

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDERSON DOS SANTOS GRECO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM CASTANHAS DO
CERRADO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA COM GERAÇÃO DE HIDRETO

DOURADOS/MS

2016

ANDERSON DOS SANTOS GRECO

Desenvolvimento de método analítico para determinação de selênio em castanhas do cerrado por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior

DOURADOS/MS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G791d Greco, Anderson dos Santos.
Desenvolvimento de método analítico para determinação de selênio em castanhas do cerrado por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto. / Anderson dos Santos Greco. – Dourados, MS : UFGD, 2016.
63f.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Castanhas. 2. HG-AAS. 3. Análise multivariada. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Selênio em Castanhas do Cerrado por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidreto”, de autoria de Anderson dos Santos Greco, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Marcela Zanetti Corazza
Membro Examinador (UFGD)

Profa. Dra. Claudia Andréa Lima Cardoso
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 29 de julho de 2016

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as oportunidades que colocou em minha vida, juntamente com toda a força para nunca desistir.

A minha família pela paciência, dedicação, incentivo e companheirismo.

Aos amigos pelo companheirismo e motivação nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, professor Dr. Jorge Luiz Raposo Jr, por seu apoio e amizade, além de sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados pelos ensinamentos e contribuição profissional.

A Universidade Federal da Grande Dourados e a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e estrutura oferecida.

Aos meus colegas do LECA pela ajuda prestativa durante a realização deste trabalho.

A profa. Dra. Marcela Zanetti Corazza (UFGD) que me mostrou os primeiros passos no desenvolvimento de procedimentos estatísticos.

A Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandona (UFGD) pelo fornecimento das amostras.

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (UEL) pela ajuda com as digestões das amostras em forno de micro-ondas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Ao FUNDECT e ao CNPq por todo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
Abs	Absorbância
AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica, do inglês <i>Atomic Fluorescence Spectrometry</i>
DPCSV	Voltametria de redissolução catódica, do inglês <i>Cathodic Stripping Voltammetry</i>
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, do inglês, <i>Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry</i>
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i>
FI-HG-GFAAS	Injeção de fluxo com geração de hidretos, acoplado a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite do Inglês <i>Flow Injection Hydride Generation, Coupled With Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy</i>
HG AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com geração de hidreto, do inglês <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidade, do inglês <i>High Density Lipoproteins</i>
HG	Gerador de Hidreto, do inglês <i>Hydride Generation</i>
HG-ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado com geração de Hidreto, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry Hydride Generation</i>
HG-ITA-FAAS	Sistema de aprisionamento de Átomos em Espectrometria de Absorção Atômica em chama com Geração de Hidreto, do inglês <i>Atoms Trapping System Flame Atomic Absorption Spectrometry with Hydride Generation</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IDR	Índice diário recomendado
LCO	Lâmpada de catodo oco
LC-UV-HG-AFS	Espectrometria de Fluorescência atômica Acoplada a Cromatografia líquida-irradiaçãoUV com geração de hidreto do inglês <i>Coupled Liquid Chromatography-UV Irradiation-hydride Generation-atomic Fluorescence Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
LQ	Limite de Quantificação

MFS	Espectrometria de Fluorescência Molecular, do inglês <i>Molecular Fluorescence Spectrometry</i>
RSD	Desvio padrão relativo
TS FF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Nebulização Térmica em tubo metálico aquecido na chama, do inglês <i>Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de Se em castanhas por espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de hidreto.	30
Tabela 2 - Planejamento fatorial completo de 23, feito em duplicata, utilizado para otimizar os parâmetros experimentais para a geração do hidreto de selênio.....	37
Tabela 3 - Matriz de experimentos do planejamento Doehlert utilizada para estabelecer as condições de geração do hidreto na determinação de Se em castanhas por HG AAS.....	40
Tabela 4 - Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 3 para geração do hidreto de Se.	42
Tabela 5 - Parâmetros de confiabilidade analítica relativos à determinação de Se em castanhas por HG AAS.....	45
Tabela 6 - Métodos analíticos para a determinação de selênio em amostras ambientais e biológicas.....	45
Tabela 7 - Procedimentos de decomposição de amostra por via úmida.....	47
Tabela 8 - Recuperação de Se em amostra de castanha digerida por via úmida em sistema fechado utilizando o procedimento 3.....	47
Tabela 9 - Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação (n= 3) dos teores de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de castanhas de bacuri e baru submetida ao procedimento de extração em banho de ultrassom.	48
Tabela 10 - Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação (n= 3) dos teores de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de castanhas de bacuri e baru utilizando o procedimento de preparo de amostra em bloco digestor em sistema refluxo.	50
Tabela 11 - Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação (n= 3) dos teores de Se em amostras de castanhas por HG AAS.....	50
Tabela 12 - Teor de selênio disponível nas castanhas	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto ilustrativa de amêndoas de Baru.	17
Figura 2 - Foto ilustrativa de amêndoas de Bacuri	19
Figura 3 - Foto ilustrativa de amêndoas de Bocaiuva.....	20
Figura 4 - Foto ilustrativa de amêndoas de caju	21
Figura 5 - Diagrama do sistema de geração de hidretos.	26
Figura 6 - Foto ilustrativa do sistema de geração de hidretos acoplado ao espectrômetro de absorção atômica em chama.	29
Figura 7 - Foto ilustrativa do bloco digestor.....	31
Figura 8 - Foto ilustrativa das amostras de castanhas oleaginosas: (a) baru, (b) bacuri, (c) bocaiuva e (d) caju.....	33
Figura 9 - Diagrama de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para a determinação de Se por HG AAS (intervalo de confiança em 95%).....	38
Figura 10 - Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido para a geração do hidreto de selênio por HG AAS.....	39
Figura 11 - Superfície de resposta obtida para a interação entre HCl vs NaBH ₄ vs Abs na otimização do processo de geração do hidreto de Se	41
Figura 12 - Curvas de resposta (a) e analítica (b) obtidas para a determinação de Se em castanhas por HG AAS utilizando as condições experimentais estabelecidas....	44

