de massas	26
3.1.5.	Fonte de Ionização por Dessorção Electrospray	27
3.2.	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR SPE	30
3.2.1.	Biosorção e <i>Moringa oleifera</i>	30
3.2.2.	Modificação e impregnação em bioadsorventes	32
3.2.3.	Extração em Fase Sólida	33
4.	PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1.	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR DESI	35
4.1.1.	Reagentes	35
4.1.2.	Instrumentação	35
4.1.3.	Análises de especiação de Selênio	37
4.1.4.	Determinação de Se total	38
4.2.	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR SPE	39
4.2.1.	Reagentes	39
4.2.2.	Instrumentação	40
4.2.3.	Coleta e preparo das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	41
4.2.4.	Preparo da <i>Moringa oleifera</i> impregnada	41
4.2.5.	Caracterização da <i>Moringa oleifera</i>	42

4.2.6.	Estudos da remoção seletiva de Se⁺⁴	43
4.2.6.1.	Estudo do pH	43
4.2.6.2.	Teor de tiosemicarbazida impregnada na <i>Moringa oleifera</i>	43
4.2.6.3.	Parâmetros que afetam a adsorção	43
4.2.6.4.	Isoterma de adsorção	44
4.2.6.5.	Otimização da determinação de selênio	44
4.2.6.6.	Estudo de interferentes	44
4.2.6.7.	Parâmetros Analíticos Avaliados	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR DESI	46
5.1.1.	Análise das soluções padrões	46
5.1.2.	Otimização dos parâmetros	48
5.1.3.	Limite de Detecção	49
5.1.4.	Desempenho do método e aplicação a amostras reais	50
5.1.5.	Determinação de Se total	52
5.2.	ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR SPE	53
5.2.1.	Caracterização da <i>Moringa oleifera</i> impregnada	53
5.2.2.	Estudos da remoção seletiva de Se⁺⁴	59
5.2.2.1.	Estudo do pH	60
5.2.2.2.	Teor de tiosemicarbazida impregnada na <i>Moringa oleifera</i>	62
5.2.2.3.	Parâmetros que afetam a adsorção	63
5.2.2.4.	Isoterma de adsorção	67
5.2.2.5.	Otimização da determinação por HGAAS	70
5.2.2.6.	Estudo de interferentes	73
5.2.2.7.	Parâmetros Analíticos Avaliados	75
6.	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o conhecimento das diferentes formas químicas dos elementos tem ganhado importância crescente, visto que a determinação da concentração total de um elemento é importante, mas não é suficiente para avaliação de sua toxicidade e biodisponibilidade. Frequentemente, a falta de informação sobre as diferentes formas químicas nas quais os elementos são encontrados na natureza é a principal limitação para a compreensão do ciclo biogeoquímico dos elementos e sua atuação nos sistemas biológicos (ADAMS, 2004).

O selênio é um elemento essencial para os organismos; no entanto, há uma faixa estreita entre a sua concentração essencial (40 µg/dia) e a tóxica (400 µg/dia). Além disso, essa toxicidade pode variar de acordo com a espécie envolvida como, por exemplo, o selenito ser considerado mais tóxico que o selenato (MORENO, M. E.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C., 2000).

A ingestão diária recomendada é de 55 µg de Se para adultos. Uma intoxicação pode ocorrer quando ultrapassada a ingestão de 400 µg de Se por dia (WHO, 2014), cujos sintomas são: vômitos, queda de cabelos, irritabilidade, náuseas, neuropatia periférica e fadiga (CHERNOFF, 2005). O limite máximo aceitável de Se total em águas doces destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado (Classe 1), é de 10 µg L⁻¹, segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005) e a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014).

Embora o conhecimento da concentração total dos elementos seja útil, o conhecimento da especiação é de fundamental importância devido à toxicidade, mobilidade, biodisponibilidade e bioacumulação de cada espécie química. A interação dos metais com a biota é altamente dependente de suas formas químicas, sendo que o impacto de alguns metais está diretamente ligado ao seu estado de oxidação e/ou à estrutura orgânica ou inorgânica, além de sua concentração total (GONZALVEZ et al., 2009).

Atualmente, ainda se nota que o uso de técnicas cromatográficas é a ferramenta preferida para especiação. Entretanto, de acordo com revisão realizada por GONZALVEZ et al. (2009), já se observam evolução e desenvolvimento de novas metodologias, principalmente não cromatográficas, que auxiliam, com eficiência, a melhoria da sensibilidade dessas técnicas. Dentre tais metodologias, há os extratores sólidos, usados em métodos de concentração/extração, que são classificados como

adsorventes polares e apolares, resinas quelantes e resinas trocadoras de íons (TERADA, 1991).

Extratores sólidos naturais têm sido muito empregados, mais conhecidos como bioadsorventes (algas, fungos, leveduras e bactérias, dentre outros). São considerados uma importante classe dos adsorventes naturais, pois possuem, diferentemente das resinas sintéticas, vários sítios de ligação, incluindo grupos aminas, carboxilas, hidroxilas, entre outros, o que lhes confere maior capacidade adsorviva quando comparados a outros adsorventes (BAG, H.; LALE, M.; TURKEY, A.R., 1998). A *Moringa oleifera* tem apresentado características de bioadsorventes com muita eficácia. Entretanto, os mecanismos associados à adsorção de íons metálicos por bioadsorventes lignocelulósicos ainda não são claros, sendo possível que a adsorção do íon metálico aconteça por processos de troca iônica e complexação, que podem ocorrer simultaneamente (ARAÚJO et al., 2010).

O preparo da amostra durante um análise de especiação é uma das etapas mais críticas, pois a integridade da espécie de interesse deve ser preservada. Por isso, os procedimentos que resultam em uma alteração do equilíbrio ou em uma transformação das diferentes espécies devem ser evitados (GONZALVEZ et al., 2009). A preservação de espécies durante a sua análise requer a aplicação de processos menos agressivos do que aqueles empregados na análise total, fazendo com que o equilíbrio global tenha o mínimo de perturbação possível.

Estudos de especiação têm requerido preparo com menor manipulação possível da amostra para evitar a interconversão das espécies. Assim, o uso de metodologias de análise direta, com mínima ou nenhuma manipulação prévia das amostras, tem sido relatado, como, por exemplo, o trabalho realizado por LIN et al. (2010). Este utiliza dessorção e ionização por electrospray diretamente na superfície das amostras e consegue analisar, diretamente na superfície de rações, espécies de arsênio orgânico e inorgânico, com limite de detecção na ordem de picogramas.

A busca por determinações eficientes das espécies de interesse, sem risco de interconversão de espécies e com qualidade na análise, integrando diferentes técnicas analíticas, tem sido cada vez mais utilizada. Assim, partindo do princípio de que selênio é importante na saúde da população e que seu excesso pode causar sérios danos ao organismo, e que essa toxicidade pode variar de acordo com a espécie química envolvida, justifica-se a melhoria de metodologias para a especiação desse elemento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi desenvolver métodos não cromatográficos que fossem eficientes na especiação de selênio.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral proposto, tivemos os seguintes objetivos específicos:

- Empregar a fonte DESI para especiar selênio, orgânico e inorgânico, diretamente na superfície de castanha-do-pará, couve e alho, com o mínimo de manipulação dessas amostras, e detectar as espécies por MS;
- Testar a *Moringa oleifera* como bioadsorvente seletivo e determinar selênio inorgânico (+4 e +6) em água, por HGAAS.

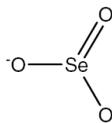
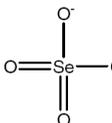
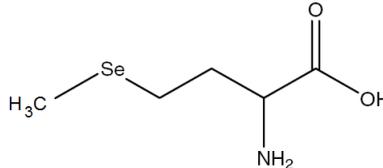
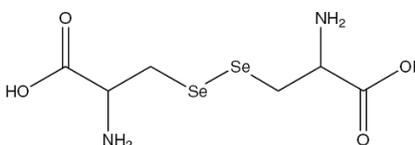
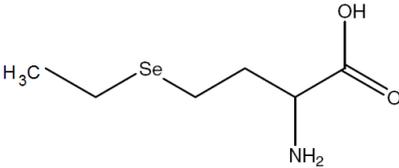
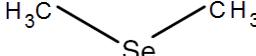
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR DESI

3.1.1. Selênio

O selênio é um elemento presente em diversos tipos de amostras, como alimentícias, ambientais e biológicas, principalmente nos estados de oxidação Se^{+6} , Se^{+4} , Se^0 e Se^{-2} . A Tabela 1 apresenta as estruturas moleculares dos compostos de selênio mais estudadas. Os oxianions selenito (Se^{+4}) e selenato (Se^{+6}) são as formas inorgânicas mais conhecidas desse elemento. Quanto à forma orgânica, o selênio apresenta-se como selenoaminoácidos, sendo os compostos mais conhecidos a selenocisteína, selenometionina, selenoetionina e dimetilseleneto.

Tabela 1. Espécies de selênio comumente encontradas em alimentos.

Nome	Abreviatura	LD ₅₀ (mg Kg ⁻¹)	Estrutura
Selenito	Se^{+4}	3,5	
Selenato	Se^{+6}	5,5	
Selenometionina	SeMet	4,3	
Selenocisteína	SeCys	20	
Selenoetionina	SeEt	-	
Dimetilseleneto	DMSe	-	

Fonte: Wake et al. (2004), Juresa et al. (2006) e Repetto, M.R.; Repetto, M. (2005).

As espécies selenito e selenato, com estado de oxidação +4 e +6 respectivamente, estão essencialmente presentes em amostras de água, solos e alguns alimentos, como o alho, couve e castanhas (GILON, N.; POTIN-GAUTIER, M.; ASTRUC, M., 1996). A Organização Mundial de Saúde (OMS), conjunta à Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (USDA), recomenda a ingestão de 26 e 35 mg de selênio por dia para mulheres e homens, respectivamente. Esse é o nível de ingestão requerido para evitar o aparecimento de patologias e sintomas de deficiência. Alimentos que são fontes de selênio incluem castanhas, levedura, cereais integrais e frutos do mar (FAO/WHO, 1998).

Uma vez ingeridas, sejam por suplementos ou alimentos, as formas de Se podem ser transformadas em um intermediário comum: o HSe^- . Nas células vermelhas do sangue, selenito é prontamente reduzido pela glutathione peroxidase a seleneto (SUZUKI, 2005). Em seguida, este ânion é lançado novamente na corrente sanguínea, onde se liga à albumina para ser transportado ao fígado (SHIOBARA, Y.; SUZUKI, K. T, 1998). A biodisponibilidade, a essencialidade e a toxicidade dependem fortemente das formas químicas em que o selênio é encontrado. Essa característica faz do selênio um elemento ambíguo, ou seja, trata-se de um semimetal essencial em uma faixa de concentração bastante estreita.

A toxicidade do selênio no organismo humano é cerca de 10 mg Se por 60 Kg de peso corporal (SUZUKI, 2005). A concentração normal encontrada no sangue é de 0,076-0,14 mg L^{-1} : soro/plasma 0,05-0,15 mg L^{-1} e urina 0,002-0,03 mg L^{-1} ; a concentração tóxica é de 0,4 mg L^{-1} no soro/plasma e na urina; e a concentração letal é de 1 mg L^{-1} no sangue e 2 mg L^{-1} na urina (REPETTO, M. R.; REPETTO, M., 2005).

A Síndrome de Keshan é a doença mais relatada associada à deficiência de selênio. Foi descrita pela primeira vez, em 1935, na província chinesa de mesmo nome (LIU et al., 2002). Os principais sintomas clínicos dessa doença são os vários graus de cardiomegalia e descompensação cardíaca. Degeneração e necrose das fibras com substituição por fibrose são encontradas nas histopatologias do miocárdio (WHO, 2014). Diversos trabalhos associam, ainda, a deficiência de selênio com a incidência de vários tipos de câncer; podemos citar o trabalho de Ip et al. (2000).

Em contraste, a concentração excessiva de Se no organismo é conhecida como selenose, mas as informações sobre seus efeitos crônicos sobre a saúde são limitadas. Os registros prévios de selenose têm descrito sintomas como náusea, vômitos, cansaço, irritabilidade, parestesias e queda intensa de cabelos. A queda de cabelos tem sido

atribuída ao dano estrutural da queratina - acredita-se que o Se se insere entre pontes dissulfídicas, provocando o enfraquecimento do cabelo. Os demais danos são semelhantes aos associados às intoxicações por arsênico ou outros metais; entretanto, não foram identificadas, até o presente, as vias bioquímicas envolvidas diretamente nos eventos. A causa mais frequente de selenose no EUA é a formulação incorreta de suplementos nutricionais contendo Se (COZZOLINO, 2005).

Estudos mostram a contribuição de selênio na prevenção de doenças como o câncer, a diabetes e as doenças cardiovasculares. Esse elemento é essencial, uma vez que está relacionado com os processos de oxidação no organismo e trabalha em conjunto com as vitaminas E, C, B3, e glutathione. A ingestão diária de selênio é muito importante, e o principal meio de fornecimento desse nutriente para o corpo são os alimentos. Assim, vários tipos de alimentos são indicados como funcionais, por terem nutrientes como selênio na sua composição.

Os selenoaminoácidos são mais encontrados em proteínas de plantas e animais. Existem plantas que são acumuladoras de selênio e podem ser divididas em três grupos: acumuladoras de selenito (brócolis e pepino), acumuladoras de SeMet (trigo e cogumelo) e acumuladoras de metilselenocisteína (MeSeCys), alho e cebola (SUZUKI, 2005). Em produtos farmacêuticos, selenito de sódio e selenato de sódio, muitas vezes, aparecem quelados com aminoácidos, dando origem ao quelato de selênio. Este adiciona a vantagem de uma melhor absorção via oral do elemento em questão (DEG, 2007).

3.1.2. Fontes de Selênio

Antes de examinar as fontes de selênio nos alimentos, é importante considerar a influência da composição do solo, uma vez que este é o fornecedor de nutrientes para as plantas. A distribuição de selênio no solo é heterogênea, pois os processos evolutivos da Terra e a concentração do elemento estão relacionados a fatores geoquímicos, tais como pH, quantidade de matéria orgânica no solo, e se o selênio está em uma forma que é passível de captação pela planta (SUNDE, 2006).

Apesar de o selênio poder ser obtido por meio de suplementação e da água, a rota principal é uma boa nutrição. No entanto, devido ao resultado da variação de selênio no solo, devemos estar atentos ao seu conteúdo em alimentos: ele vai variar com

base na localização e ingestão, isto é, o teor de selênio será proporcional ao local de cultivo e à quantidade de alimento ingerida.

Assim, considerando uma quantidade relativa de selênio em alimentos, a Tabela 2 apresenta o conteúdo de selênio em um grupo de alimentos consumidos no mundo, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2014).

Tabela 2. Alimentos-fonte de selênio e seu teor por porção do alimento.

Alimento	Porção	µg de Se total
Castanha-do-pará	6-8 castanhas	544
Atum cozido	3 unidades	92
Linguado	3 unidades	47
Sardinha em óleo	3 unidades	45
Presunto	3 fatias	42
Camarão	3 unidades	40
Macarrão cozido	1 xícara	37
Bife de carne assado	3 unidades	33
Peru desossado e assado	3 partes	31
Fígado bovino frito	3 unidades	28
Frango assado	3 unidades	22
Requeijão, 1% de gordura do leite	1 xícara	20
Arroz marrom cozido	1 xícara	19
Bife com 25% de gordura, grelhado	1 unidade	18
Ovo cozido	1 unidade	15
Trigo	1 xícara	15
Pão de trigo integral	1 fatia	13
Feijão cozido	1 xícara	13
Aveia	1 xícara	13
Espinafre cozido	1 xícara	11
Leite, 1% de gordura	1 xícara	8
Iogurte, baixo teor de gordura	1 xícara	8
Lentilhas cozidas	1 xícara	6
Pão branco	1 fatia	6
Molho de espaguete	1 xícara	4
Castanha de caju, torrada	1 xícara	3
Flocos de milho	1 xícara	2
Ervilhas cozidas	1 xícara	2
Bananas cortadas	1 xícara	2
Batata assada	1 unidade	1
Pêssegos enlatados	1 xícara	1

Fonte: USDA, 2014.

Observa-se que alimentos como peixes, frutos do mar, carne bovina e carne de frango, produtos lácteos como queijo *cottage* e, especialmente, grãos são boas fontes de selênio. Além dessas fontes, a castanha-do-pará emergiu como a maior fonte de selênio, contendo cerca de 80 µg de Se por castanha, sendo, frequentemente, recomendada em

dietas. Áreas que não têm o fornecimento de castanha-do-pará podem incluir, em suas dietas, pães, cereais, carnes, aves, peixes e ovos (CHUN et al., 2010).

3.1.3. Especificação de Selênio

As formas comuns de selênio no ambiente e os sistemas biológicos são selenito (SeO_3^{2-}), selenocistina ($\text{Se}(\text{Cys})_2$), selenometionina (SeMet) e selenato (SeO_4^{2-}) (CERVERA, M. L.; DAS, A. K.; DE LA GUARDIA, M., 2001), ordenadas da maior para a menor toxicidade (PYZYNSKA, 1998). Por outro lado, selenometilcisteína (SeMeCys), um composto de selênio orgânico que tem um aminoácido metabolicamente modificado, é mais biodisponível que as outras formas de selênio (ABDULAH et al., 2005).

No que diz respeito à absorção e à relação com o armazenamento, metabolismo e excreção, observaram-se comportamentos diferentes para cada espécie. A absorção de selenato (SeO_4^{2-}) é quase completa e é dependente do gradiente de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, uma vez que o uso de selenito (SeO_3^{2-}) é de cerca de 80%, com maiores interações com outras substâncias do trato gastrointestinal (COZZOLINO, 2005). A selenometionina é também usada pelo corpo: cerca de 96% dela são absorvidas no intestino delgado, ao contrário das espécies inorgânicas que estão no duodeno (FAIRWEATHER-TAIT, 1997; FOX, T.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J., 1999).

Apesar de formas inorgânicas de selênio serem fontes para organismos, a selenometionina destaca-se pelo fato de poder ser incorporada em proteínas nos tecidos. No entanto, para que isso ocorra, depende-se da presença de metionina na dieta. Sua ausência pode impedir que a absorção do mineral selênio seja sintetizada. Em contraste, as espécies de selênio ingeridas podem passar por processos diferentes e serem sintetizadas em seleneto e, em seguida, serem novamente metabolizadas em selenofosfatase, que é precursora de várias selenoproteínas (HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M., 1999; SUNDE, 2006).

Ao considerar a faixa de toxicidades de diferentes formas químicas de selênio e a preocupação crescente com os altos níveis dessas toxicidades encontrados em vários ambientes contaminados (JOHNSON, T. M.; BULLEN, T. D.; ZAWISLANKI, P. T., 2000), observa-se que a especificação de selênio é vital para a análise e avaliação adequada das espécies desse elemento no ambiente e sistemas biológicos. Por isso, há uma demanda significativa para o desenvolvimento de metodologias cada vez mais

sensíveis, robustas e rápidas, com o mínimo possível de manipulação das amostras, uma vez que o preparo de amostra continua a ser um grande desafio, devido à facilidade na interconversão das espécies.

Amostras de alimento são, em geral, consideradas complexas e possuem uma variedade de espécies em sua composição. Assim, utilizar muitas etapas no preparo dessas amostras e/ou de reagentes pode produzir uma margem de erros significativos nas análises.

3.1.4. Espectrometria de Massas

O princípio de funcionamento de um Espectrômetro de Massas envolve partículas eletricamente carregadas que se movimentam pela ação de um campo elétrico. Ao longo dessa trajetória, essas partículas são alteradas devido às interações entre a carga elétrica da partícula e o campo aplicado. Tais interações provocam deformação em função da massa, do sentido do movimento e da velocidade, frente ao campo aplicado (HARRIS, 2012).

Essa técnica é utilizada para o estudo das massas de átomos e moléculas ou fragmentos de moléculas eletricamente carregados, sendo determinadas as massas dos átomos e moléculas ao se medir a razão massa/carga (m/z) dos íons gerados. Os íons formados, através da indução, perda ou o ganho de carga, são direcionados por forças eletrostáticas para dentro do analisador de massas. Após direcionamento, eles são separados de acordo com suas razões m/z e finalmente detectados. O MS detecta os resultados da ionização molecular e apresenta os resultados dos íons em espectro com relação m/z , que mostra a intensidade relativa em função da razão *massa/carga* para cada íon.

Atualmente, a Espectrometria de Massas aplica diversas técnicas avançadas, que são diferentes entre si, principalmente no modo de ionização das amostras. Devido a essa versatilidade, o uso da técnica pode ser aplicado em muitas áreas, pois a análise de proteínas, peptídeos, açúcares etc., que antes não eram possíveis de serem detectados por técnicas antigas de ionização, agora são analisados rotineiramente.

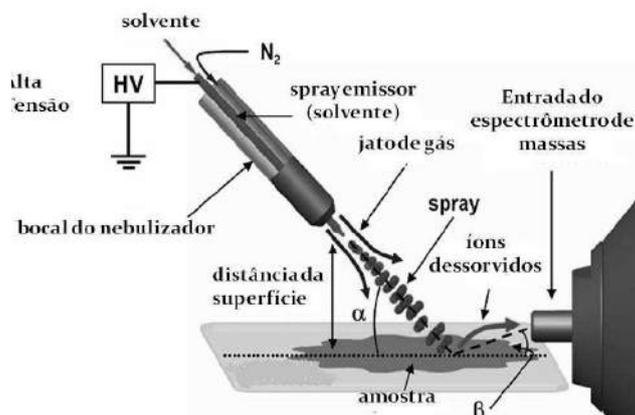
O surgimento de novas técnicas de ionização, como a Ionização por Electrospray (ESI), expandiu a gama de moléculas que podem ser analisadas por Espectrometria de Massas, incluindo moléculas de alta polaridade, alta massa molecular e grande complexidade estrutural. Esse tipo de ionização é conhecido pela habilidade em transferir espécies da solução para a fase gasosa de forma suave, permitindo que

espécies supramoleculares, fracamente ligadas, permaneçam intactas (LORDEIRO, 2011).

3.1.5. Fonte de Ionização por Dessorção e Electrospray

A fonte DESI supera as limitações das fontes ESI, podendo, por exemplo, ser aplicada somente para amostras em solução. Cooks et al. (2006) estudaram a técnica denominada DESI (do inglês: *desorption electrospray ionization*), onde um spray de partículas carregadas bombardeia uma superfície de uma amostra sólida, líquida ou gasosa, dessorvendo e ionizando as moléculas presentes. A ilustração do esquema da fonte DESI é apresentada na Figura 1.

Figura 1. Esquema da fonte de DESI estudada por COOKS et al., 2006.

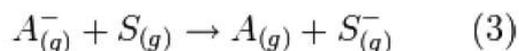
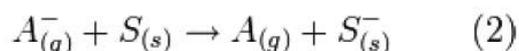
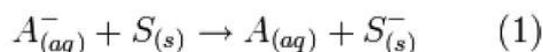


A partir da Figura 1, visualiza-se a estrutura da fonte de ionização. O solvente entra por um tubo capilar no nebulizador; lateralmente ao tubo capilar, entra um jato de nitrogênio em alta pressão, que vai produzir as pequenas gotículas. Há uma grande diferença de potencial do início ao fim do nebulizador que irá deixar as gotículas eletricamente carregadas. Esse feixe de minúsculas gotas eletricamente carregadas é direcionado à amostra por um ângulo α e os íons desorvidos são direcionados para a entrada do Espectrômetro de Massas, em pressão atmosférica. Controles importantes devem ser observados, como o ângulo β com a superfície da amostra.

Na técnica DESI, deve ser observada a característica das amostras para determinar o tipo de mecanismo de ionização: podem ser moléculas de pequena ou elevada massa molar. Peptídeos e proteínas, com alta massa molar, apresentam íons com cargas múltiplas, que são facilmente transferidas para analito, pois a gota eletricamente carregada atinge a superfície da amostra, espalha-se por um raio maior que o seu raio original e dissolve as proteínas.

Entretanto, quando se trata de moléculas com pequena massa molar, a ionização ocorre por transferência de cargas: um elétron ou um próton.

Existem três possibilidades de transferência de carga. Considerando A como analito e S como solvente, temos as equações: (1) a carga é transferida entre o íon do solvente e o analito na superfície (Equação 1); (2) a transferência ocorre entre o íon do solvente na fase gasosa e o analito na superfície, e o íon do solvente é evaporado antes de alcançar a superfície da amostra, devido à distancia entre o spray e a superfície (Equação 2); (3) possibilidade ocorre entre o íon do solvente na fase gasosa e a molécula do analito também na fase gasosa, devido à alta pressão de vapor da amostra (Equação 3) (LORDEIRO, 2011).



O controle de alguns parâmetros é importante para garantir a eficiência da ionização por DESI, uma vez que se trata de uma ionização complexa. Desse modo, veem-se efeitos de superfície, parâmetros do *eletrospray*, parâmetros químicos e geométricos. Os efeitos de superfície tratam da composição química, da temperatura e do potencial elétrico aplicado; os parâmetros do *eletrospray* incluem a tensão e a razão entre os fluxos de líquido e gás; os parâmetros químicos incluem a composição do solvente a ser nebulizado, como, por exemplo, a adição de sais; e os parâmetros geométricos incluem os ângulos α , β e as distâncias entre a amostra e a linha de transferência do íon, e a amostra e o nebulizador (LORDEIRO, 2011).

Assim, todos estes parâmetros - o ângulo α , β , bem como as distâncias entre o emissor de spray e a superfície, e a distância entre a superfície e a entrada do Espectrômetro de Massas - devem ser otimizados para o sucesso da fonte DESI (COOKS et al., 2006). Outros fatores importantes incluem pressão do gás, tipo de solvente e o valor da alta tensão. Diversas aplicações da fonte DESI têm sido apresentadas na literatura, o que denota suas significativas vantagens, tais como a velocidade de análise, a especificidade química e a aplicação em amostras complexas (IFA et al., 2009).

Estudos vêm demonstrando que diversas técnicas são aplicadas à especiação de selênio em amostras de alimentos, como apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação de metodologias analíticas para a especiação de selênio.

Espécies de Selênio	Técnica	Amostra	LD	Ref
SeMet, SeCys	HPLC-ICP MS	Leite	1ng mL ⁻¹	Bierla et al., 2008.
SeMet, SeAHCys	HPLC-ICP MS, ESI-MS	Extrato de levedura	10-100 ng mL ⁻¹	Casiot et al., 1999.
Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶ , SeMet	CE-ICP MS	Extrato de solo	0,39; 0, 49; 202µg L ⁻¹	Casiot et al., 2002.
SeMetCys, Se(Cys) ₂ , Se ⁺⁶ , SeMet	HPAEC-AFS	Tablete de levedura	1-5 µg L ⁻¹	Liang et al., 2006.
SeMetCys, SeMet, Se(Cys) ₂ , Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶	HPLC-ICP MS, ESI-ITMS	Couve	-	Chan et al., 2010.
SeMet, Se(Cys) ₂ , Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶	HPLC-ICP MS	Bacalhau cozido	0,008 mg Kg ⁻¹	Crews et la., 1996.
SeMet, Se ⁺⁶ , SeMeCys	HPLC-ICP MS	Trigo	-	Cubadda et al., 2010.
DMS ₂ Se, DEtSe, DMDSe, Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶	MIP-AES	Alimentos	0,14 e 0,15 µg ⁻¹	Dumont et al., 2005.
SeMet, Se(Cys) ₂ , SeCys, SeMetCys, Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶	HPLC-ESI-MS	Suplementos diet	fmol	Encinar et al., 2004.
SeAMet	MALDI-Q-TOF-MS	Levedura	0,31-2,00 µg L ⁻¹	Fang et al., 2009.
SeMet, Se(Cys) ₂ , Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶ , SeMetCys	HPLC-ICP MS, ESI-MS	Tecido foliar	65 ng L ⁻¹	Ghasemi et al., 2011.
DMS ₂ Se, DMDSe	HS-HF-LPME, GC-MS	Alimentos	10,1; 14,5; 6,3 ng Kg ⁻¹	Infante et al., 2009.
SeMet, SeMetCys, Se ⁺⁶	ICP MS, HPLC-ESI-MS	Batatas	-	Jayasinghe et al., 2010.
Proteína contendo Se	MALDI-MS, HPLC-ESI-MS	Alimentos	0,57; 0,47; 0,2 ng mL ⁻¹	Dietz et al., 2004.
SeMetCys, SeMet, Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶	ICP MS, ESI-MS	Broto de cenoura	0.045 µg g ⁻¹	Kápolna et al., 2009.
SeMeCys, SeMet	HPLC-ESI-MS	Sementes	-	Kitaguchi et al., 2008.
Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶ , DMDSe	XANES	Águas	-	Lenz et al., 2011.
DMS ₂ Se, DMDSe, SeMet, SeMetCys, Se ⁺⁴	HPLC-ICP MS	Amostras biológicas	8,0 nmol L ⁻¹	Lunøe et al., 2010.
SeMet, Se(Cys) ₂ , MeSeOOH, Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶	HPLC-ICP MS	Solo	3-29 ng L ⁻¹	Tolu et al., 2011.
Se ⁺⁴ , Se ⁺⁶ , Se(Cys) ₂ , SeMet	CE-ICP MS	Arroz	0,1-0,9 ng L ⁻¹	Zhao et al., 2011.

Observa-se que, na maior parte das técnicas listadas, a detecção é realizada por Espectrômetro de Massas (MS) para a especificação do selênio. Observa-se, também, que essas técnicas permitem uma versatilidade de espécies em mesma amostra. Estratégias de separação antes das determinações apresentam-se necessárias na maior parte das técnicas relatadas (Tabela 3). Investigando seus limites de detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ), verificam-se baixos valores, apresentando uma boa sensibilidade nas determinações de espécies como SeMet, Se(Cys)₂, SeCys, SeMetCys, Se⁺⁴, Se⁺⁶ e SeAMet.

Entretanto, quando se observam as metodologias realizadas e as estratégias de análises que foram necessárias para o tratamento das amostras, verificam-se onerosidade e consumo considerável de reagentes. Assim, o emprego da fonte DESI busca reduzir as etapas do tratamento da amostra, fornecendo íons suficientes para a detecção pelo Espectrômetro de Massas, podendo ter mesma ou melhor sensibilidade nas determinações, quando comparado com o uso de técnicas não cromatográficas.

3.2. ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR SPE

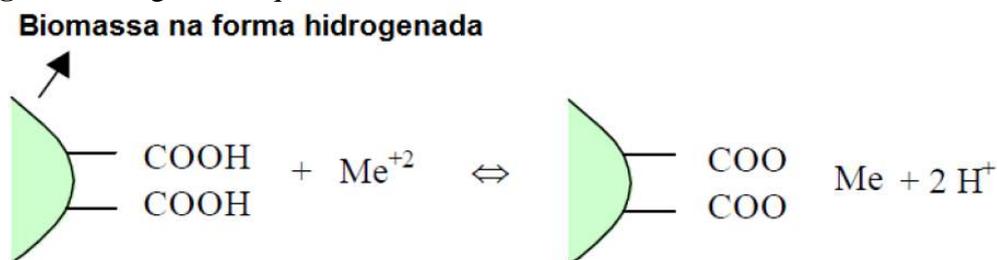
3.2.1. Biosorção e *Moringa oleifera*

Os descartes de metais tóxicos têm crescido cada vez mais no meio ambiente, devido à industrialização e à urbanização, expondo os recursos naturais de água a processos de contaminação contínua. Esses descartes são problemas de grande interesse, não só em relação à biota no meio receptor, mas também para os seres humanos, uma vez que causam impacto diretamente na saúde. A acumulação de metais ocorre por meio de procesos antropogênicos com interações químicas e físico-químicas do metal com o meio. O processo de biosorção com materiais naturais oferece vantagens para a remoção desses metais descartados, tais como o uso de bioadsorventes de baixo custo, com alta eficiência de remoção, redução no consumo de reagentes e possibilidade de regeneração.

A biosorção é definida como a remoção de íons metálicos por meio de adsorção passiva ou complexação. A remoção de metais por processos metabólicos, realizadas com células vivas ou mortas, tem sido, também, amplamente estudada (ARAÚJO et al., 2013). Entretanto, estudos de biosorção, utilizando materiais naturais, têm sido mais empregados em amostras ambientais, devido à facilidade de aquisição de material e à

alta eficiência de remoção dos metais nessas amostras. Os processos de remoção são, em geral, por trocas iônicas entre os bioadsorventes e o metal e, frequentemente, ocorrem na superfície do material, como apresentado na Figura 2.

Figura 2. Diagrama esquemático do mecanismo de troca iônica.



Fonte: Alves, 2013.

Materiais como *Moringa oleifera*, que possuem grupos polares na superfície, são susceptíveis de melhorar a capacidade de troca catiônica consideravelmente (REDDY et al., 2012). *Moringa oleifera* é a espécie mais amplamente cultivada de uma família monogenética, a *Moringaceae*. A Figura 3 mostra uma árvore da *Moringa oleifera*. Ela é nativa do norte da Índia e atualmente cresce em muitas regiões, incluindo a África, Arábia, Sudeste da Ásia, do Pacífico, Ilhas do Caribe e América do Sul (NADEEM et al, 2006;. BHATTI et al, 2007;. REDDY et al, 2010). Além disso, é cultivada e tornou-se naturalizada em muitos locais nos trópicos (REDDY et al., 2012).

Diferentes partes da árvore de *Moringa oleifera* têm sido utilizadas em estudos de adsorção com sementes (OBUSENG et al., 2012), folhas (REDDY et al., 2012), madeira (KALAVATHY et al., 2012), casca da semente (REDDY et al., 2011), vagem (BHATTI et al., 2007) e cascas (NADEEM et al., 2006).

Figura 3. Árvore de *Moringa oleifera*.



Foto: Almeida, I. L. S., Uberlândia 2010.

Entre essas partes, a semente tem sido a mais estudada, devido à sua grande capacidade de adsorção de metais e grandes aplicações como coagulantes. Embora as sementes tenham polieletrólito catiônico, que provaram ser eficazes no tratamento de água, outros estudos foram realizados para explorar outras aplicações potenciais para esse material, principalmente para ser utilizado como bioadsorvente de metal (ARAÚJO et al., 2013).

O extrato aquoso das sementes da *Moringa oleifera* é conhecido por ser um coagulante natural equivalente ao sulfato de alumínio, podendo atuar, também, como coadjuvante de coagulação em associação com sais de ferro ou alumínio (Frighetto ET al., 2007). As sementes, além de promoverem a redução da turbidez das águas por coagulação de partículas coloidais suspensas, apresentam um efeito de tratamento biológico, eliminando os microorganismos patogênicos. Essa purificação da água se dá por arraste mecânico dos patógenos em solução com a sedimentação dos agregados de partículas, e, também, principalmente, pelo efeito bactericida de um agente ativo antimicrobiano 4 α -L-raminosi-benzil isotiocianato (MUYIBI, S. A.; EVISON, L. M., 1995). Verificou-se também que as sementes são capazes de reduzir a dureza da água em cerca de 60-70% (MUYIBI, S. A.; EVISON, L. M., 1995).

O agente ativo responsável pela coagulação de águas turvas presentes nas sementes de *Moringa oleifera* é uma proteína catiônica com peso molecular na faixa de 6–13 kDa (NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G., 1995).

3.2.2. Modificação e impregnação em bioadsorventes

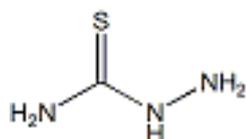
Fases de modificação na superfície da *Moringa oleifera* foram utilizadas para induzir sua ativação ou mesmo aumentar a capacidade de remoção do metal em estudo (ARAÚJO et al., 2013). O tratamento com NaOH tem sido empregado com sucesso nessa ativação da *Moringa oleifera* para remover íons metálicos (MARQUES et al, 2012;. REDDY et al, 2010;. REDDY et al, 2012.), devido à incorporação de grupos OH⁻ na superfície do material. Além disso, REDDY et al. (2012) também utilizam o ácido cítrico para aumentar os grupos de ácido carboxílico, melhorando, assim, a adsorção de Cd⁺², Cu⁺² e Ni⁺² a partir de solução aquosa.

Bennett et al. (2003) realizaram uma análise abrangente dos metabólitos secundários em espécies de *Moringa oleifera*, na qual verificaram a presença de glucosinolatos e compostos fenólicos (flavonóides, antocianinas, proantocianidinas e

cinamatos). Cada glucosinolato contém um átomo de carbono central, que está ligado ao grupo tioglucose (formando uma cetoxima sulfatada) através de um átomo de enxofre, e a um grupo sulfato por meio de um átomo de nitrogênio.

Esses grupos funcionais, contendo enxofre e nitrogênio, são bons sequestradores de metais a partir de solução aquosa. Ligantes como a tiosemicarbazida, estrutura apresentada na Figura 4, demonstraram propriedades de ligação variáveis e diversidade estrutural. Além disso, a capacidade de formar quelatos com os íons de metais de transição tem sido objeto de interesse, devido às suas atividades biológicas (SASWATI et al., 2013) e químicas.

Figura 4. Estrutura química da tiosemicarbazida.



Assim, devido à necessidade de definir e compreender os grupos funcionais e a alteração de impregnação responsável pelo fenômeno de adsorção, a caracterização do material deve ser feita.

3.2.3. Extração em fase sólida

Para remoção de metais, a Extração em Fase Sólida (SPE) oferece uma série de benefícios importantes, como a redução do uso de solventes, de exposição e de tempo de extração, para a preparação da amostra. Entretanto, esse método de tratamento da amostra permite a concentração e a purificação do analito em solução por sorção em um adsorvente sólido (CAMEL, 2003; PASSOS, 2011). Determinadas características são vantajosas quando adaptadas a Sistemas de Injeção em Fluxo e a um Gerador de Hidretos (FIA-HGAAS), pois, além de aumentar a concentração do analito antes da geração de hidreto, ocorre a eliminação de parte dos interferentes que influenciam no processo. Dessa forma, percebe-se um aumento significativo na sensibilidade e precisão da técnica.

O mecanismo de retenção do analito num sorvente sólido depende da natureza química desse sorvente e pode ser uma simples adsorção, complexação ou troca iônica. No uso da SPE pelo mecanismo de adsorção, o analito é adsorvido na fase sólida

através de forças de Van der Waals ou de forças de Interação Hidrofóbica. O uso de sorventes apropriados, como carvão ativado, sílica-gel, celulose, alumina, EPU, poliéster, PTFE, entre outros, tem permitido o isolamento de determinados analitos a partir de suas matrizes e, conseqüentemente, proporcionado uma pré-concentração (CAMEL, 2003).

Apesar de o uso das sementes de *Moringa oleifera* como agente de coagulação já ser um dos mais difundidos, diversos trabalhos com SPE vêm sendo realizados com o objetivo de explorar o potencial apresentado pelas sementes e pelo processo de SPE. A Tabela 4 apresenta alguns trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Espectroscopia Aplicada do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando as sementes de *Moringa oleifera* e seus derivados.

Tabela 4. Trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Espectroscopia Aplicada – IQUFU, utilizando *Moringa oleifera* e seus derivados.

Aplicação	Referência
Remoção de flúor em águas	Silva et al., 2006
Remoção de Ag em solução aquosa	Araújo et al., 2010
Pré-concentração e determinação de Ag(I) em soluções aquosas.	Araújo et al., 2010
Pré-concentração e determinação de Cd(II) em etanol combustível	Alves et al, 2010
Uso da torta de <i>M.oleifera</i> para adsorção de BTEX em solução aquosa	Almeida, 2010
Caracterização e uso das sementes de <i>Moringa oleifera</i> como bioadsorvente para remoção de metais em efluentes aquosos	Araújo et al., 2010
Remoção de Manganês em meio aquoso	Marques et al., 2013
Pré-concentração e determinação de Pb em cerveja	Alves et al., 2011
Pré-concentração e determinação de Zn em álcool combustível	Alves et al., 2012
Pré-concentração e determinação de Cu em gasolina	Do Carmo et al., 2013
Pré-concentração e determinação de Zn em amostras de cachaça	Alves et al., 2011
Remoção de Ni em meio aquoso	Marques et al., 2012
Extração Seletiva de Cromo	Alves & Coelho, 2013

Fonte: Alves, 2013.

Os mecanismos de SPE associados à adsorção de íons metálicos por bioadsorventes lignocelulósicos, como a *Moringa oleifera*, ainda não são claros, sendo possível que a adsorção do íon metálico aconteça por processos de troca iônica e complexação, que podem acontecer simultaneamente (ARAÚJO et al., 2013).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR DESI

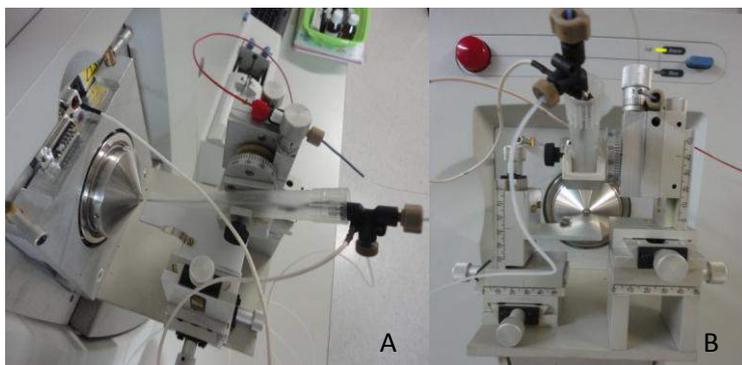
4.1.1. Reagentes

Foram utilizados padrões com alto grau de pureza, sendo que para o estudo das espécies inorgânicas, utilizaram-se os padrões de selenato de sódio (Na_2SeO_4) para Se^{+6} e selenito (Na_2SeO_3) para Se^{+4} . Para o estudo das espécies orgânicas, utilizaram-se os cloridratos de selenometionina, selenocistina e selenometilcisteína (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e metanol de grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha). A água usada em todas as experiências foi produzida por um sistema de purificação de água Milli-Q (Milford, MA, EUA). Todo o material de vidro foi mantido em *overnight* em banho com solução a 10% (v/v) de HNO_3 , antes do uso.