RESUMO

Castanhas, amêndoas e nozes são fontes alimentares que contêm elevado teor de gorduras mono- e poli-insaturadas e também são ricas em nutrientes como o selênio [1]. Neste sentido, este estudo descreve o desenvolvimento de um método espectroanalítico para a determinação de selênio (Se) em amostras de castanhas de bacuri (*Platonia insignis*), baru (*Dipteryx alata*), bocaiuva (*Acrocomia aculeata*) e caju (*Anacardium occidentale*, L.) empregando geração de hidreto acoplada à espectrometria de absorção atômica (HG AAS) como fonte de determinação. As melhores condições experimentais para gerar o hidreto volátil de Se (H_2Se) foram estabelecidas por meio da análise estatística multivariada completa 2^3 . De acordo com o diagrama de Pareto, as variáveis NaBH_4 e de HCl foram as que tiveram a maior influência no sistema, sendo devidamente avaliadas através de uma matriz de *Doehlert* para duas variáveis de acordo com a análise de variância (ANOVA), o valor de $F_{\text{calculado}}$ (6,737) foi menor que o valor de F_{tabelado} (18,51), a 95% de confiança. Os maiores sinais de absorbância para determinar Se foram obtidos com HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, 1,0% NaBH_4 (m/v) utilizando uma bobina de reação de 100 cm. Com taxa de aspiração de 1,0 mL/min para as soluções de HCl e de NaBH_4 e 8,0 mL/min para as soluções padrão e amostras, curvas analíticas no intervalo de $0,50 - 25,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidas com coeficientes de correlação linear superior a 0,9970, limites de detecção de $0,1315 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e desvio padrão relativo (%RSD) inferior a 1,9%. A precisão e exatidão do procedimento de preparo da amostra foram determinadas por teste de adição e recuperação, e os valores encontrados variaram de 90,3 – 95,5% com $\text{RSD} < 4,9\%$. O teor de Se nas amostras apresentaram intervalo de concentração entre $0,107 \pm 0,005 - 0,374 \pm 0,006 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. A análise multivariada aplicada aos resultados experimentais mostrou ser uma ferramenta bastante útil uma vez que permitiu reduzir a quantidade de experimentos e proporcionou sensibilidade, coeficiente de correlação e desvios padrão relativo satisfatórios para a determinação de Se pelo método proposto.

Palavras-chave: castanhas, HG-AAS, análise multivariada.

ABSTRACT

Nuts, almonds and walnuts are food sources that contain high levels of monounsaturated and polyunsaturated fats and are also rich in nutrients, such as selenium [1]. In this sense, this work describes the development of an analytical method for the determination of selenium (Se) in bacuri (*Platonia insignis*), baru (*Dipteryx alata*), bocaiuva (*Acrocomia aculeata*) and cashew (*Anacardium occidentale, L.*) nuts using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG AAS). The best experimental conditions to generate the volatile hydride of selenium (H_2Se) were established by multivariate statistical analysis. According to Pareto's diagram, $NaBH_4$ and HCl were those variables that presented significant influence on the system. According to these results, both parameters were systematically evaluated using Doehlert matrix, and according to the analysis of variance (ANOVA), the value of $F_{\text{calculated}}$ (6.737) was smaller than the value of F_{value} (18.51), at 95% confidence level, and p value obtained for the lack of fit was 0.121886. The highest absorbance signals to determine Se were obtained with 0.6 mol L^{-1} HCl, 1.0% (w/v) $NaBH_4$ using a reaction coil of 100 cm. Using a flow rate of 1.0 mL for solution of HCl and for $NaBH_4$ and 8.0 mL to the standard and samples solutions, analytical curves in the range of $0.50 - 25.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ were obtained with linear correlation coefficients better than 0.9970, with detection limits of $0.1315 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and relative standard deviation (% RSD) less than 1.9%. The precision and accuracy of the sample preparation procedure and method determination were evaluated by addition and recovery test, and found values ranged from 90.3 to 95.5% with RSD <4.9%. The Se content in the samples showed concentrations in the $0.107 \pm 0.005 - 0.374 \pm 0.006 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ range. The multivariate analysis applied to the experimental results showed to be a useful tool because allows reducing the number of experiments with sensitivity, correlation coefficient and relative standard deviations satisfactory to determine Se in Brazilian nuts.