4.1.2. Instrumentação

As análises de especiação foram realizadas em um Espectrômetro de Massas Íon Trap (LCQ Fleet, ThermoScientific, San Jose, CA, EUA), que opera nos modos positivos e negativos. A fonte DESI foi produzida no Laboratório de Cromatografia Espectrometria de Massas, pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rodinei Augusti, da Universidade Federal de Minas Gerais, adaptando uma fonte EASI (LORDEIRO, 2011), sendo acrescentada voltagem ao spray formado, de acordo com a Figura 2.

Figura 5. Fonte DESI, utilizada neste trabalho. (A) Imagem capturada da parte de cima; (B) imagem capturada da parte frontal.



A fonte DESI foi desenvolvida usando os suprimentos e materiais de um Cromatógrafo Líquido. Para operar o sistema, a fonte de Ionização por Electrospray (ESI) foi removida do Espectrometro de Massas (MS) e uma conexão com resistência foi ligada ao MS para fazer com que o dispositivo funcionasse sem a presença da fonte original (LORDEIRO, 2011).

De acordo com Lordeiro (2011), foram utilizados: conector do tipo metálico "T" para o gás de entrada, tensão e solvente; capilar de sílica inerte para conduzir o fluxo para a ponta do solvente; duto metálico (ponta da fonte); condutas de polietileno para condução de N₂; válvulas de controle de entrada de N₂; seringa (500 µl) para o depósito do solvente, conector da bomba automática do MS; sistema de garras e pinças que permitiu o posicionamento e rotação na entrada do MS, otimizando as distâncias e ângulos da fonte DESI com relação a sua base metálica, e permitindo, também, a movimentação nos eixos X, Y e Z para ajustar a placa com a amostra.

Para otimização do equipamento e testes, foram preparadas soluções com os padrões em metanol-água (1:1 v/v), num total de nove soluções testadas, sendo, solução individual das espécies orgânicas: SeMeCys; SeMet; Se(Cys)₂; solução binária: SeMet+SeMeCys, SeMet+Se(Cys)₂, SeMeCys+Se(Cys)₂; solução ternária: SeMet+SeMeCys+Se(Cys)₂, além das soluções das espécies inorgânicas: [HSeO₄]⁻ e [HSeO₃]⁻.

As soluções padrões foram depositadas em uma placa de vidro contendo um papel-filtro fixado com fita dupla-face com área de 1cm², renovados a cada análise. Em todas as análises, o espectro do branco era capturado para descontar o sinal nos espectros das amostras. Durante a análise, foram capturados espectros MS de 0 a 1000 m/z, bem como o MS² e MS³ de cada espécie em estudo, confrontando as relações m/z obtidas com as da literatura.

A seleção da razão m/z do íon de interesse (MS²) e a fragmentação desse íon foram realizadas com todos os padrões para confirmação da “impressão digital” da espécie, para posterior identificação nas amostras. Cada espécie tem um valor de m/z no MS²: [SeMet + H⁺] m/z 198; [SeMetCys + H⁺] m/z 184; [Se(Cys)₂ + H⁺] m/z 334; [HSeO₄ - H⁺] m/z 145 e [HSeO₃ - H⁺] m/z 129. E, após a fragmentação dos íons MS³, cada um obteve um valor característico, que, no caso das espécies orgânicas, ocorreu com a perda de molécula de água de m/z: [SeMet - H₂O] m/z 180; [SeMetCys - H₂O] m/z 166; [Se(Cys)₂ - H₂O] m/z 316. A exceção é para as espécies inorgânicas, pois, de

acordo com Crews et al. (1996), devido à estrutura da molécula ser reduzida, sua capacidade é de perder apenas um íon e de ser detectada no MS².

Para os ajustes dos parâmetros, foi utilizada uma mistura de metanol-água (1:1 v/v) como solução de pulverização, e utilizado padrão de selenometionina a uma pressão fixa do N₂ de 100 psi. As condições gerais avaliadas foram: taxa de fluxo de solução de pulverização (7,0 µL min⁻¹), a tensão aplicada por ionização (2,5 kV) e a temperatura do capilar do MS (250,0°C). Essas condições foram otimizadas de forma univariada, mudando a programação do MS. Com realação à fonte DESI, ajustes dos ângulos foram necessários, e esta foi utilizada com o ângulo da ponteira de 45°, 40 mm de altura e 32 mm para a esquerda.

O spray com a amostra foi colocado junto à entrada do Espectrômetro de Massas. Foram realizadas capturas de espectros em MS² e MS³, selecionando o valor m/z de interesse. Após a seleção do íon de interesse, ocorre colisão com o gás hélio, e as energias de colisão foram ajustadas para produzir íons com intensidades relativas mensuráveis.

4.1.3. Análises de especiação de selênio

Amostras de vegetais foram utilizadas para avaliar a especiação de selênio, usando a fonte DESI como método. Folhas de couve (*Brassica oleracea L.*), dentes de alho (*Allium sativum L.*) e castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) foram obtidos em lojas locais. Essas amostras foram trituradas com um mixer (Mallory, China) antes da análise. As folhas de couve, após trituração, foram dopadas com 20ng de todas as espécies de selênio em estudo, com as soluções dos padrões individuais adicionadas à amostra no momento da análise.

As amostras trituradas foram fixadas em placa de vidro com fita dupla-face (1cm²), sendo que, antes da fixação, o espectro da fita foi capturado para descontar os íons presentes.

Os espectros de massa foram coletados de cada superfície da amostra fixada com fita dupla-face, com a média das capturas realizadas no período de 10 s, sendo 50 leituras por análise. Durante a análise, foram utilizadas energias de colisão de 10-20 para a fragmentação de íons e obtenção MS³ relacionada a cada espécie presente na amostra. Além disso, trabalhou-se com uma variação de m/z ± 2. Foram realizadas

leituras com amostra certificada de folha de espinafre (SRM 1570A), contendo uma concentração de selênio total de $0,117 \pm 0,009 \text{ mg kg}^{-1}$.

4.1.4. Determinação de Se total

Para verificar a presença de selênio nas amostras e quantificar o selênio total, foram realizadas análises no Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS). Para a destruição da matéria orgânica nas amostras, a digestão ácida assistida por microondas foi realizada no equipamento Milestone® Ethos Plus (Soriso, Bergamo, Itália). Cerca de 0,3000 g de amostra de alimento foi pesado com precisão, seguido da adição de 5,0 mL de HNO_3 , 2,0 mL de H_2O e 1,0 mL de H_2O_2 . O programa de digestão ocorreu em duas etapas: (1) 15 minutos a 180°C ; (2) 10 minutos a 180°C . Antes da digestão, as amostras foram condicionadas por 30 minutos à temperatura ambiente para a pré-digestão. As amostras digeridas foram transferidas para frascos volumétricos e o volume foi levado a 25,0 mL com água Milli-Q.

Todos os experimentos foram realizados em um Espectrômetro de Absorção Atômica Varian AA 240Z, equipado com atomizador eletrotérmico em forno de grafite GTA 120, auto-amostrador acoplado PSD 120, e corretor de radiação de fundo não específico (background) por efeito Zeeman. Todas as medidas de leitura foram obtidas por meio de absorbância pela integração da área do sinal transiente. Como fonte de radiação, utilizou-se lâmpada de cátodo oco de Se ($\lambda = 196,0 \text{ nm}$), operando de acordo com as condições recomendadas. Tubos de grafite com revestimento pirolítico, com plataforma de L'vov inserida (Part N°: 63-100037-00; Batch N°: 101816924) e com modificador permanente de Pd+Ni, foram utilizados como atomizadores eletrotérmicos. O volume total de amostra injetada foi de 20 μL em todos os experimentos.

Os parâmetros instrumentais seguiram as recomendações do fabricante e são apresentados na Tabela 5. O programa de temperatura também seguiu o recomendado, com excessão das temperaturas de pirólise e atomização, que foram realizadas de acordo com Stripeikis et al. (2004). Como gás inerte, utilizou-se argônio de alta pureza (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil).

Tabela 5. Programa de aquecimento do GFAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de espera (s)	Vazão Ar (mL min ⁻¹)
Secagem	80	30	-	0
Secagem	120	20	-	250
Pirólise	1000	10	10	250
Pirólise	1000	-	5	0
Atomização	2100	-	5	0
Limpeza	2400	-	2	250

Fonte: Stripeikis et al. (2004).

Para as curvas de calibração, as concentrações-padrão de Se foram 1,0-100,0 µg L⁻¹. O Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) foram determinados de acordo com o INMETRO (2011).

4.2. ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR SPE

4.2.1. Reagentes

Todas as soluções utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram preparadas com reagentes químicos de grau analítico, utilizando água deionizada, proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® da Gehaka, (São Paulo, Brasil).

As soluções de trabalho de Se⁺⁶ foram preparadas, diariamente, a partir de uma solução do sal Na₂SeO₄, em meio de HCl (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Para o Se⁺⁴, as soluções de trabalho foram obtidas a partir do sal Na₂SeO₃ (Sigma Aldrich, Estados Unidos), com grau de pureza de 99,9%. As soluções utilizadas para geração de hidreto foram realizadas com todo critério analítico. Para o agente redutor, dissolveu-se NaBH₄ (Merck, Alemanha), utilizando estabilizante NaOH 0,5% (m/v) (Vetec, Brasil); para HCl, prepararam-se as soluções a partir do reagente HCl 36,5-38% (Merck, Alemanha).

As soluções dos três pré-redutores utilizados para reduzir Se⁺⁶ a Se⁺⁴ foram preparadas pela dissolução de L-cisteína (Synth, Brasil) em água, KI (Vetec) em água, e Tioureia (Synth) em HCl 1% (v/v).

Para todos os testes de otimização, que foram realizados de forma univariada, foi utilizada balança analítica. Para os parâmetros de detecção, foram otimizadas as concentrações do sistema de Geração de Hidreto (concentração de NaBH₄ e HCl). Em seguida, foram determinados os parâmetros que poderiam influenciar os estudos de

adsorção, na seguinte sequência: ponto de carga zero, concentração de tiosemicarbazida para impregnação, estudo do pH, massa de adsorvente, adicionando 25,0 mL de solução padrão a $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$, podendo ser de Se^{+4} ou Se^{+6} .

4.2.2. Instrumentação

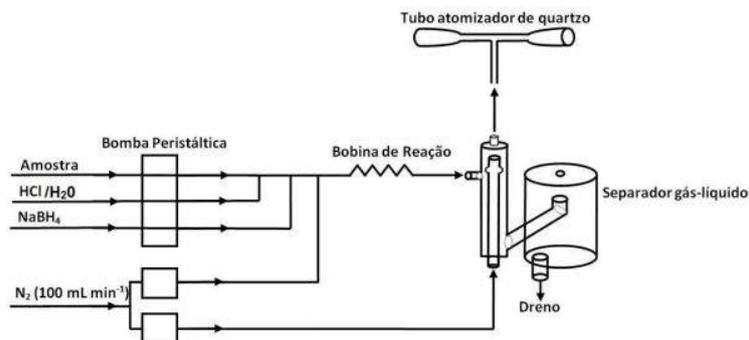
Para impregnação da tiosemicarbazida e caracterização das sementes da *Moringa oleifera*, foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios: Balança Analítica - Analytical Standard - Modelo Ohaus (OHAUS, Florham Park, USA); Espectrômetro de Infravermelho - Modelo IR. Prestige - 21 (Shimadzu, Tóquio, Japão); Analisador Termogravimétrico - Metler Toledo TGA/SDTA; Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X, modelo EDX-700 (Shimadzu, Tóquio, Japão); Liquidificador Industrial - Modelo: Bermar Indústria e Comercio LTDA; Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo JMT-300 (JEOL, Tóquio, Japão) e Peneiras TYLER (Bertel - Ind. Metalúrgica Ltda, Caieiras-SP, Brasil).

Todas as determinações de selênio foram feitas em Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama Modelo SpectrAA-220 (Varian®, Victoria, Austrália), equipado com acessório de Geração de Hidretos modelo VGA 77 (Varian®, Victoria, Austrália), onde foi usada a vazão do gás de arraste (N_2) de 100mL min^{-1} .

O sistema de Gerador de Hidretos é composto por uma bomba peristáltica que serve para a introdução das soluções e da amostra no separador gás-líquido. As soluções de NaBH_4 , HCl e as amostras contendo selênio são introduzidas, pela bomba, em diferentes linhas e, posteriormente, se encontram em uma bobina de reação, onde as soluções entram em contato e reagem. Nesse momento, o hidreto de selênio é formado (SeH_2), desprendendo-se da matriz na forma de gás, e é levado pelo gás de arraste (N_2) até a cela de quartzo que fica sob a chama de ar-acetileno do FAAS para atomização. A parte da amostra líquida é drenada para o descarte. A Figura 6 apresenta o esquema geral do sistema para determinação de Se^{+4} e Se total.

Para as determinações, o Espectrômetro de Absorção Atômica utiliza lâmpada de cátodo oco de Se ($\lambda = 196,0 \text{ nm}$) - marca Varian®, Victoria, Austrália; para correção de sinal de fundo, foi empregada uma lâmpada de deutério; a chama é composta da mistura de ar-acetileno; vazão de ar $13,5 \text{ L min}^{-1}$ e vazão de acetileno $2,0 \text{ L min}^{-1}$.

Figura 6. Esboço do sistema utilizado para a determinação de Se^{+4} e Se total.



Fonte: Manual do equipamento.

O sistema de Geração de Hidretos é constituído de Bomba Peristáltica Gilson[®] Minipuls 3 (Villiers Le Bel, França), equipada com 8 canais; Tubos Tygon[®] de polietileno; Cilindro de 10 m³ de nitrogênio; Cella de quartzo em formato de T (13,5 cm de comprimento e 15 mm de diâmetro externo), aquecida em chama.

4.2.3. Coleta e preparo das sementes de *Moringa oleifera*

A coleta das sementes de *Moringa oleifera* foi realizada na cidade de Uberlândia-MG. Essas sementes, mantidas integrais, foram lavadas três vezes com água deionizada e secas ao ar durante 8 horas. Posteriormente, as sementes integrais foram trituradas com a utilização de um liquidificador industrial, e peneiradas até a obtenção de partículas com tamanho $\leq 55 \mu\text{m}$. Esses foram os materiais utilizados durante todo o procedimento de caracterização. Desse material, uma parte foi separada para a impregnação da superfície da *Moringa oleifera* com reagente tiosemicarbazida.

4.2.4. Preparo da *Moringa oleifera* impregnada

Para a impregnação da *Moringa oleifera in natura*, 20,0000 g da massa já triturada foi pesada, e uma solução de tiosemicarbazida foi preparada na concentração de 0,01 mol L⁻¹ e acrescentada à massa da *Moringa oleifera in natura*. Em seguida, a mistura foi agitada por uma hora. Posteriormente, a solução foi filtrada a vácuo. A *Moringa oleifera* foi colocada na estufa para secar a 45°C, durante 24 horas.

4.2.5. Caracterização da *Moringa oleifera* impregnada

Foi realizada caracterização físico-química da semente de *Moringa oleifera* impregnada com reagente tiosemicarbazida, e, para dar apoio à pesquisa e comparar as características físico-químicas e as mudanças após a impregnação, foi realizada também a caracterização da semente de *Moringa oleifera in natura*.

A identificação dos grupos funcionais foi realizada por Espectroscopia de Infravermelho na Região Média, sendo que as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr na proporção 100:1 e irradiadas a uma faixa de 4000 a 1000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por amostra.

Para obtenção das micrografias, foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM). O procedimento consistiu na incidência de um feixe de elétrons com voltagem de 20 kV sobre a amostra coberta com um filme de ouro. O uso conjunto da Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) com o SEM é de grande importância na elucidação dos materiais. Enquanto SEM proporciona nítidas imagens, o EDX permite sua imediata identificação de forma qualitativa. Além da identificação, o equipamento ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos presentes no material analisado, gerando mapas composicionais de elementos desejados.

A distribuição do volume dos poros foi determinada a partir das isotermas de adsorção e dessorção do nitrogênio pelo método BET; as análises foram conduzidas em um aparelho Micromeritics ASAP 2010.

A metodologia empregada para avaliação do ponto de carga zero (PCZ) consistiu em misturar 50,0 mg da biomassa com 50,0 mL de solução aquosa, sob diferentes condições de pH inicial (1,0-12,0), e determinar o pH após 24 horas de equilíbrio. As soluções com pH em faixa ácida foram feitas a partir de diluições de HCl 1,0 mol L^{-1} , e as de $\text{pH} > 7,0$ a partir de diluições da solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} .

Esse parâmetro conhecido como pH no ponto de carga zero (PCZ) é importante quando se deseja investigar o desempenho de certo material sólido como adsorvente de cátions e ânions. O ponto de carga zero foi de grande valia para a elucidação do material, uma vez que os resultados do PCZ indicam a carga em que o adsorvente se encontra.

4.2.6. Estudos da remoção seletiva de Se⁺⁴

4.2.6.1. Estudo do pH

A fim de averiguar se o ajuste do pH inicial da solução contendo o analito é suficiente para separação das espécies, o efeito do pH inicial da solução na separação das espécies inorgânicas de selênio foi avaliado. Inicialmente, 100,0 mL de solução contendo, separadamente, os íons Se⁺⁴ e Se⁺⁶ na concentração de 100,0 mg L⁻¹, com pH na faixa de 1,0 a 12,0 ajustado com HCl ou NaOH 0,1 mol L⁻¹ foram colocados em agitação com 1,0 g das sementes de *Moringa oleifera* com tiosemicarbazida. Após filtração, o sobrenadante foi diluído com quantidades adequadas de água deionizada e a concentração final, medida por HGAAS. A porcentagem de adsorção foi calculada com base nas diferenças das concentrações iniciais e finais.

4.2.6.2. Teor de tiosemicarbazida impregnada na *Moringa oleifera*

Para melhor avaliação da superfície da *Moringa oleifera* impregnada com o reagente tiosemicarbazida, foram feitos estudos nos quais se variou a concentração do reagente impregnado. Foi testada uma faixa de 0,01 a 0,5 mol L⁻¹ de solução de tiosemicarbazida, com o objetivo de determinar qual a melhor concentração para impregnação na *Moringa oleifera in natura*.

4.2.6.3. Parâmetros que afetam a adsorção

De posse do pH, onde a separação das espécies ocorre, as variáveis que podem afetar a adsorção do íon foram avaliadas pelo método univariado, sendo elas: tempo de agitação e massa do adsorvente.

Para avaliação da massa de *Moringa oleifera*, variou-se a massa do adsorvente entre 0,1000 a 2,0000 g, enquanto que para avaliação do tempo de agitação, variou-se o tempo entre 5 e 120 minutos. As condições utilizadas em ambos os experimentos foram: granulometria 500 µm; volume de solução 10,0 mL; tempo de agitação 60 minutos; pH=7,0 e concentração da solução de íons Se⁺⁴ igual a 25 µg L⁻¹.

4.2.6.4. Isoterma de Adsorção

O procedimento de construção das isotermas de adsorção permite verificar, graficamente, a quantidade máxima em gramas do adsorvato que pode ser adsorvida numa dada massa de adsorvente (ALVES, 2013).

O experimento foi feito usando 50,0 mg de sementes trituradas de *Moringa oleifera* modificada com reagente tiosemicarbazida, que foi agitada durante 1 hora com 50 mL de soluções de íons Se^{+4} em concentrações de 0,2 a 100,0 mg L^{-1} . Foram mantidos pH=3,5 e tempo de 60 minutos. Após a agitação, a mistura foi filtrada e o sobrenadante, diluído com água deionizada e analisado pelo HGAAS, durante a realização de todo o procedimento.

A isoterma foi obtida lançando-se, no eixo da abscissa, a concentração do sobrenadante, ou seja, a concentração de equilíbrio do adsorvato - C_e (mg L^{-1}), e, no eixo da ordenada, a quantidade do metal adsorvido (mg) pela massa do adsorvente - Q_e (mg g^{-1}).

4.2.6.5. Otimização da determinação de selênio

Com o intuito de se obter o melhor sinal analítico para aumentar a sensibilidade na detecção dos íons de Se^{+4} , foram estudadas as variáveis do sistema de HG que podem interferir na absorvância. As variáveis estudadas foram a concentração do HCl, a concentração do NaBH_4 , e os pré-redutores para reduzir Se^{+6} a Se^{+4} : L-cisteína, tiourea ou HCl. Esse estudo foi realizado de forma univariada, utilizando uma solução de Se^{+4} 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.6.6. Estudos de interferentes

O efeito dos íons Se^{+6} , As^{+3} , As^{+5} , Ca^{+2} , Na^+ , Cl^- e PO_4^{3-} foram avaliados, a fim de checar se esses íons interferem na adsorção de Se^{+4} . Os íons foram escolhidos devido a sua presença em águas e, no caso do As, devido a sua copresença com o selênio, ou seja, onde há selênio pode haver As junto.

Para testar a seletividade do método analítico desenvolvido, foi feito o estudo de interferentes para avaliar o comportamento de possíveis íons que possam interferir no

sistema, tanto na adsorção, como no momento da análise. Tal procedimento é realizado com o intuito de se obter informações sobre a aplicabilidade do método para diferentes tipos de amostras.

O fator de interferência, FI, é definido pela equação (4):

$$FI = A'/A \quad (4)$$

Onde A' é o valor do sinal analítico relativo à solução de Se^{+4} na presença do possível interferente, e A é o sinal analítico relativo à solução do analito na ausência do possível interferente.

4.2.6.7. Parâmetros Analíticos Avaliados

A linearidade, que é a capacidade de um método analítico gerar sinais proporcionais à concentração de uma substância em análise, é avaliada por meio da análise de padrões que abrangem a faixa de concentração de interesse, gerando uma curva de calibração (INMETRO, 2011).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida. O LD e o LQ foram estimados através das medidas de branco ($n = 10$), conforme descrito na literatura (INMETRO, 2011).

Para avaliar a exatidão do método, testes foram executados em amostras de água mineral comercial. A exatidão do método proposto para determinação de Se^{+4} e Se total foi verificada a partir da análise de amostras de água mineral, fortificadas com solução padrão de Se^{+4} e Se^{+6} de $10,0 \mu g L^{-1}$. Também foram realizados testes de recuperação pelo método da adição de padrão. O teste de recuperação é especialmente apropriado quando a composição da amostra é desconhecida ou complexa e afeta o sinal analítico.

Na adição de padrão, quantidades conhecidas do elemento de interesse são adicionadas à amostra desconhecida. A partir do aumento do sinal, deduzimos quanto deste elemento estava presente na amostra original, sendo o sinal diretamente proporcional à concentração do elemento de interesse (HARRIS, 2012).

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e preparadas no Laboratório de Espectroscopia Analítica – LEA, da Universidade Federal de Uberlândia. Foi analisada

água mineral obtida no comércio da cidade de Uberlândia, e feito o teste de recuperação. Para as análises, as amostras foram enriquecidas com concentração de selênio de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, determinando-se suas recuperações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR DESI

5.1.1. Análise das soluções padrões

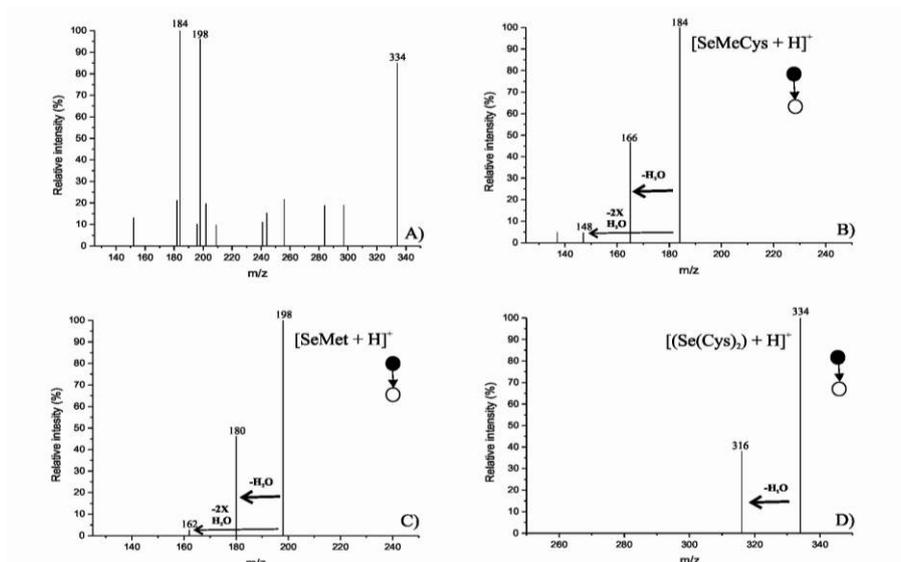
Inicialmente, as análises foram realizadas com a captura de espectros, no modo de varredura completa, em uma faixa de massa de m/z 100-400. Os espectros foram adquiridos em ambos os modos de íons positivos e negativos do MS, pois, as espécies orgânicas, após colisão, formavam íon com carga positiva, e as espécies inorgânicas, íons com carga negativa.

Em experimentos no modo positivo, próprio para detecção de espécies que produzem carga positiva, foram capturados espectros com cada solução padrão - espécies orgânicas individuais: SeMeCys; SeMet; Se(Cys)₂; solução binária: SeMet+SeMeCys, SeMet+Se(Cys)₂, SeMeCys+Se(Cys)₂, e solução ternária: SeMet+SeMeCys+Se(Cys)₂.

O espectro de massa, resultante da análise da mistura ternária, é apresentado na Figura 7A. As formas protonadas dos compostos de selênio [SeMet + H]⁺ de m/z 198, [SeMeCys + H]⁺ de m/z 184 e [Se(Cys)₂ + H]⁺ de m/z 334 são distinguidas nesse espectro de massa.

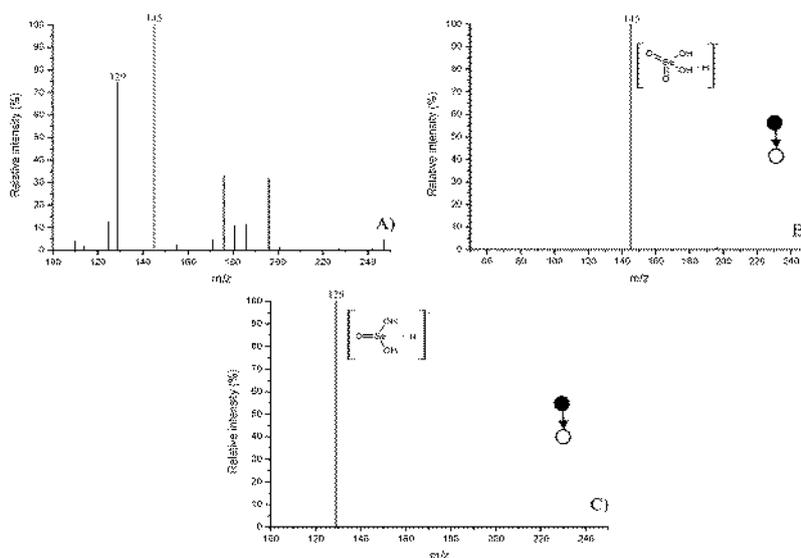
Para ter acesso aos caminhos de fragmentação, os dados MS² também foram registrados para cada íon referente ao padrão. Íons do produto de m/z 166 (Figura 7B), m/z 180 (Figura 7C) e m/z 316 (Figura 7D) são provenientes da perda de uma molécula de água a partir de cada íon pai, respectivamente, verificando-se que esse tipo de perda (-H₂O; -18 m/z), após a colisão, é favorecida em todos os casos.

Figura 7. (A) Espectro MS com a mistura ternária (SeMeCys+ SeMet + Se (Cys)₂) (25 ng de cada composto); e espectro MS² dos íons-filho: (B) [SeMeCys + H]⁺ m/z 184; (C) [SeMet + H]⁺ m/z 198; (D) [(Se(Cys)₂) + H]⁺ m/z 334.



O modo negativo do MS foi escolhido por ser mais adequado para a detecção das espécies de selênio inorgânico. O espectro MS² das soluções das espécies inorgânicas [HSeO₄]⁻ e [HSeO₃]⁻ (Figura 8A), de uma mistura de SeO₄⁻² e SeO₃⁻² (25 ng de cada padrão) colocada sobre uma lâmina de vidro, exibe a presença de ânions de m/z 145, correspondendo a [HSeO₄]⁻, e m/z 129 em relação ao [HSeO₃]⁻.

Figura 8. (A) Espectro MS da mistura binária composta de Se⁺⁴ e Se⁺⁶ (25 ng de cada composto). Espectro MS² dos íons: (B) [HSeO₄]⁻ m/z 145; (C) [HSeO₃]⁻ m/z 129.



A seleção de massas e a fragmentação desses ânions (Figuras 8B e 8C, respectivamente) não produziram íons-filho, devido à estrutura da molécula; o fornecimento de alta energia de colisão pode decompor a molécula perdendo sua “impressão digital” (CREWS et al., 1996). O mesmo foi observado nos estudos de Crews et al. (1996), que analisaram esses íons de selenito e de selenato em extratos gastrointestinais no modo negativo, validando a presença de tais íons com m/z 129 e 145, respectivamente.

5.1.2. Otimização dos parâmetros

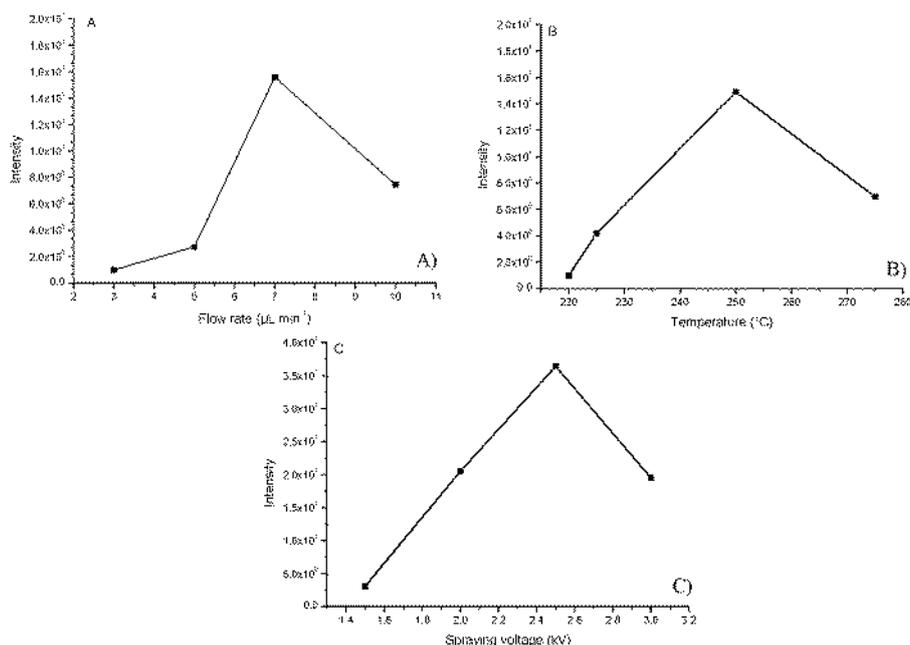
Para otimização do método DESI-MS, foi utilizada uma solução de selenometionina, usando MS na transição: m/z 198-180. Para melhorar a sensibilidade de detecção de DESI para especiação de selênio, utilizamos o método seguido por Lin et al. (2010). Usamos o MS^2 como uma maneira de aumentar a relação sinal-ruído (s/n) e como uma forma de análise da estrutura, devido à baixa resolução, reduzindo, significativamente, a interferência e níveis de ruído a partir da matriz.

Para a confirmação de cada composto de selênio, foi utilizado um modo típico de MS/MS: no modo positivo, o SeMet m/z 198 com o seu fragmento de 180, SeMeCys m/z 184 com o seu fragmento de 166 e Se(Cys)₂ m/z 334 com o fragmento de m/z 316. No entanto, no modo negativo, devido à ausência de geração de fragmento, foi usada apenas a seleção de MS^2 para o cálculo do Limite de Detecção (LD).

Os valores de partida foram determinados de acordo com parâmetros de análises do próprio equipamento. Assim, de acordo com esses valores, foi realizada uma otimização univariada dos três principais parâmetros. Os valores de partida foram: temperatura de 250°C e fluxo de 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os valores das otimizações são apresentados na Figura 9.

Os efeitos de alguns parâmetros típicos DESI, tais como solvente (metanol: água 1:1 v/v), velocidade de fluxo (3,0-10,0 mL min^{-1}), temperatura do capilar (220-275 °C) e tensão de pulverização (1,5 – 3,0 kV), sobre a resposta foram avaliados. As experiências foram conduzidas, registrando-se os espectros de massa no modo positivo, e analisando a SeMet (25,0 ng) depositada sobre uma superfície do papel, frente à medição da intensidade absoluta de íon de m/z 198, $[\text{SeMet} + \text{H}]^+$ (resposta) (Figura 9).

Figura 9. Otimização univariada dos parâmetros típicos de uma fonte DESI: (A) fluxo do solvente (metanol: água 1:1 v/v), (B) temperatura do capilar e (C) voltagem do spray.



O fluxo do solvente de pulverização mostrou um efeito significativo sobre a intensidade do sinal (Figura 9A), o que é consistente com os dados anteriormente relatados (CASIOT et al., 1999). A maior intensidade do sinal foi atingida por um caudal de $7,0 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Temperatura do capilar (Figura 9B) e tensão (Figura 9C) mostraram ter um efeito mais pronunciado sobre a resposta. Assim, a intensidade máxima do sinal foi observada: para a voltagem de pulverização, o valor obtido foi 2,5 kV, e a temperatura do capilar foi 250°C .

5.1.3. Limite de Detecção

O modo de MS^2 foi aplicado com o propósito de determinar o Limite de Detecção (LD) do MS para cada espécie de selênio em estudo. Os LD foram obtidos por meio da verificação da menor quantidade de cada composto de selênio depositado numa superfície de papel-filtro fixado por fita dupla-face em uma placa de vidro. O espectro do papel com a fita dupla-face era capturado antes da adição do padrão; em seguida, o padrão era adicionado de 1 em $1 \mu\text{L}$ até que atingisse quantidade suficiente para se obter intensidades mensuráveis de um determinado íon (MS^2) e os seus íons-filho (MS^3), para confirmação da espécies.

Para evitar falsa determinação, foram utilizadas várias transições de fragmentação selecionadas (LIN et al., 2010). O LD era de 15 pg/cm² para SeMet durante o processo de DESI, no modo positivo m/z 198-180. O LD para MeSeCys foi de 10 pg/cm², para a transição m/z 184-166. Por outro lado, o LD de Na₂SeO₃ e Na₂SeO₄, MS, operando no modo negativo, foi estimado como sendo de 15 pg/cm² e 10 pg/cm², respectivamente. Desvio padrão relativo (RSD) <4,6% (*n* = 4) foi obtido por essas medições.

Apesar do LD relativamente baixo quando comparado a outras técnicas, como, por exemplo, a HPLC-ICP-MS (Tabela 1), DESI oferece vantagens para a análise de especiação elementar, devido à mínima manipulação da amostra. Apesar da não quantificação das espécies, a técnica utilizada fornece informações sobre a presença dos elementos nas amostras, sendo que, em algumas situações nas quais basta saber se há ou não a espécie, DESI pode ser útil e rápida na obtenção da informação.

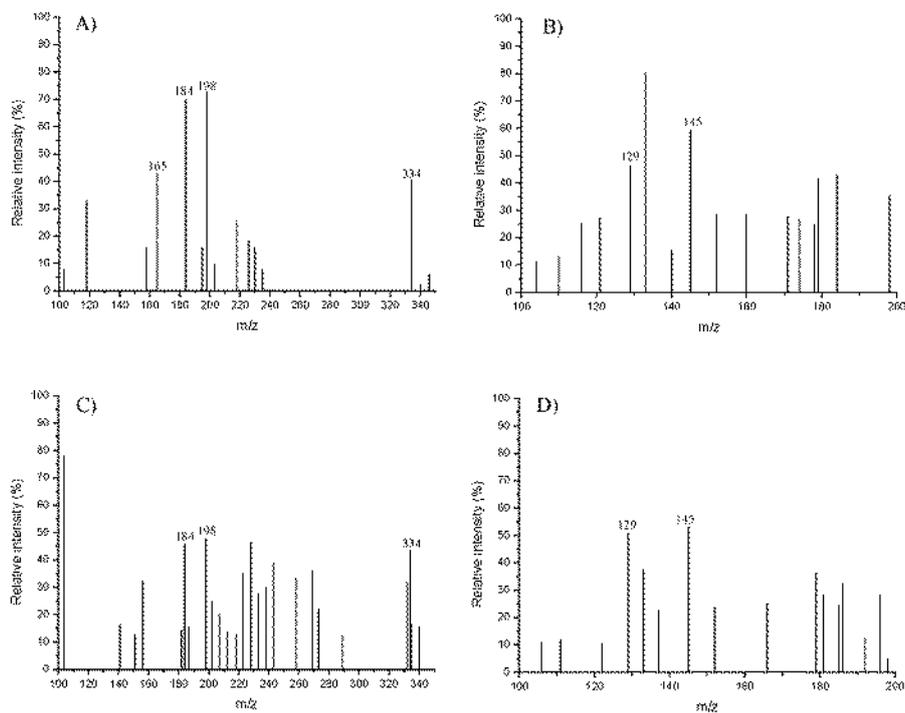
5.1.4. Desempenho do método e aplicação a amostras reais

O desempenho do método foi avaliado por análise de dois tipos distintos de amostras de vegetais: (a) folha de couve dopada com 20 ng de cada um dos padrões de selênio em estudo e (b) amostra certificada de folha de espinafre (NIST SRM 1570A), contendo 0,117 mg Kg⁻¹ de Se total. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 10.

Assim, no espectro obtido para couve (modo positivo: Figura 10A; modo negativo: Figura 10B) e espinafre (modo positivo: Figura 10C; modo negativo: Figura 10D), verifica-se a presença dos íons de interesse [SeMet + H]⁺ de m/z 198, [SeMeCys + H]⁺ de m/z 184 e [Se(Cys)₂ + H]⁺ de m/z 334, e também pode ser vista a presença dos inorgânicos [HSeO₄]⁻ e [HSeO₃]⁻. O conjunto de dados MS² confirma a ocorrência de todas as espécies de selênio orgânico na amostra de couve dopada. Todos os registros MS² tiveram comportamento semelhante aos observados para os padrões (Figura 7).

Esses conjuntos de resultados confirmaram, assim, a aplicabilidade do presente método na detecção de compostos de selênio em matrizes complexas de vegetais, confirmando que DESI pode ser utilizada para promover uma análise de especiação de selênio, com mínimo de manipulação da amostra. As amostras reais de alho e castanha, que são bem conhecidas por possuir teores elevados de selênio, também foram analisadas.

Figura 10. Espectros obtidos da couve (modo positivo Figura A e modo negativo Figura B) e espinafre (modo positivo: Figura C e modo negativo: Figura D).



As Figuras 11A e 11B mostram espectro MS nos modos positivo e negativo, respectivamente, de uma amostra de castanha-do-pará. Os íons diagnosticados para as espécies orgânicas (m/z 184 para SeMeCys, m/z 198 para SeMet e m/z 334 para o Se(Cys)₂) e inorgânicas (m/z 145 para SeO₄²⁻ e m/z 129 para SeO₃²⁻) são claramente reconhecidos nesses espectros de massa.

A presença de espécies orgânicas de tais amostras pode ser definitivamente confirmada pelos dados de MS/MS, e o perfil de fragmentação de cada íon progenitor mostrado é muito semelhante aos observados para os respectivos padrões na Figura 7. Resultados semelhantes também foram obtidos quando uma amostra do alho foi analisada em DESI, em ambos os modos de íons positivos e negativos, como apresentado na Figura 12. Os resultados globais, incluindo os dados MS², permitiram, assim, uma especiação dos compostos de selênio no alho.

Figura 11. Espectros obtidos da amostra de castanha-do-pará (modo positivo: Figura A; modo negativo: Figura B).

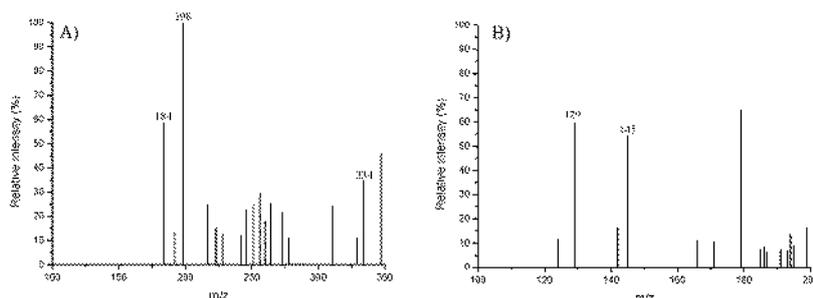
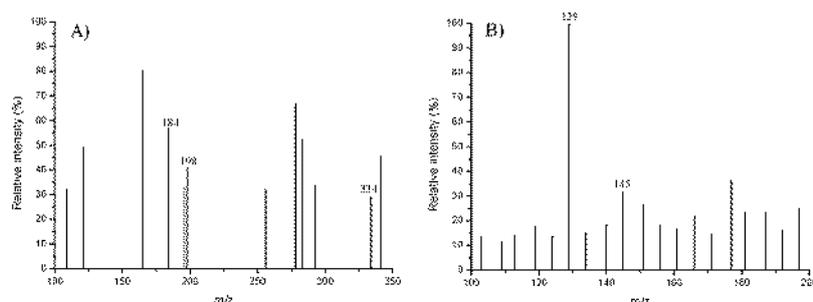


Figura 12. DESI obtido das amostras de alho (modo positivo: Figura A; modo negativo: Figura B).