Keywords: Nut, HG AAS, multivariate analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
3.1	O selênio	14
3.2	Castanhas e amêndoas: características, funções e propriedades	15
3.2.1	Baru.....	16
3.2.2	Bacuri.....	18
3.2.3	Bocaiuva	19
3.2.4	Castanhas-de-caju.....	20
3.3	Preparo de amostra para a determinação de elementos inorgânicos	22
3.3.1	Tratamento das amostras	23
3.3.2	Técnica para o pré-tratamento de amostras	24
3.4	Determinação de selênio em castanhas.....	24
3.5	Análise estatística multivariada	27
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	29
4.1	Instrumentações e acessórios	29
4.3	Amostragem, pré-tratamento e preparo da amostras.....	32
4.3.1	Decomposição de amostra em bomba digestora:.....	33
4.3.2	Extração de analito em banho de ultrassom	33
4.3.3	Decomposição das amostras em sistema aberto com refluxo	34
4.4	Procedimento de pré-redução.....	34
4.5	Método para determinação de Se em castanhas por HG AAS	34
4.5.1	Aplicação da análise multivariada na otimização das variáveis de redução e geração do hidreto	34
4.5.2	Procedimento de medida experimental	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Avaliação da estatística multivariada aplicada ao sistema HG AAS na otimização das condições de geração do hidreto de Se.....	36
5.2	Método para determinação de Se em castanhas por HG AAS	43
5.3	Avaliação dos procedimentos de preparo de amostra	46
5.4	Determinação de Se em castanhas por HG AAS	50
6	CONCLUSÕES	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Selênio (Se) é um micronutriente essencial para os seres humanos e animais, pois apresenta diversas ações fisiológicas [2-4] e pode ser encontrado na natureza em diversos estados de oxidação [5], sendo o estado elementar o de menor toxicidade [6].

A ingestão adequada de Se na dieta humana é uma prática bastante recomendada, uma vez que este mineral participa do sítio ativo da enzima antioxidante glutathione peroxidase [7] que atua no interior da célula convertendo compostos tóxicos em atóxicos, resultando na redução de radicais livres [8-9], além de fortalecer as defesas do organismo [9]. Seu consumo pode acarretar numa melhora da saúde, benefícios tais como redução da incidência de doenças do coração, sendo então uma fonte benéfica à saúde, mesmo sendo comprovado o seu alto teor lipídico [10].

Neste sentido, a *Food and Nutrition Board* definiu recomendações diárias de selênio no ano de 2000, que estabeleceu os níveis de 55 a 70 mcg/dia para homens, mulheres e adolescentes de 14 a 18 anos de idade [11]. Alimentos como castanhas, frutos do mar, aves, carnes vermelhas, grãos de aveia e arroz integral são considerados fontes de selênio [12], além da presença natural deste elemento no solo em níveis de até $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ [13].

As castanhas, de uma forma geral, são consideradas excelentes fontes nutricionais de selênio [14], e dentre as diversas espécies indicadas para o consumo humano, a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) tem destaque mundial por conter teores de até $0,510 \text{ mg g}^{-1}$ de selênio [13,15]. Além das castanhas é possível encontrar diversas espécies ricas em selênio, e que possuem grande importância agrônômica, com destaque para os gêneros *Allium* (cebola, alho, alho-porro etc.) e *Brassica* (couve, couve-flor, mostarda, colza, couve-de-bruxelas, nabo, rabanete etc.) [13].

Com o aumento da produção nacional e a diversidade de produtos e espécies de castanhas existentes em todo o território brasileiro, o interesse pelo conhecimento de novas espécies e produtos tem motivado a comunidade produtora e também a científica. No entanto, é necessário que estes novos produtos sejam submetidos a um controle de qualidade eficiente para o acesso seguro pela comunidade alimentícia.