Nessas avaliações, observou-se a ocorrência de interferências que podem afetar a qualidade de análise; no entanto, foi feito um processo de leitura do branco (o solvente apenas na fita dupla-face) entre cada amostra analisada. Além disso, uma contaminação excessiva do capilar do Espectrômetro de Massa forneceu dificuldades para realizar a quantificação confiável em amostras reais. Foi necessário o cuidado de lavar o capilar com metanol: água (1:1) num banho de ultrassons, durante 30 minutos, a 60°C em cada passo.

5.1.5. Determinação de Se total

O teor total de Se nas amostras foi determinado por GFAAS, para confirmar a presença de selênio em todas elas. Nos resultados, foi comprovada a presença de selênio em folhas de couve fortificadas ($0,083 \pm 0,02$ mg Se kg^{-1}), alho ($0,028 \pm 0,01$ mg Se kg^{-1}) e castanhas-do-pará ($0,171 \pm 0,02$ mg Se kg^{-1}). Folhas de espinafre do material certificado (SRM 1570A) também foram analisadas para verificar a exatidão e a precisão do método. O teor obtido foi próximo ao da amostra certificada ($0,112 \pm 0,01$

mg Se kg⁻¹); a recuperação foi de 96%. É importante lembrar que os resultados apresentados estão na matéria seca, e não como amostra fresca como na DESI (75% de água).

5.2. ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO POR SPE

5.2.1 Caracterizações da *Moringa oleifera* impregnada

O bioadsorvente após a modificação permanece com o mesmo aspecto e mesma granulometria do material in natura. A Figura 13 apresenta a característica da *Moringa oleifera* in natura e após a modificação.

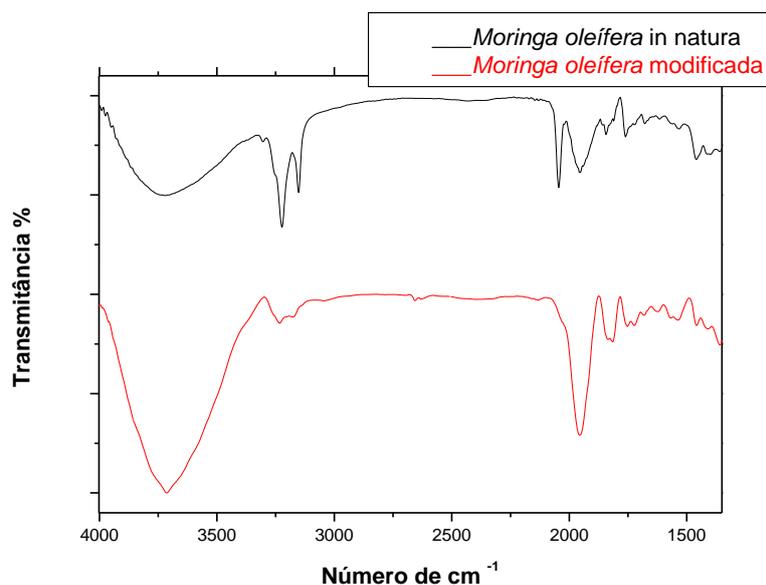
Figura 13. (A) *Moringa oleifera* triturada sem impregnação; e (B) após a impregnação com a tiosemicarbazida.



Para identificação dos grupos funcionais presentes na superfície do material, realizou-se a análise de infravermelho. A espectroscopia do infravermelho é uma técnica usada para contribuir na elucidação do material modificado, que é aplicada como ferramenta para identificar grupos funcionais que possam estar presentes no bioadsorvente. Segundo Araújo et al. (2013), a adsorvidade dos metais pelo bioadsorvente depende diretamente da composição química de sua superfície, onde é possível encontrar grupos funcionais ativos que adsorvem o analito.

Podem ser observados, na Figura 14, os principais grupos funcionais da *Moringa oleifera* in natura e da modificada, cujas diferenças de espectros são notáveis.

Figura 14. Espectro de Infravermelho Médio da *Moringa oleifera* *in natura* e após impegnação com tiosemicarbazida.



Os resultados de FT-MIR obtidos nesse estudo com as sementes de *Moringa oleifera in natura* confirmam estudos anteriores realizados pelo grupo (ARAÚJO et al., 2010; ALVES, 2013). Foi constatado que uma banda larga centrada em 3420 cm^{-1} , atribuída ao estiramento OH, aparece, predominantemente, na proteína e no ácido graxo. Além disso, a proteína presente nas sementes também contribui no estiramento N-H de grupos amida. O estiramento C-H do grupo CH_2 , atribuído ao simétrico e assimétrico (2923 cm^{-1} e 2852 cm^{-1}), está presente em ácidos graxos. Três bandas intensas são atribuídas ao estiramento da ligação C=O ($1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), que é observado também nas estruturas de proteínas.

No entanto, outras bandas também foram associadas aos grupos dos ácidos graxos (1740 e 1715 cm^{-1}) e ao grupo amida na proteína (1658 cm^{-1}). A presença de um pico a 1587 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-N e/ou C-S de deformação assimétrica.

Para a estrutura da *Moringa oleifera* impregnada com reagente tiosemicarbazida, é observado, ainda na Figura 14, estiramento N-H na região de $3750\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$, o que confirma a presença do grupo funcional amina, e a sua deformação angular é observada a $1750\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$. No que diz respeito à deformação assimétrica da ligação C=S (1800 a 1600 cm^{-1}), esta também é confirmada pelo espectro.

Para melhor elucidação da caracterização do bioadsorvente impregnado com reagente tiosemicarbazida é que se fez uso da técnica EDX. Com essa ferramenta de

análise, foram obtidos resultados a fim de identificar e aferir os elementos químicos presentes no bioadsorvente, tanto *in natura*, como impregnado. O uso dessas análises é importante para determinar a porcentagem de cada espécie dentro da amostra (MARTINELLI et al., 2006). A Figura 15 apresenta a porcentagem em peso dos principais elementos constituintes das sementes de *Moringa oleifera in natura* e da impregnada com reagente tiosemicarbazida.

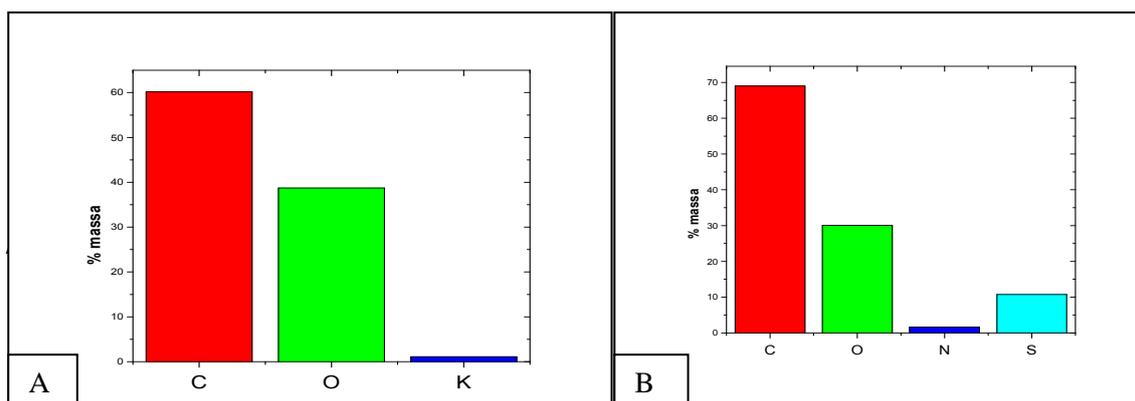


Figura 15. Estudo do EDX feito com o material bioadsorvente, (A) *Moringa oleifera in natura*; (B) impregnada com reagente tiosemicarbazida.

Os sinais de raios-X, característicos dos elementos que os geraram, propiciam informações qualitativas e quantitativas da composição elementar da amostra analisada (SOARES, B. M. C.; SARON, E. S., 2010). Na Figura 15A, é observado que, na *Moringa oleifera in natura*, é notável a presença predominante de C, O e K, estando estes na composição do bioadsorvente, e sendo constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (ARAÚJO, 2009). Já para a Figura 15B, é observado, além de C e O, que também estão presentes na composição da tiosemicarbazida, o nitrogênio e o enxofre, o que vem a comprovar a presença de uma superfície modificada com o reagente.

Esses dados da Figura 15B comprovam a existência de enxofre e de nitrogênio na estrutura da tiosemicarbazida $\text{NH}_2\text{-NH-C(S)-NH}_2$ utilizada na modificação de *Moringa oleifera*. Além disso, observou-se que a quantidade de carbono aumenta *Moringa oleifera* na análise para o bioadsorvente modificado, o que também confirma a existência de impregnação do reagente sobre a superfície de *Moringa oleifera*.

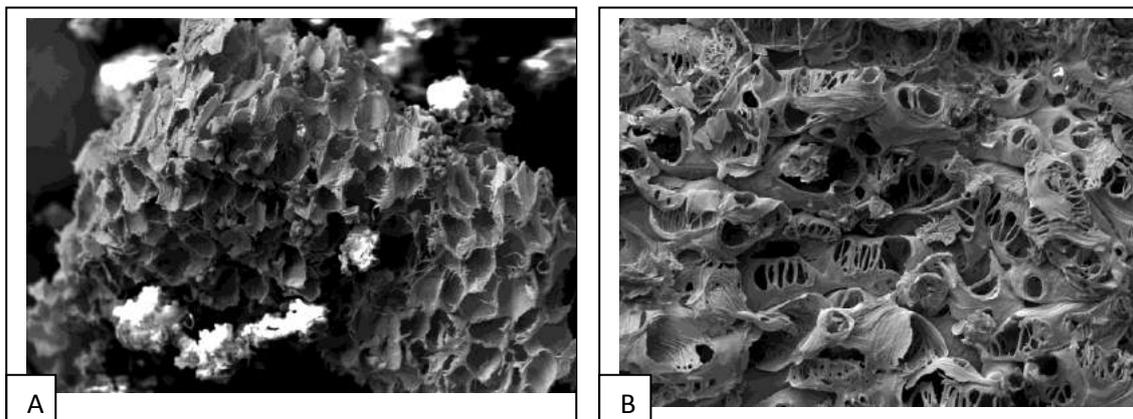
O material de estudo deste trabalho foi avaliado, também, por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura

(JEOL JMT -300), a fim de comprovar as análises de EDX que indicam uma mudança no material. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro, e uma voltagem de aceleração de 20 kV foi aplicada. O SEM é amplamente utilizado na investigação da microestrutura superficial de materiais importantes, como metais, polímeros, vidros, cerâmicos, celulósicos e alimentos, destacando-se quando é possível realizar análise química elementar na amostra em observação (SOARES, B. M. C.; SARON, E. S., 2010).

Para a análise do SEM, as micrografias eletrônicas de varredura das sementes de *Moringa oleifera in natura* e da modificada com a tiosemicarbazida são apresentadas na Figura 16, e diferenças foram encontradas em sua superfície. A morfologia desse material mostra uma matriz heterogênea e relativamente porosa. Essa estrutura facilita os processos de adsorção dos íons, devido aos interstícios e à presença do componente de proteína da semente (ARAÚJO, 2013). Assim, com base nessas características, pode-se concluir que este material tem um perfil morfológico adequado para a retenção de íons.

A partir da imagem obtida através do SEM, é possível perceber uma diferença na estrutura da superfície do bioadsorvente *in natura* quando este é comparado ao bioadsorvente após processo de impregnação com a tiosemicarbazida. Na Figura 16B, a *Moringa oleifera* modificada apresenta poros menores em relação ao apresentado pela *Moringa oleifera in natura* na Figura 16A.

Figura 16. Imagem de SEM, (A) *Moringa oleifera in natura*; (B) *Moringa oleifera* modificada com reagente tiosemicarbazida. Aumento de 500 vezes e escala de 20µm.



Esses resultados demonstram que ocorreu uma mudança significativa na superfície do bioadsorvente para remoção de íons de selênio. Com o intuito de avaliar a

diferença de poros observada visualmente pelo SEM, foram feitas análises pelo BET. Esse método consiste na adsorção física de um gás inerte (N_2), na temperatura de condensação de tal gás ($-196^\circ C$ para (N_2)).

Por meio da isoterma de adsorção, é possível a determinação de informações sobre as propriedades texturais do material, como área superficial, volume e distribuição do tamanho de poros. Dentre essas propriedades, uma das mais importantes é a área superficial, uma vez que a reação ocorre sobre esta superfície. A Tabela 6 apresenta os dados obtidos para a *Moringa oleifera in natura* e para a modificada com o reagente tiosemicarbazida.

Tabela 6. Dados obtidos da técnica de BET.

<i>Moringa oleifera</i>	Área Superficial (m^2/g)	Volume do Poro (cm^3/g)	Tamanho do Poro (nm)	Classificação
<i>In natura</i>	0,6506	0,001541	9,46670	Mesoporo
Modificada	1,2304	0,001636	5,31770	Microporo

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme os dados da Tabela 6, a *Moringa oleifera in natura* apresenta poro de classificação mesoporo, enquanto a modificada apresenta tamanho menor de poro, classificado como microporo. Com base nesses dados, é possível a comprovação das imagens de SEM que identificam os poros da *Moringa oleifera* modificada, apresentando-se menores do que os da *Moringa oleifera in natura*. Verifica-se que, apesar da redução do tamanho do poro, foi aumentada a área de superfície devido à maior quantidade de microporos, e isso pode, portanto, aumentar o contato e a adsorção. Assim, todas as observações indicam uma contribuição significativa de impregnação tiosemicarbazida nas sementes de *Moringa oleifera*.

Os adsorventes podem ser classificados em função da sua estrutura porosa e, também, em relação à sua polaridade. De acordo com o tamanho dos poros (dp), os sólidos podem ser classificados em microporosos $dp > 20\text{Å}$, mesoporosos $20\text{Å} < dp < 200\text{Å}$ e macroporosos $dp > 200\text{Å}$. O tamanho dos poros determina a acessibilidade das moléculas de adsorvato ao interior do adsorvente. Portanto, a distribuição de tamanho dos poros é uma importante propriedade na capacidade de adsorção de adsorvente (ULSON et al., 2003).

A análise elementar é um procedimento químico para se conhecer os elementos constituintes de uma determinada molécula e/ou material e suas proporções. Através da

pirólise de um determinado composto que contenha O, C, S, N e H, podemos saber a composição percentual, em massa, desses elementos presentes em determinadas moléculas (BUDZIAK et al., 2004).

A análise elementar de carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre é mais uma ferramenta para elucidar a presença desses compostos no material da *Moringa oleifera in natura* e da modificada. A Tabela 7 apresenta os dados obtidos com a análise elementar.

Tabela 7. Tabela com porcentagem de C, H, N e S presente nos materiais.

Moringa	%C	%H	%N	%S
<i>In natura</i>	47,43	7,17	2,80	1,37
Impregnada	52,01	7,27	4,63	2,23

Fonte: Dados da pesquisa.

Com os resultados da Tabela 7, é possível observar que as quantidades de C, H, N e S aumentaram do material da *Moringa oleifera in natura* para o da modificada com o reagente tiosemicarbazida. Uma atenção especial é dada às quantidades de N e S que, praticamente, dobram de valor. Isso ocorre, devido à presença da tiosemicarbazida, que possui esses elementos presentes em seu composto. Além disso, a presença de N e S aumenta a quantidade de pares de elétrons disponíveis na superfície do material.

Já o ponto de carga zero tem como objetivo avaliar o comportamento elétrico superficial das partículas da biomassa. Com o intuito de caracterizar diferenças entre os materiais *in natura* e os impregnados com reagente tiosemicarbazida, foram realizadas medições do PCZ para determinar o pH onde as cargas superficiais se anulam.

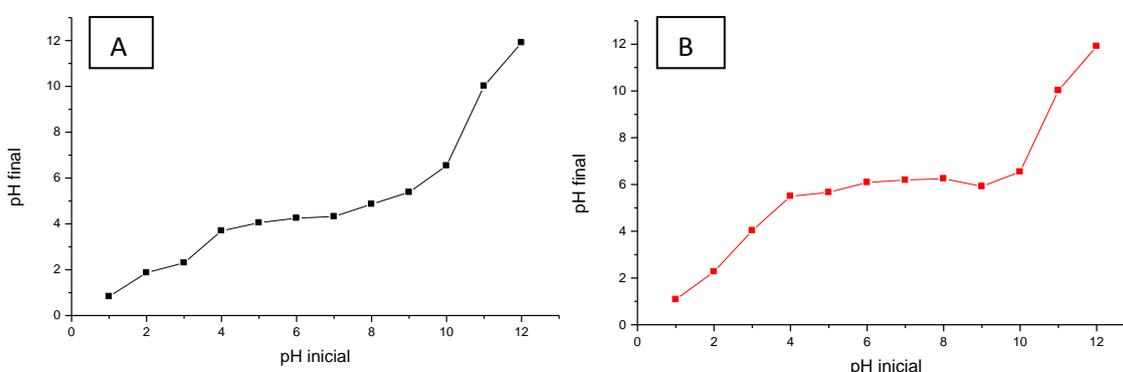
A superfície do bioadsorvente é composta principalmente de proteínas, lipídios e carboidratos, que são responsáveis pela carga superficial das partículas, devido à dissociação dos grupos funcionais presentes (ARAÚJO et al., 2013; ALVES, 2013). A dissociação dos grupos funcionais é dependente do pH, uma vez que, se o pH da solução estiver acima do PCZ da biomassa, a superfície se apresentará com cargas predominantemente negativas em carboxilas e hidroxilas dissociadas e, conseqüentemente, exibirá uma habilidade para trocar cátions.

Em contrapartida, se a solução estiver num pH abaixo do seu PCZ, os grupos funcionais ditos anteriormente não estarão dissociados, e os grupos amina dos aminoácidos estarão protonados. Nessas condições, a biomassa atrairá principalmente

ânions. O ponto de carga zero é observado quando não ocorre variação, ou quando ocorre pouca variação, entre os pH estudados (VERSIANI, 2008).

A Figura 17 representa os resultados obtidos para determinação do PCZ da *Moringa oleifera in natura* e da *Moringa oleifera* modificada com a tiosemicarbazida. É possível observar, na Figura 17A, uma faixa praticamente constante que ocorre entre os pH 5-7. Nessa região, a carga total da superfície do bioadsorvente é nula, sendo denominada ponto de carga zero (pH_{PCZ}) para a *Moringa oleifera in natura*.

Figura 17. Representação dos PCZ da (A) *Moringa oleifera in natura* e (B) da *Moringa oleifera* modificada com tiosemicarbazida.



Já nos resultados observados, na Figura 17B, para o material modificado, a faixa constante está entre os pH 6 e 8, que representa seu pH_{PCZ} para material modificado. Assim, é possível observar que, em pH maior que 8, a semente de *Moringa oleifera* apresenta-se negativamente carregada, possuindo a habilidade de adsorver espécies positivamente carregadas, enquanto que, em pH menor que 6, o material encontra-se positivamente carregado e irá adsorver espécies negativas.

5.2.2. Estudos da remoção seletiva de Se^{+4}

Para esses estudos de adsorção, foi utilizada a semente do bioadsorvente *Moringa oleifera* modificada. Parâmetros como pH, volume da solução, massa de adsorvente, tempo de remoção, estudo de interferentes, estudo do redutor e estudo da concentração do reagente tiosemicarbazida utilizado para modificação da *Moringa oleifera* foram otimizados com soluções padrões.

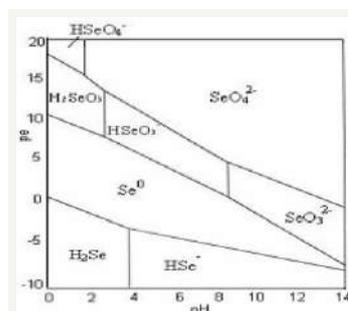
Esses parâmetros são importantes devido às características especiais de cada bioadsorvente. Para o sistema de detecção com Geração de Hidretos acoplado à absorção atômica com chama, foram também estudadas variáveis importantes como estudo da vazão do agente redutor, estudo da vazão do ácido clorídrico, estudo da concentração do agente redutor e estudo da concentração do ácido clorídrico.

5.2.2.1. Estudo do pH

O pH inicial da solução é um fator determinante no processo de separação das espécies inorgânicas de selênio, uma vez que a semente de *Moringa oleifera* pode atuar adsorvendo cátions e ânions, dependendo da carga elétrica de sua superfície. O pH determina o meio mais adequado para a adsorção de metal, contra as propriedades do ácido-base de vários grupos funcionais sobre as superfícies de adsorvente (ARAÚJO et al., 2013).

O estudo e o controle do pH inicial da solução podem ser suficientes para garantir diferentes porcentagens de adsorção para as espécies de selênio inorgânico nos estados de oxidação +4 e +6, podendo ocorrer a extração seletiva de uma delas. A Figura 18 mostra a distribuição das espécies inorgânicas de selênio em condições variáveis de pH. Podemos verificar o comportamento de cada espécie em estudo, de acordo com a variação do pH.

Figura 18. Distribuição das espécies de Se^{+4} e Se^{+6} em função do pH.

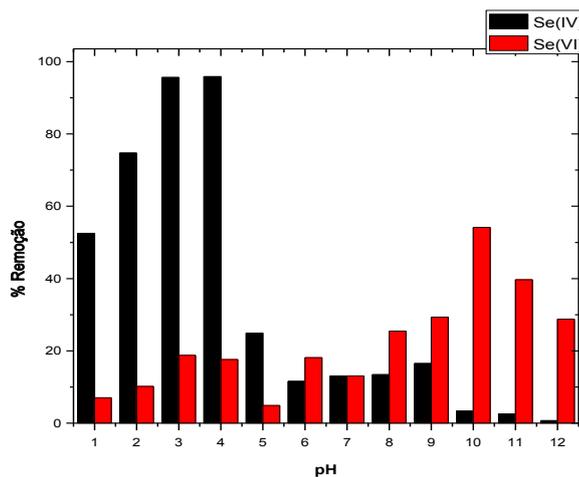


Fonte: Arbestain, M. C.; Aros, A.R. (2001).

A mistura da solução padrão com as sementes de *Moringa oleifera* é uma mistura complexa, constituída por polipeptídios catiônicos com diversos grupos funcionais. São, em sua maioria, aminoácidos que apresentam estruturas altamente

dependentes do pH do meio (JOSE et al., 2009), podendo gerar sítios de adsorção, positiva ou negativamente carregados. Por isso, foi feito um controle do pH inicial da solução, identificando diferentes porcentagens de adsorção para as espécies de Se^{+4} e Se^{+6} . Nesse sentido, apresentaram-se resultados que podem ser vistos na Figura 20.

Figura 20. Efeito do pH na adsorção de Se^{+4} e Se^{+6} , utilizando a semente da *Moringa oleifera* modificada com o reagente tiosemicarbazida.



Os estudos feitos com o pH identificaram que o Se^{+4} é adsorvido na superfície da *Moringa oleifera* e tem sua máxima adsorção em pH igual a 3 e 4. Observando que, nesse pH, cerca de 20% de Se^{+6} também são removidos, a técnica de Geração de Hidreto contribui nessa parte, uma vez que o hidreto de selênio só é seletivo para Se^{+4} , não correndo o risco da determinação simultânea das duas espécies. Para o Se^{+6} , as interações com as sementes da *Moringa oleifera* modificada ocorreram em pH mais altos, a partir do pH 8,0. Tiveram absorvidade máxima em pH 10,0, obtendo, aproximadamente, 57% de remoção, enquanto o Se^{+4} , nesse mesmo pH, adsorve menos que 5%. Assim, a determinação por Geração de Hidreto contribui muito, pois ela é seletiva para determinação de Se^{+4} . Os 20% que podem ser adsorvidos de Se^{+6} em pH=3 e 4 não interferem na determinação da espécie Se^{+4} .

O comportamento observado na Figura 20, pH *versus* remoção, está relacionado com a distribuição das espécies de selênio no meio e com a distribuição de cargas na superfície do bioadsorvente. Na Figura 20, em $\text{pH} < 7,0$, a espécie Se^{+4} encontra-se, quase predominantemente, na forma não carregada H_2SeO_3 e na forma carregada HSeO_3 , podendo ou não ser submetida à interação eletrostática com o adsorvente. Em pH básico, a espécie de Se^{+6} predominante é SeO_4^{2-} ; dessa forma, a elevada adsorção

desta espécie em pH básico pode ser justificada por sua interação com extremidades positivamente carregadas dos aminoácidos que constituem as sementes de *Moringa oleifera*, que, por sua vez, apresentam ponto isoelétrico entre 4-8 (ALVES, 2013).

Entretanto, sua adsorção, menor que 20% na faixa ácida, pode ser justificada por interações do tipo ácido-base de Lewis, além de mecanismos de complexação (MARQUES NETO et al., 2003). Para o Se^{+4} , observa-se, em pH ácido, a presença da espécie $\text{H}_2\text{SeO}_3 \cdot \text{HSeO}_3^-$. Nesta faixa, observa-se a maior porcentagem de adsorção para espécie tetravalente, em torno de 100%, sendo que a maior parte da superfície das sementes encontra-se positivamente carregada ($\text{pH} < \text{pH}_{\text{PCZ}}$), atraindo espécies aniônicas. Em pH básico, Se^{+6} encontra-se, predominantemente, na forma de SeO_4^{2-} . Assim, à medida que o pH do meio aumenta, a superfície do adsorvente se torna menos positivamente carregada, repelindo espécies aniônicas.

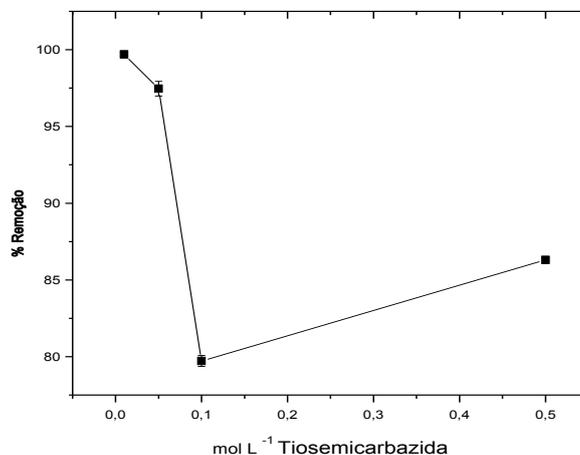
Portanto, em pH em torno de 3 a 4, Se^{+4} pode ser adsorvido com uma baixa adsorção de Se^{+6} , ocorrendo a separação seletiva das espécies inorgânicas de Se apenas com controle de pH. Então, a Figura 20, que apresenta o estudo do pH para as espécies de selênio inorgânico nos estados de oxidação +4 e +6, mostra que, em pH ácido, a espécie predominante para biorremediação é o Se^{+4} e, em pH básico, é o Se^{+6} , justificando, assim, a relação apresentada anteriormente entre ponto eletrônico (p.e) *versus* pH.

Com base nesses resultados, foi mantido, para os próximos estudos, o pH 3,5, com o objetivo de garantir a melhor adsorção de Se^{+4} . A solução sobrenadante foi utilizada para determinar Se^{+4} . Para determinar Se^{+6} , foi usado agente redutor.

5.2.2.2. Teor de tiosemicarbazida impregnada na *Moringa oleifera*

Para todos os experimentos relacionados à determinação de selênio e para melhor avaliação da superfície da *Moringa oleifera* impregnada, foram feitos estudos, nos quais se variou a concentração do reagente. A Figura 21 representa o estudo no qual foi mantida a massa modificada do bioadsorvente e variou-se a concentração do reagente de 0,01 a 0,5 mol L⁻¹.

Figura 21. Estudo da concentração do reagente tiosemicarbazida para modificação da *Moringa oleifera*. Parâmetros utilizados: $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se^{+4} , 60 minutos de agitação a 250 rpm, volume da solução de 25,0 mL, massa do adsorvente 0,25 mg. Condições da análise: pH=3,5 e 27°C .



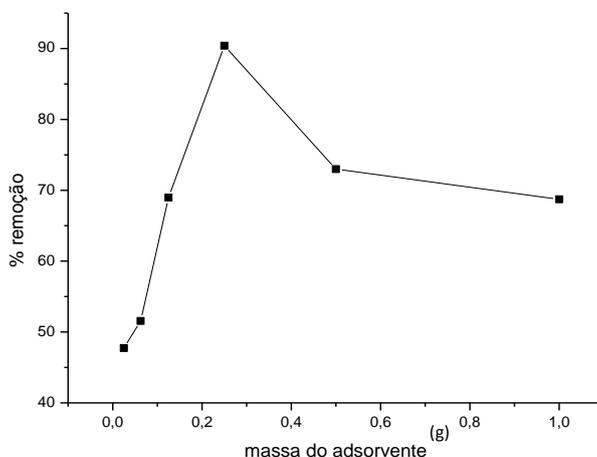
De acordo com os resultados obtidos, observa-se que uma pequena quantidade de tiosemicarbazida é necessária para a impregnação. Assim, a concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de tiosemicarbazida apresentou melhores resultados, sendo esta a concentração empregada nos estudos.

5.2.2.3. Parâmetros que afetam a adsorção

A quantidade da massa do bioadsorvente na adsorção é de grande importância, uma vez que está diretamente ligada à porcentagem de remoção dos íons de Se^{+4} . Nesse âmbito, foi feito um estudo no qual se variou a massa de 0,0250 g a 1,0000 g, para ser avaliada a quantidade adequada para a adsorção. A Figura 22 indica os resultados obtidos no estudo.

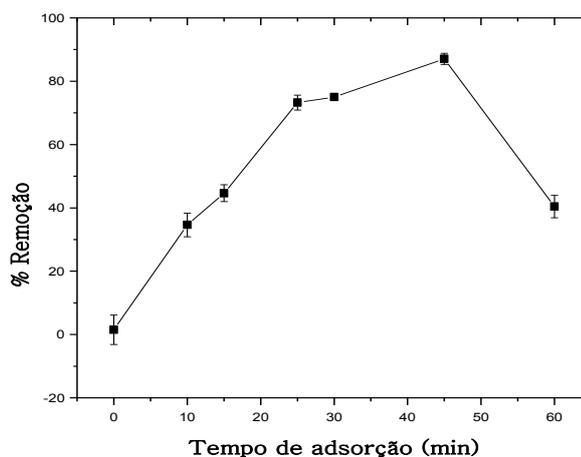
Os resultados obtidos indicam que, quando há o aumento da massa até 0,250 g, ocorre um aumento na adsorção dos íons de Se^{+4} . A partir desse valor, à medida que a massa de *Moringa oleifera* continua aumentando, observa-se uma diminuição na adsorção. Assim, verificou-se que o sistema (adsorvente-adsorvato) atingiu o equilíbrio com a massa de 0,2500 g, sendo suficiente para a adsorção dos íons de Se^{+4} fornecidos em 25,0 mL de solução padrão a $25 \mu\text{g L}^{-1}$, resultando em uma remoção superior a 90%.

Figura 22. Estudo da variação da massa da semente da *Moringa oleifera* modificada com o reagente tiosemicarbazida. Parâmetros utilizados: $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se^{+4} , 60 minutos de agitação a 250 rpm, volume da solução de 25,0 mL. Condições: pH=3,5 e 27°C .



A quantidade de analito do íon Se^{+4} que é retida pelo material poderá variar com o tempo, sendo que, à medida que aumenta o tempo de adsorção, poderá ocorrer adsorção e dessorção. Nesse sentido, foi avaliado o tempo ideal para a retenção do Se^{+4} no adsorvente. Esse teste foi estudado na faixa de 0 a 60 minutos e os resultados obtidos poderão ser vistos na Figura 23.

Figura 23. Variação da porcentagem de remoção de Se^{+4} em função da variação do tempo de adsorção. Parâmetros utilizados: $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se^{+4} , 250 rpm, volume da solução de 25 mL. Condições da análise: pH=3,5 e 27°C .

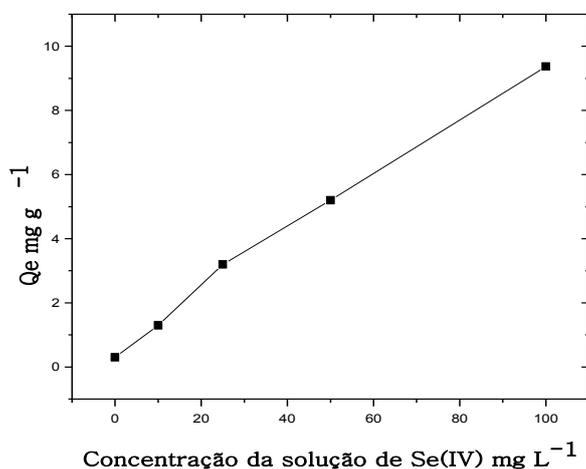


Com base na Figura 23, é possível observar que à medida que se aumentou o tempo de adsorção até 45 minutos, a adsorção aumentou consideravelmente. A partir

daí, é observada uma queda no sinal analítico, possivelmente sendo o efeito de desorção que ocorreu durante o processo da agitação. Conseqüentemente, para essa variável, foi fixado o tempo de contato do material com a solução em 45 minutos, a fim de garantir que o sistema atingisse o equilíbrio.

O potencial de remoção das sementes de *Moringa oleifera* modificada, em função da concentração dos íons de Se^{+4} , foi estudado na faixa de 1,0 a 100,0 mg L^{-1} . Esse estudo é mais bem visualizado pela Figura 24.

Figura 24. Estudo da concentração da solução de Selênio para remoção dos íons de Se^{+4} com *Moringa oleifera* modificada com tiosemicarbazida. Parâmetros utilizados: $25\mu\text{g L}^{-1}$ de Se^{+4} , 250 rpm, volume da solução de 25 mL, tempo de adsorção 45 min. Condições da análise: $\text{pH}=3,5$ e 27°C .

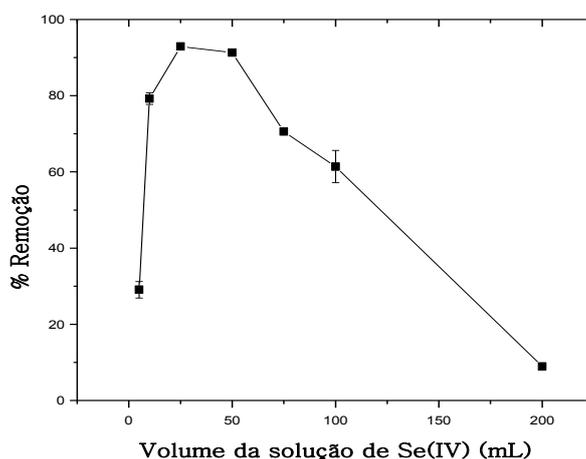


De acordo com a Figura 24, a quantidade do analito de Se^{+4} por unidade de massa de adsorvente aumentou com o aumento da concentração de íons Se^{+4} e, conseqüentemente, aumentaram-se os valores de Q_e (mg g^{-1}). Foi observado que o equilíbrio não foi alcançado, o que possibilita condições favoráveis para a remoção de íons Se^{+4} . A concentração ótima foi definida em $25\mu\text{g L}^{-1}$ para as condições estudadas posteriormente, o que pode provar a existência de sítios de adsorção no adsorvente.

O volume da solução para adsorção também foi estudado, uma vez que, à medida que se aumenta o volume da solução e mantém-se a massa do adsorvente, poderá variar a remediação dos íons de Se^{+4} . Assim, os estudos de volume permitem verificar a proporção da interação dos íons com a massa do material analisado. Ajusta-se, pois, a melhor situação para o estudo dos íons de selênio, frente à massa desse

material, avaliado pela porcentagem de adsorção. A Figura 25 indica o estudo do volume de solução para a adsorção.

Figura 25. Estudo do volume da solução de selênio para remoção dos íons de Se^{+4} com *Moringa oleifera* modificada com tiosemicarbazida. Parâmetros utilizados: $25\mu\text{g L}^{-1}$ de Se^{+4} , 250 rpm, tempo de adsorção 45 min. Condições da análise: $\text{pH}=3,5$ e 27°C .

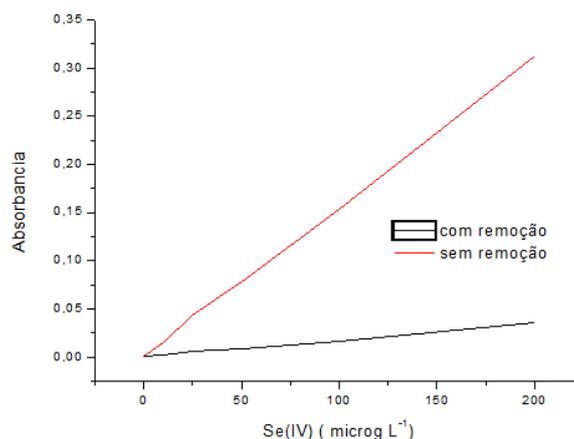


Com os resultados observados na Figura 25, é notável que à medida que se aumenta a solução até 50,00 mL, aumenta-se também sua adsorção, sendo a adsorção máxima e quase constante verificada no intervalo de 25,00 a 50,00 mL. Após o volume de 50,00 mL, o sinal analítico caiu consideravelmente. Isso pode ser explicado devido ao fato de que quanto maior o volume de solução, menos o contato com o adsorvente estará distribuído igualmente na razão massa do adsorvente *versus* volume do adsorvente.

Com o intuito de avaliar toda a otimização e comparar os resultados da adsorção do Se^{+4} , foi feita uma curva, com e sem remoção, usando todos os parâmetros estudados - massa de adsorvente, tempo de contato e volume de solução. Os dados obtidos são apresentados na Figura 26.

Como pode ser observada na Figura 26, a remoção de Se^{+4} ocorre seletivamente, deixando apenas o Se^{+6} livre, na solução, para ser determinado por HGAAS. Assim, houve seletividade na remoção, sendo o método, eficiente para determinação dos íons de Se^{+4} e Se^{+6} no momento da adsorção e detecção por HGAAS.

Figura 26. Gráfico com a concentração de Se^{+4} em solução com e sem adsorção.

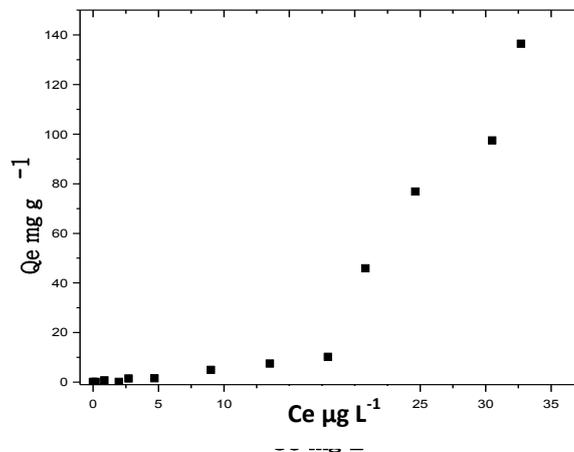


Dessa forma, em uma amostra contendo as espécies de Se^{+4} e Se^{+6} , é possível determinar Se^{+4} após extração seletiva com sementes de *Moringa oleifera* modificada. A concentração de Se total pode ser medida a partir da redução da solução para espécies no estado de Oxidação +4, adicionando o pré-redutor. Essa redução é necessária, uma vez que o HGAAS é seletivo para determinação de Se^{+4} . Sendo assim, a concentração de Se^{+6} pode ser obtida pela diferença entre as duas soluções, caso não haja possibilidade da presença de outras espécies nas amostras.

5.2.2.4. Isotermas de adsorção

O procedimento de construção das isotermas de adsorção permite verificar, graficamente, a quantidade máxima (em gramas) do adsorvato que pode ser adsorvida numa dada massa de adsorvente (ALVES, 2013). O experimento foi feito usando 50,0 mg de sementes trituradas de *Moringa oleifera* modificada que foi agitada durante 45 minutos com 25,00 mL de soluções de íons Se^{+4} em concentrações de 0,1 a 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram mantidos os parâmetros, como pH em 3,5 e tempo de 45 minutos. Durante a realização de todo o procedimento, após a agitação, a mistura foi filtrada e o sobrenadante, analisado pelo HGAAS. A isoterma foi obtida lançando-se no eixo da abscissa a concentração do sobrenadante, ou seja, a concentração de equilíbrio do adsorvato - C_e (mg L^{-1}), e no eixo da ordenada a quantidade do metal adsorvido (mg) pela massa do adsorvente - Q_e (mg g^{-1}). A Figura 27 apresenta a isoterma obtida para adsorção dos íons Se^{+4} pelas sementes da *Moringa oleifera* modificada com tiosemicarbazida.

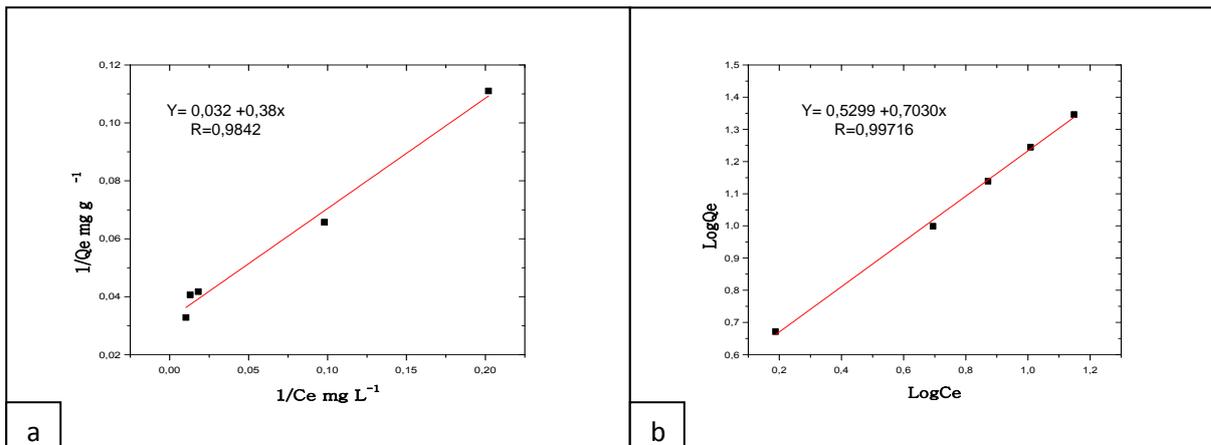
Figura 27. Isoterma de adsorção de íons Se^{+4} utilizando semente de *Moringa oleifera* impregnada com reagente tiosemicarbazida como bioadsorvente. Resultados obtidos com as condições otimizadas.



O estudo da isoterma apresenta um gráfico do tipo “S”. Com base no gráfico acima, e pela classificação segundo Giles *et al.* (1960), citado por Falone (2004), a isoterma de adsorção dos íons de selênio pelas sementes da *Moringa oleifera* pode ser identificada como uma isoterma do tipo S. Essa representação é côncava ao eixo da concentração, seguida frequentemente por um ponto de inflexão aparentando a forma de um tipo “S”. O tipo L ou de Langmuir, com concavidade para baixo, é mais comum e representa adsorção em monocamadas (ARAÚJO *et al.*, 2013). Observa-se que à medida que se aumenta o número de moléculas, aumenta-se também a adsorção dos íons. Consequentemente, houve uma associação entre as moléculas adsorvidas, chamada adsorção cooperativa (VERSIANI, 2008).

Posteriormente, foram testados modelos que descrevem o equilíbrio estabelecido entre os íons do metal adsorvido na biomassa (q) e os íons que permanecem na solução (C_e), a uma temperatura constante. Para a adsorção de Se^{+4} , a Figura 28, (a) e (b), apresenta as isotermas linearizadas segundo os modelos de Freundlich e Langmuir.

Figura 28. Linearização das isotermas de adsorção de Se^{+4} aplicadas aos modelos de Langmuir (a) e Freundlich (b).



Com base nos estudos das isotermas de adsorção, os dados experimentais para a adsorção de íons Se^{+4} pelas sementes de *Moringa oleifera* modificada proporcionaram ajustes significativos para os dois modelos de isoterma (Langmuir e Freundlich). O coeficiente de correlação indicado para o modelo de Freundlich foi um pouco mais elevado do que para o modelo de Langmuir, podendo ser observado nos valores indicados por “R”, na Figura 28.

É razoável supor que o comportamento da adsorção Se^{+4} no bioadsorvente é limitado a uma multicamada e não prevê saturação da superfície (SARI et al., 2007; TAVARES et al., 2003). Embora os dados de adsorção tenham sido ajustados pelos modelos de Langmuir e Freundlich, não é possível dizer, exatamente, qual dos modelos explica com evidência o processo de adsorção. Sabendo que a composição do bioadsorvente é complexa, os resultados desse estudo indicam que o material poderá se comportar segundo os dois modelos.

Já, de acordo com o coeficiente de correlação encontrado após a linearização, o processo de adsorção dos íons Se^{+4} pelas sementes de *Moringa oleifera* pode ser mais bem explicado segundo o modelo de Freundlich. Tal modelo considera a existência de uma estrutura em multicamadas e não prevê a saturação da superfície. Considera, também, o sólido como heterogêneo, ao passo que aplica uma distribuição exponencial para caracterizar os vários sítios de adsorção, os quais possuem diferentes energias adsorptivas. Além disso, esse modelo não se torna linear em baixas concentrações, mas permanece côncavo ao eixo da concentração (TAVARES et al., 2003; ARAUJO et al., 2014; ALVES, 2013).

Nesse sentido, a Tabela 8 apresenta as constantes encontradas após a linearização, segundo os dois modelos.

Tabela 8. Parâmetros de linearização das isotermas de adsorção segundo os modelos de Langmuir e Freundlich.

Analito	Parâmetros de Langmuir			Parâmetros de Freundlich	
	$Q_{Máx}$ (mg g ⁻¹)	R_L	b	K_f	n
Se ⁺⁴	23,9504	0,0476	0,0574	3,5099	1,4225

Fonte: Dados da pesquisa.

Com base nos dados da Tabela 8, as constantes da isoterma de Langmuir, $Q_{MÁX}$ e b, são constantes relacionadas com a capacidade de adsorção máxima e com a energia de adsorção, respectivamente. Segundo Chaves e colaboradores (2009), o parâmetro R_L é uma constante adimensional, chamada parâmetro de equilíbrio, sendo que valores de $R_L > 1$ indicam ser desfavorável, $R_L = 1$ indicam ser linear, R_L entre 0 e 1, favorável e $R_L = 0$, irreversível. Assim, para a adsorção de Se⁺⁴, foi encontrada uma capacidade máxima de adsorção igual a 23,9504 mg g⁻¹; já o parâmetro R_L indica adsorção favorável para os íons de Se⁺⁴.

Para as variáveis da isoterma de Freundlich, que representam as interações de Vander Walls, K_f = constante de Freundlich e $1/n$ = fator de linearidade da isoterma, temos que o valor de n na isoterma de Freundlich apresenta a mesma função do parâmetro R_L na isoterma de Langmuir. O fator de linearidade da isoterma determina se a adsorção é favorável. Neste caso, foi encontrado o valor de 0,7, apresentando 70% de favorecimento da adsorção (SOARES, B. M. C.; SARON, E. S., 1998).

Assim, foram encontrados valores de K_f iguais a 3,5099 para a adsorção de Se⁺⁴ e valor de $1/n$ favorável. Frente a esses resultados, podemos concluir que a adsorção do material se ajusta aos dois modelos: tanto o de Langmuir, quanto o de Freundlich.

5.2.2.5. Otimização da determinação por HGAAS

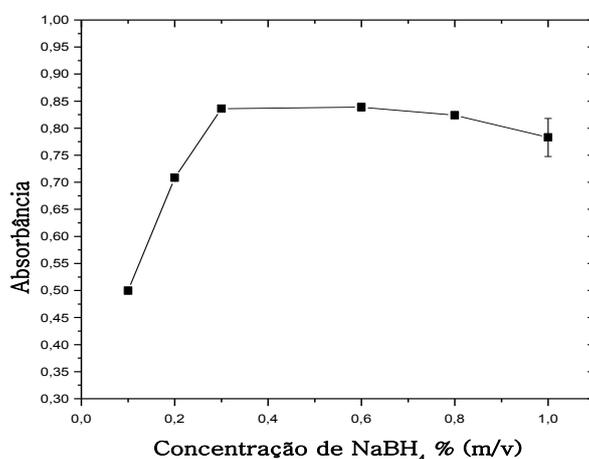
Com o intuito de se obter o melhor sinal analítico para aumentar a sensibilidade na detecção dos íons de Se⁺⁴, foram estudadas as variáveis do sistema de Geração de Hidreto que podem interferir na absorvância: concentração do HCl e concentração do

NaBH₄. Esse estudo foi realizado de forma univariada, utilizando uma solução de Se⁺⁴ 25 µg L⁻¹. A equação que envolve o processo de formação do Hidreto (5) segue:



A concentração do NaBH₄ deve ser otimizada para se ter melhores condições que a formação de hidrogênio atômico. Esse processo é fundamental na Geração do Hidreto, como observado na equação acima (Li et al., 2009). Nesse sentido, a concentração da NaBH₄ foi avaliada na faixa de 0,1 a 1,0 % (m/v), podendo ser observada na Figura 29.

Figura 29. Otimização da concentração de NaBH₄.

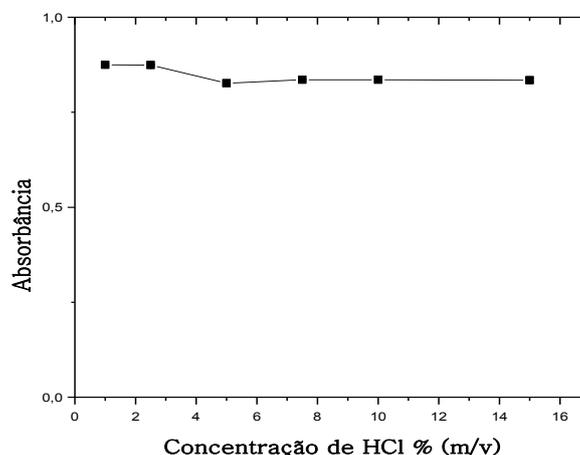


Com base nos resultados observados, é possível notar que o sinal analítico é baixo, quando a concentração do boro hidreto de sódio se apresenta com valores inferiores a 0,3% (m/v) e decresce para valores maiores que 0,8% (m/v). É possível observar, também, que em vazões entre 0,3 e 0,6% (m/v), o sinal analítico permanece constante. Em concentrações acima de 0,8% (m/v), ocorre uma diminuição do sinal analítico, o que pode ser justificado com a formação de gás H₂ em excesso (PASSOS, 2011; VILARINHO, A. L.; BACCAN, N., 2001). Ocorre, conseqüentemente, uma diluição do hidreto de selênio e a chegada dos hidretos à cela de atomização é dificultada. Para essa variável, foi fixado um valor de 0,5% (m/v), sendo o NaBH₄ bastante volátil. Optou-se, então, por garantir uma concentração nesse intervalo, para não ocorrer perda do sinal analítico.

Com o objetivo de conhecer a concentração de HCl mais adequada para formação de hidrogênio atômico ao reagir com NaBH₄, foi realizado um estudo da

concentração do ácido para o sistema de Geração de Hidreto no separador gás-líquido. Soluções de HCl, com concentrações variando entre 1 e 15% (v/v), foram testadas. Na Figura 30, são observados os resultados encontrados após as análises.

Figura 30. Otimização da concentração de HCl.

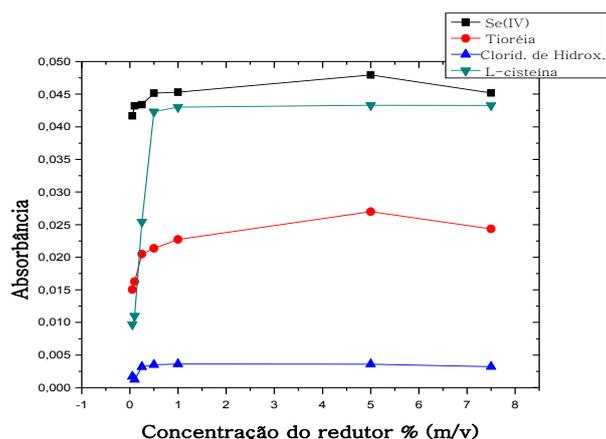


Com os resultados observados, é notável que a intensidade do sinal analítico manteve-se constante durante toda a variação da concentração do HCl. Com intuito de reduzir gasto de reagente, manteve-se a concentração do ácido em 1,0% (v/v). Quantidades excessivas de HCl e NaBH₄ aumentam a formação de H_{2(g)} no separador gás-líquido (LU et al., 2004), processo que acarreta perdas na determinação do antimônio, uma vez que esse excesso dilui a estibina e, conseqüentemente, diminui o sinal analítico. Dessa forma, o valor de 1,0% (v/v) foi utilizado para concentração de soluções HCl na formação do hidreto nos estudos posteriores.

No intuito de determinar as quantidades de Se⁺⁶ pelo método desenvolvido, foi estudado o melhor reagente para redução da espécie +6 em +4. A Figura 31, abaixo, apresenta os dados obtidos dos redutores selecionados.

Conforme observado na Figura 31, foram avaliados os redutores L-cisteína, Cloridrato de Hidroxilamina e Tioureia e comparados com uma solução de Se⁺⁴ em uma mesma concentração. É possível notar que a L-cisteína foi o redutor de maior eficiência, obtendo os maiores sinais analíticos. Na literatura, os trabalhos de Feng et al. (1999), Matusiewicz; Krawczyk (2008), Feng et al. (1998) e Sun et al. (2004) apontaram a L-cisteína como o melhor reagente para reduzir Se⁺⁶ para detecção no HGAAS.

Figura 31. Estudo da eficiência do redutor na redução de Se^{+6} para Se^{+4} .



Miravet e colaboradores (2004) relataram, em sua revisão, que a L-cisteína foi proposta para pré-reduzir o Se^{+6} a Se^{+4} por diversos autores (D'Ulivo et al., 1998; D'Ulivo et al., 2004; Welz; Sucmanova (1993), Chen et al. (1992). A L-cisteína é particularmente atrativa para essa finalidade, devido à sua baixa toxicidade e à necessidade de baixas concentrações de ácido na Geração de Hidretos. Nesse sentido, a L-cisteína foi utilizada para redução do Se^{+6} para Se^{+4} e, por fim, para ser determinada por HGAAS.

5.2.2.6. Estudo de interferentes

Depois de otimizadas as condições operacionais para a determinação dos íons de Se^{+4} e Se^{+6} , foi estudado o efeito de alguns íons que poderiam interferir no método desenvolvido.

Na Tabela 7, é possível observar os valores do fator de interferência. Com base no cálculo do fator de interferência, observa-se que quando $\text{FI} = 1,00$, isso significa que não há interferência, enquanto fatores maiores que 1,10 ou menores que 0,90 indicam um aumento ou um decréscimo do sinal analítico devido ao interferente. De posse dessa equação, foram analisados os íons interferentes desse método, desenvolvido para determinar Se^{+4} .

Sabendo que a água é composta por diversos elementos em quantidades distintas, foram analisados alguns íons presentes na água potável, para verificar se ocorreria interferência desses íons, quando a amostra real fosse analisada. Com base nessas informações, foi realizado um estudo da determinação de Se^{+4} na presença de

possíveis interferentes. Soluções contendo íons Se^{+4} e espécies interferentes foram preparadas, como é observado na Tabela 9.

Tabela 9. Estudo de interferentes na determinação de Se^{+4} $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Sol./íons	Se^{+6}	As^{+3}	As^{+5}	Ca^{+2}	Na^{+}	Cl^{-}	PO_4^{3-}	Fator de interferência (FI)
	$(\mu\text{g L}^{-1})$							
1	0	0	0	0	0	0	0	1,00
2	500	0	0	0	500	0	500	0,81
3	0	500	0	0	500	500	0	0,89
4	500	500	0	0	0	500	500	0,99
5	0	0	500	0	500	500	500	1,01
6	500	0	500	0	0	500	0	1,00
7	0	500	500	0	0	0	500	1,01
8	500	500	500	0	500	0	0	1,2
9	0	0	0	500	0	500	500	1,4
10	500	0	0	500	500	500	0	13,1
11	0	500	0	500	500	0	500	12,2
12	500	500	0	500	0	0	0	1,3
13	0	0	500	500	500	0	0	1,4
14	500	0	500	500	0	0	500	12,7
15	0	500	500	500	0	500	0	1,4
16	500	500	500	500	500	500	500	1,5
17	250	250	250	250	250	250	250	1,01

Fonte: Dados da pesquisa.

Com base na Tabela 9, são observados os resultados, e sabendo da definição de FI, os íons contidos nas soluções 2, 3, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16, conforme apresentado acima, conferiram interferência significativa na determinação de Se^{+4} . Isso pode ter ocorrido porque as concentrações adicionadas à solução estão muito mais elevadas ($500,0 \mu\text{g L}^{-1}$), quando comparadas à solução de Se^{+4} usada nos experimentos a $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$. É possível que no momento da adsorção também tenha ocorrido competição entre os íons para adsorção. As soluções contendo Na^{+} , Ca^{+2} e Cl^{-} apresentaram bastante interferência, podendo esta ser explicada pelo tamanho dos íons no momento da adsorção: esses elementos são relativamente grandes quando comparados ao íon de Se^{+4} , o que pode alterar a mobilidade dos íons solvatados.

Entretanto, casos de depreciação dos sinais podem, ainda, ser atribuídos tanto à natureza do adsorvente, quanto a fenômenos específicos da técnica FAAS (PEREIRA, G. M.; ARRUDA, M. A. Z., 2003).

Esse fator é minimizado mediante o uso da técnica de Geração de Hidretos. Nesse caso, o analito é liberado da matriz devido à formação do hidreto volátil. Diversas interferências de matriz podem ser minimizadas no processo de Geração do Hidreto. No entanto, podem ocorrer outras interferências, como a presença de compostos em amostras biológicas e ambientais, diferentes estados de oxidação de um mesmo elemento na amostra, além dos elementos que geram ou não os hidretos (DEDINA, J.; MATOUSEK, T., 2000; PASSOS, 2011).

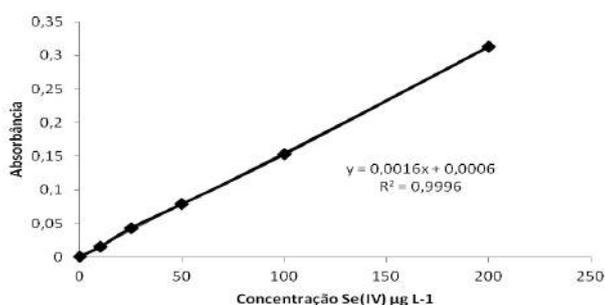
Os íons estão contidos em concentrações menores nas amostras reais analisadas. É possível observar, no teste de recuperação, que não ocorreu interferência significativa, obtendo-se um valor aceitável de $\pm 10\%$ para a recuperação de Se^{+4} nas amostras (INMETRO, 2011).

Observa-se que nos ensaios feitos com os íons para o estudo de interferentes, conforme Tabela 7, ocorreu interferência em quase todas as soluções analisadas. Entretanto, os valores testados são superiores ao máximo permitido, sabendo-se que é preconizado um teor máximo de Se^{+4} , As^{+3} , As^{+5} , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , PO_4^{3-} para os testes, podendo estar presentes em $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ As total; $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ Se total; $5,0 \times 10^2 \mu\text{g L}^{-1}$ Ca^{+2} ; $2,0 \times 10^2 \mu\text{g L}^{-1}$ Na^+ ; $2,5 \times 10^2 \mu\text{g L}^{-1}$ Cl^- e $8,00 \mu\text{g L}^{-1}$ PO_4^{3-} .

Além disso, no Experimento 17, quando o teor dos íons foram reduzidos, observou-se o fator de interferência de 1,0. Então, não há interferências para o método proposto na determinação de Se^{+4} e Se total, uma vez que os íons estudados estão em concentrações menores que $250,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em amostras de água.

5.2.2.7. Parâmetros Analíticos Avaliados

O desempenho analítico do método de remoção de Se^{+4} na semente de *Moringa oleifera* foi avaliado sob condições otimizadas. Foram determinados os parâmetros: faixa linear, limites de detecção e quantificação, e exatidão. A Figura 32 mostra a curva obtida com o padrão de Se^{+4} .

Figura 32. Curvas de calibração do Se^{+4} sem adsorção.

As equações das retas mostradas na Figura 32 permitem, mediante leituras sucessivas do branco, calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método proposto. Esses parâmetros são relevantes, quando se trata de avaliar o desempenho de um método analítico, para a determinação de espécies químicas a baixas concentrações. O limite de detecção, definido como a menor quantidade do analito que um método pode detectar, foi calculado como 3 vezes o desvio padrão obtido em 10 determinações do branco dividido pela inclinação da curva de calibração.

A exatidão do método foi avaliada após 10 determinações consecutivas para a solução de Se^{+4} $25 \mu\text{g L}^{-1}$, expressando o resultado em termos de desvio padrão relativo (DPR). O valor encontrado de DPR, 1,1% para Se^{+4} , sendo menor que 7%, indicam precisão adequada para o método desenvolvido (INMETRO, 2011). A Tabela 10 apresenta as figuras de mérito obtidas para o método proposto.

Tabela 10. Parâmetros avaliados do método de extração seletiva de Se^{+4} .

Parâmetros avaliados	Se^{+4}
Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,527 - 200
Coefficiente de correlação	0,9996
Sensibilidade	0,00179
D.P.R. (%)	1,1
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,158
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,527

Os testes de exatidão na aplicação do método desenvolvido para determinar a concentração de Se^{+4} e Se total em um sistema foram realizados em amostras de água mineral comercializadas na cidade de Uberlândia. Para os valores de Se^{+6} , os cálculos foram feitos pela diferença entre o Se total e o Se^{+4} . Nessas amostras de água mineral, a concentração do analito estava abaixo do limite de detecção da técnica, pois o elemento

de interesse não foi detectado. Foram utilizados os parâmetros otimizados do método desenvolvido, e a faixa da curva de calibração empregada foi de 0,5-100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados de recuperação são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Teste de recuperação de Se^{+4} e Se total em amostras de água mineral.

Analito (μgL^{-1})	Procedimento	Água	Água	Água
		mineral Tipo 1	mineral Tipo 2	mineral Tipo3
Se^{+4}	Adicionada	25,00	25,00	25,00
	Encontrada	24,88 \pm 0,10	24,98 \pm 0,40	24,89 \pm 0,40
	Recuperação (%)	99,52	99,92	99,56
Total (Se^{+4} + Se^{+6})	Adicionada	25,00	25,00	25,00
	Encontrada	25,11 \pm 0,21	25,37 \pm 0,30	25,31 \pm 0,31
	Recuperação (%)	100,44	101,48	101,24

Os resultados obtidos evidenciam que a metodologia não apresentou problemas, visto que a recuperação dos íons Se^{+4} e Se total, no método proposto, mostrou valores dentro da faixa aceitável de 90 a 110% (INMETRO, 2011).

A exatidão do método foi avaliada, ainda, por meio da análise dos materiais certificados APS – 1075 e APS-1071, sendo amostras de água mineral. A Tabela 12 apresenta os resultados.

Os resultados observados para a análise das amostras certificadas APS-1075 e APS-1071 demonstram que os valores obtidos são consistentes com o valor de referência, o que vem a confirmar a confiabilidade do método proposto neste trabalho. Observa-se, também, na Tabela 12, que nas amostras certificadas foram encontrados valores para Se total, não sendo detectados valores para Se^{+4} .

Tabela 12. Aplicação das amostras certificadas no método desenvolvido para determinação de Se^{+4} e Se total.

Amostra	Método Proposto ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Valor Certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Se^{+4}	Se total [(+4) + (+6)]	
APS-1075	N.D	9,7 \pm 0,1	10,0 \pm 0,5
APS-1071	N.D	48,7 \pm 0,10	50,00 \pm 0,5

N.D: não detectado.

A determinação das amostras certificadas foi obtida reduzindo-as com o melhor reagente otimizado anteriormente, a L-cisteína.

6. CONCLUSÃO

O método de análise para especiação de selênio empregando a fonte DESI apresentou-se como uma alternativa interessante e eficiente para determinação das espécies orgânicas de selênio. Para espécies inorgânicas, não foi possível confirmá-las pela fragmentação dos íons, devido à estrutura da molécula; além disso, o método proposto é apenas qualitativo, sendo necessários estudos mais dinâmicos. Análises multivariadas podem contribuir na melhoria das especiações de selênio utilizando DESI, principalmente na otimização dos parâmetros, solventes e estudos de quantificação.

O uso da extração seletiva de selênio inorgânico utilizando sementes de *Moringa oleifera* impregnada com tiosemicarbazida também se apresentou como uma alternativa interessante e eficiente para determinação quantitativa das espécies, sendo que a impregnação contribuiu cerca de quatro vezes mais na adsorção. O método é simples e de baixo custo, quando se compara com os métodos cromatográficos. Além disso, elimina totalmente o uso de solventes orgânicos utilizados na maior parte dos procedimentos de extração sólido-líquido. Diante dos resultados obtidos, há possibilidade de utilização do método desenvolvido para determinação de selênio inorgânico.

Para ambos os procedimentos, os objetivos específicos foram alcançados. A especiação de selênio empregando técnicas não cromatográficas foi confirmada frente a testes com amostras certificadas e padrões das espécies. Os resultados dos parâmetros avaliados foram satisfatórios, e tanto a fonte DESI, quanto o uso da *Moringa oleifera* impregnada na SPE podem ser empregados na especiação de selênio. Melhorias são necessárias para a quantificação no caso do uso de DESI, e para a especiação de espécies orgânicas no caso da SPE com *Moringa oleifera*.

REFERÊNCIAS

- ABDULAH, R. et al. Selenium enrichment of broccoli sprout extract increases chemosensitivity and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Journal Trace Elementals in Medicine and Biology*, 2005, v. 19, p.141-150.
- ADAMS, F.C.J. Elemental speciation: where do we come from? Where do we go? *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, v. 19, p.1090–1097.
- ALVES, V. N. Desenvolvimento de métodos de extração em fase sólida para especiação de cromo e arsênio empregando sementes de *Moringa oleifera* como bioadsorvente. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, 2013.
- ARAÚJO, C. S. T. et al. Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches, Chapter 10, Bioremediation of Waters Contaminated with Heavy Metals Using *Moringa oleifera* Seeds as Biosorbent. Intech, 2013, Oct. p.2.
- ARAÚJO, C.S.T. Desenvolvimento de metodologia analítica para extração e pré-concentração de Ag(I) utilizando a *Moringa oleifera* Lam. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, 2009.
- ARAÚJO, C. S. T. et al. Development of a flow system for the determination of low concentrations of silver using *Moringa oleifera* seeds as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 2010, v. 96, p.82–85.
- ARBESTAIN, M. C.; ARÓS, A. R. modeling selenium transfers in straw-amended soils *Soil Science*, 2001, v. 166, p.539-47
- BAG, H.; LALE, M.; TURKEY, A.R. Determination of iron and nickel by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration on *saccharomyces cerevisiae* immobilized sepiolite. *Talanta*, 1998, p.689-696.
- BENNETT, R. N. et al. Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi- Purpose Trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish

Tree) and *Moringa oleifera* stenopetala L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, v.51, p.3546-53.

BHATTI, H. N. et al. Removal of Zn(II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* Lam. (horseradish tree) biomass. Process Biochemistry, 2007, v.42, p.547–53.

BIERLA, K.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Specific determination of selenoaminoacids in whole milk by 2D size-exclusion-ion-pairing reversed phase high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP MS). Analytica Chimica Acta, 2008, v.624, p.195-202.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução RE nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: < www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm.> Acesso em: dez. 2014.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. Quimica Nova, 2004, v. 27, p.399-403.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 2003, v. 58, p.1177-1233.

CASIOT C.; DONARD, O. F. X.; POTIN-GAUTIER, M. Optimization of the hyphenation between capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of As-, Sb-, Se- and Te-species, applicable to soil extracts. Spectrochim. Acta B, 2002, v. 57, p.173-187.

CASIOT, C. et al. An approach to the identification of selenium species in yeast extracts using pneumatically-assisted electrospray tandem mass spectrometry. Analytical Communications, 1999, v. 36, p.77-80.

CERVERA, M. L.; DAS, A. K.; DE LA GUARDIA, M. Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions. Talanta, 2001, v. 55, p.1-28.

CHAN, Q.; AFTON, S. E.; CARUSO, J. A. Investigation of Selenium Metabolites in Se-enriched Kale, *Brassica oleracea*, by HPLC-ICPMS and nanoESI-ITMSJ. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, v. 25, p.186-192.

CHAVES, T. F. et al. Uso da cinza da casca do arroz (cca) obtida da geração de energia térmica como adsorvente de Zn(II) em soluções aquosas. *Química Nova*, 2009, v. 32, p.1378-1383.

CHEN, H.; BRINDLET, I. D.; ZHENG, S. Combined Generator Beparator Part 2. Stibine Generation Combined With Flow Injection for the Determination of Antimony in Metal Samples by Atomic Emission Spectrometry. *Analyst*, 1992, v. 117, p.1603-1611,.

CHERNOFF, R. Supplement: women and micronutrients: addressing the gap throughout the life cycle. Micronutrient requirements in older women. *The American Journal of Society Clinical Nutrition*, 2005, v. 81, p.1240-1245.

CHUN, O. K. et al. Estimation of antioxidant intakes from diet and supplements in U.S. adults. *Journal of Nutrition*, 2010, v. 140, p.317-24.

COOKS, R. G. et al. Detection Technologies. Ambient mass spectrometry. *Ambient Mass Spectrometry*, Science, 2006, v. 311, p.1566.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. São Paulo: Manole; 2005.

CREWS, H. M. et al. Investigation of selenium speciation in in vitro gastrointestinal extracts of cooked cod by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, v. 11, p.1177-1182.

CUBADDA, F. et al. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, v. 58, p.2295-2301.

DEDINA, J.; MATOUSEK, T. A new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, v. 15, p.301–304.

DEG. Quelato de selênio. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.deg.com.br/pdf/index.php?txtAnexo=Literatura>> Acesso em: dez. 2014.

DIETZ, C. et al. Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction–moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry Detection. *Analytical Chimica Acta*, 2004, v. 501, p.157-167.

DUMONT, E. et al. Identification of the major selenium compound, Se-Methionine, in three yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dietary supplements by on-line narrowbore liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, v. 1071, p.191-196.

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

D'ULIVO, A. et al. Elimination of hydrofluoric acid interference in the determination of antimony by the hydride generation technique. *Talanta*, 1998, v. 45, p.801–806.

ENCINAR, J. R. et al. Identification of non peptide species in selenized yeast by MALDI mass spectrometry using post-source decay and orthogonal Q-TOF detection. *Analyst*, 2004, v. 129, p.846-849.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of Selenium. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1997, v. 51, p.S20-S23.

FANG, Y. et al. Identification of selenium compounds using HPLC-ICPMS and nano-ESi-MS in selenium-enriched rice via foliar application. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, v. 24, p.1657-1664.

FAO/WHO. Preparation and use of food-based dietary guidelines. Report of a joint FAO/WHO consultation. World Health Organization (WHO) Technical Report Series. Geneva, Switzerland, 1998, v. 880.

FENG, Y. L. et al. Sequential determination of tin, arsenic, bismuth and antimony in marine sediment material by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using a small concentric hydride generator and L cysteine as prereductant. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 1998, v. 361, p.155-157.

FENG, Y. L. et al. Speciation of antimony (III) and antimony (V) using hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry combined with the rate of pre-reduction of antimony. *Analytica Chimica Acta*, 1999, v. 386, p.97-304.

FOX, T.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Selenium. In: Hurrell R, editor. *The mineral fortification of foods*. Leatherhead: Leatherhead Publishing, 1999.

FRIGHETTO, R. S.; FRIGHETTO, N.; SCHNEIDER, R. P.; FERNANDES LIMA, P. C. O potencial da espécie *Moringa oleifera* (*Moringaceae*) I.A planta como fonte de coagulante natural no saneamento de águas e como suplemento alimentar. *Revista Fitos*, 2007.

GHASEMI, E.; SILLANPÄÄ, M.; NAJAFIA, N.M. Headspace Hollow Fiber Protected Liquid-phase Microextraction Combined with Gas Chromatography - Mass Spectroscopy for Speciation and Determination of Volatile Organic Compounds of Selenium in Environmental and Biological Samples. *Journal of Chromatography A*, 2011, v. 1218, p.380-386.

GILON, N.; POTIN-GAUTIER, M.; ASTRUC, M. Optimization of the determination of inorganic and organic selenium species using high-performance liquid

chromatographyelectrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1996, v. 750, p.327.

GONZALVEZ, A. et al. Review of non-chromatographic methods for speciation analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2009, v. 636, p.129–157.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 8ª ed. São Paulo: Editora LTC, 2012.

HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M. The diverse rol of selenium within selenoproteins a review. *Journal of the American Diet Association*, 1999, v. 99, p.836-43.

IFA, D. R. et al. Forensic Applications of ambient ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, v. 394, p.1995.

INFANTE, H. G. et al. Study of the effect of sample preparation and cooking on the selenium speciation of selenized potatoes by HPLC with ICP-MS and electrospray ionization MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, v. 57, p.38-45.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 – Jul, 2011.

IP, C. et al. In Vitro and In Vivo Studies of Methylseleninic Acid: Evidence that a Monomethylated Selenium Metabolite is Critical for Cancer Chemoprevention. *Cancer Reseach*, 2000, v. 60, p.2882-2886.

JAYASINGHE, S. B.; CARUSO J. A. Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excels H.B.K.* (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC-ESI-MS Methods, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2010, v. 07, p.16-27.

JOHNSON, T. M.; BULLEN, T. D.; ZAWISLANKI, P. T. Selenium Stable Isotope Ratios as Indicators of Sources and Cycling of Selenium: Results from the Northern Reach of San Francisco Bay. *Environmental Science & Technology*, 2000, v. 34, p.2075-78.

JOSE, T. A. et al. 1999. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multipurpose tree *Moringa oleifera* Lam. Journal of the Science of Food and Agricultural, 2009, v. 79, p.815– 820.

JURESA, D.; KUEHNELT, D.; FRANCESCONI, K. A. Consequences of Vapor Enhancement on Selenium Speciation by HPLC/ICPMS. Analytical Chemistry, 2006, v. 78, p.8569-74.

KALAVATHY, M. H.; MIRANDA, L. R. *Moringa oleifera*—A solid phase extractant for the removal of copper, nickel and zinc from aqueous solutions. Chemical Engineering Journal, 2012, v. 158, p.188–99.

KÁPOLNA, E. et al. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot, Food Chemistry, 2009, v. 115, p.1357-63.

KITAGUCHI, T. et al. Speciation of selenium in selenium-enriched seeds, buckwheat (*Fagoparum esculentum* Moench) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow). European Food Research and Technology, 2008, v. 227, p.1455-60.

LENZ, M. et al. Combined Speciation Analysis by X-ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopy, Ion Chromatography, and Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography– Mass Spectrometry To Evaluate Biotreatment of Concentrated Selenium Wastewaters. Environmental Science Technology, 2011, v. 45, p.1067-73.

LIANG, L. et al. Selenium speciation by high-performance anion chromatography-post-column UV irradiation with atomic fluorescence spectrometry. Journal of Chromatography A, 2006, v. 1118, p.139-43.

LIN, Z. et al. In situ speciation on solid surfaces by DESI-MS. Analyst, 2010, v. 135, p.1268-1275.

LIU, Y. et al. Keshan disease: a review from the aspect of history and etiology. Japanese Journal of Hygiene, 2002, v. 56, p.641-48,

LORDEIRO, R. A. Construção de uma Fonte EASI-MS (easy ambient sonic-spray ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

LUNOE, K. et al. A method for analysis of dimethyl selenide and dimethyl diselenide by LC-ICP-DRC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, v. 398, p.3081-86.

MUYIBI, S. A.; EVISON, L. M. "Moringa oleifera seeds for softening hardwater". *Water. Research*, 1995, p.1099-1105.

MARQUES NETO, J. O. et al. Preparation and Evaluation of Chitosan Beads Immobilized with Iron(III) for the removal of As(III) and As(V) from water. *Journal Brazilian Chemical Society*, 2013, v. 24, p.121-32.

MARQUES, T. L. et al. Removal of Ni(II) from aqueous solution using Moringa oleifera seeds as a bio adsorbent. *Water Science & Technology*, 2012, v. 68, p.1435-40.

MARTINELLI, F. L. et al. "Alterações histológicas e de conteúdo mineral na area de correção de fenda alveolar por distração Osteogênica-in vivo". *Revista Odontologia Ciência*, 2006, v. 21, p.52.

MATUSIEWICZ, H.; KRAWCZYK, M. Determination of total antimony and inorganic antimony species byhydride generation in situ trapping flame atomic absorption spectrometry: a new way to (ultra) trace speciation analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, v. 23, p.43-51.

MIRAVET, R. et al. Comparison of pre-reducing agents for antimony determination by hydride generation atomic fluorescence spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 2004, v. 511, p.295-302.

MORENO, M. E.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C. Speciation of inorganic selenium in environmental matrices by flow-injection analysis-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, v. 15, p.681-686.

MOSCOSO-PÉREZ, C. et al. Pressurized liquid extraction followed by high performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry for arsenic and selenium speciation in atmospheric particulate matter. *Journal of Chromatography A*, 2008, v. 1215, p.15-20.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. “Active agents and mechanism of coagulation of turbid water using *Moringa oleifera*”. *Water Research*, 703-710, 1995.

NADEEM, M. et al. Sorption of lead from aqueous solution by chemically modified carbon adsorbents. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, v. 138, p.604-13.

OBUSENG, V.; NAREETSILE, F.; KWAAMBWA, H. M. A study of the removal of heavy metals from aqueous solutions by *Moringa oleifera* seeds and amine-based ligand 1,4-bis[N,N-bis(2-picoyl)amino]butane. *Analytica Chimica Acta*, 2012, v. 730, p.87-92.

PASSOS, A. S. Determinação de As total em amostras de ração de frango por HG-AAS após pré-concentração em espuma de poliuretano. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

PEREIRA, G. M.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques. *Microchimica Acta*, 2003, p.115-31.

PYZYNSKA, K. Speciation of selenium compounds. *Analytical Science*, 1998, v. 14, p.479-82.

REDDY, D. H. K. et al. Biosorption of Ni(II) from aqueous phase by *Moringa oleifera* bark, a low cost biosorbent. *Desalination*, 2011, v. 268, p.150-57.

REDDY, D. H. K. et al. Biosorption of Pb²⁺ from aqueous solutions by *Moringa oleifera* bark: equilibrium and kinetic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, v. 174, p.831-38.

REDDY, D. H. K. et al. Optimization of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) biosorption by chemically modified *Moringa oleifera* leaves powder. *Carbohydrate Polymers*, 2012, v. 88, p.1077–86.

REPETTO, M. R.; REPETTO, M. Tabla de Concentraciones de xenobioticos en fluidos biologicos humanos como referencia para el diagnostico toxicologico. Instituto Nacional de Toxicologia y Ciencias Forenses. Area de Toxicologia de la Universidad de Sevilla. España, 2005.

STRIPEIKIS, J. A. et al. Determination of selenite and selenate in drinking water: a fully automatic on-line separation/pre-concentration system coupled to electrothermal atomic spectrometry with permanent chemical modifiers. *Analytica Chimica Acta*, 2004, v. 502, p.99–105.

SARI, A.; TUZEN, M. Adsorption of Pb(II) and Cr(III) from aqueous solution on Celtek clay. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, v. 144, 41-46.

SASWATI, R. D. et al. Mixed-ligand nickel(II) thiosemicarbazone complexes: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Polyhedron*, 2013, v.50, p.354-63.

SHIOBARA, Y.; SUZUKI, K. T. Binding of selenium (administered as selenite) to albumin after efflux from red blood cells. *Journal of Chromatography B*, 1998, v. 710, p.49-56.

SOARES, B. M. C.; SARON, E. S. Microanálise elemental de materiais: Aplicações do sistema SEM-EDX. *Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens, ITAL*, vol. 22, Nº 1, Jan/fev/mar – 2010.

SUNDE, R. A. Selenium. In: Bowman B, Russel R, editors. *Present Knowledge in nutrition*. 9 ed. Washington, DC: International Life Sciences Institute, 2006.

SUZUKI, K. T. Metabolomics of selenium: Se Metabolites Base on Speciation Studies. *Journal of Health Science*, 2005, v. 51, p.107-114.

TAVARES, C. R. G. et al. Isotermas de adsorção de cobre (II) sobre Biomassa fúngica morta. Anais do IV Encontro Brasileiro sobre Adsorção – EBA, Rio de Janeiro – RJ, 2003, p.24-31.

TERADA, K. Preconcentration of trace elements by sorption. Analytical Sciences, 1991, v. 7, p.187-97.

TOLU, J. et al. Selenium speciation analysis in trace level in soils. Analytica Chimica Acta, 2011, v. 684, p.126-33.

USDA - Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. Maryland: Agricultural Research Service. Available from: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>. Access in 2014 Aug.

ULSON, S. A. A.; SCHWANKE, R. O.; MALISKA, C. R. Medidas de Difusividade em Fase Líquida de Hidrocarbonetos Aromáticos em Zeólitas do Tipo Y. In: Anais do IV Encontro Brasileiro de Adsorção – EBA, Rio de Janeiro-RJ, p.1-8, 2003.

VERSIANI, L. C. F. Caracterização das propriedades coagulantes e adsorventes de íons Cd(II) em soluções aquosas apresentadas por biomateriais derivados das sementes *Moringa oleifera*. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

VILARINHO, A. L.; BACCAN, N. Estudos dos parâmetros analíticos para determinação de antimônio por AAS com geração de hidretos utilizando análise por injeção em fluxo. Tese de Doutorado. Unicamp- SP. 2001.

WAKE, B. D. et al. Modern preconcentration methods for the determination of selenium species in environmental water samples. Trends Analytical Chemistry, 2004, v. 23, p.491-500.

WELZ, B.; SUCMANOVA, M. L-Cysteine as a Reducing and Releasing Agent for the Determination of Antimony and Arsenic Using Flow Injection Hydride Generation. Atomic Absorption Spectrometry Part 1. Optimization of the Analytical Parameters. Analyst, 1993, v. 118, p.1417-23.

WHO. World Health Organization. Selenium. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap10.pdf>. Acesso em: abr. 2014.

ZHAO, Y. et al. Speciation analysis of selenium in rice samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. Talanta, 2011, v. 84, p.983-88.