A determinação de Se, pode ser realizada utilizando técnicas analíticas com elevada sensibilidade, seletividade e que permitem determinar a presença deste elemento em baixíssimas concentrações [16,17]. Neste sentido, o selênio pode ser determinado empregando a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) [18] ou molecular (MFS)

[19], a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [16], pela espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) [16,20] ou através da geração de hidretos (HG AAS) [16,17]. Esta última, HG AAS, oferece uma alternativa bastante eficiente, simples e sensível para a determinação de elementos que podem ser convertidos em hidretos [21,22], proporcionando limites de detecção satisfatórios quando comparados com as técnicas convencionais [23-25] e que pode ser aplicada na determinação de selênio em diferentes tipos de amostras [26].

Desta forma, o objetivo deste estudo foi estabelecer um procedimento de preparo de amostra e um método de determinação de selênio em castanhas do cerrado empregando a geração de hidreto acoplado a espectrometria de absorção atômica.

2 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo determinar os teores de selênio em amostras de castanhas do cerrado empregando a espectrometria de absorção atômica acoplada a geração de hidretos. Para isso as seguintes metas fazem parte do trabalho:

- a) Estabelecer o procedimento de preparo de amostra utilizando a decomposição ácida por via úmida com aquecimento em bloco digestor, ultrassom, bomba digestora;
- b) Utilizar a análise estatística multivariada para estabelecer as melhores condições para gerar o hidreto de selênio no acoplamento HG AAS;
- c) Aplicar o método analítico estabelecido na determinação de Se em castanhas de baru, bacuri, bocaiuva e caju, estabelecendo os principais parâmetros de confiabilidade analítica;
- d) Estabelecer a relação entre o teor de Se determinado nas amostras com a dose diária necessária.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O selênio

O selênio é um micronutriente pertencente ao grupo 16 da tabela periódica, ou seja, ao grupo dos não-metais, foi identificado em 1817 pelo químico *Jons Jacob Berzelius* [27], possui número atômico 34 e massa atômica 78,96 u. Dentre as principais características físico-químicas podemos citar o ponto de fusão em 217,0 °C, o ponto de ebulição em 685,0 °C, eletronegatividade de 2,55, calor específico de 320 J/(kg·K), condutividade térmica de 2,04 W/(m·K) e potencial de ionização de 941 KJ mol⁻¹. O Se está presente nos estados de oxidação -2, 0, +2, +4 e +6, sendo o selenito (SeO₃²⁻), selenato (SeO₄²⁻), selenocisteína (C₃H₇NO₂Se), selenometionina (C₅H₁₁NO₂Se), selenometilcisteína (C₄H₉NO₂Se) e selenocistina (C₆H₁₂N₂O₄Se₂) as principais formas de selênio disponível na natureza [28].

Por desempenhar papel importante como agente anti-oxidante e anticancerígeno, o selênio é um elemento essencial para todos os tipos de vida, tanto animal quanto vegetal [26,13]. O selênio em conjunto com a glândula tireóide, participa da síntese de dois importantes hormônios, o tri-iodotironina (T3), a forma ativa que ocorre no fígado, rins e tireoide, e o tiroxina (T4), a forma inativa produzida apenas pela tireoide, hormônios cujas principais funções são aumentar ou diminuir o metabolismo celular [29]. No entanto, a diferença entre o teor essencial e o tóxico é bastante estreita, uma vez que a dose tóxica é somente 100 vezes maiores do que as necessárias para as funções fisiológicas [26].

O selênio é um elemento bastante presente na crosta terrestre e na água [30], sendo que a biodiversidade em solos depende mais da forma química do que da concentração total [13]. Quando presente na forma inorgânica, as formas SeO₄²⁻ (selenato), SeO₃²⁻ (selenito), Se²⁻ (seleneto) e Se⁰ (selênio elementar) são as mais frequentes [31].

A ingestão adequada de selênio confere diversos benefícios para o ser humano, sendo um elemento protetor no caso de doenças crônicas como a aterosclerose, câncer, artrite, cirrose e enfisema, além retardar o envelhecimento, preserva a elasticidade dos tecidos, previne o câncer e neutraliza os radicais livres [15]. A toxicidade do selênio pode acarretar perda de cabelo e unha, irritabilidade, fadiga, aborto e infertilidade [32]. Entretanto, a deficiência também deve ser avaliada, pois, embora esse nutriente tenha sua principal função ligada à atividade antioxidante, também pode haver interferência no metabolismo da glândula tireoide [32].

Dentre os oxianions de selênio presentes nos solos, o selenato é mais solúvel em água, e é facilmente lixiviado para a fase aquosa [27]. Geralmente o selenito, apresenta maior capacidade de adsorver as partículas do solo quando comparado com o selenato. Desta maneira, o Selenato é mais móvel e pode estar mais disponível para as plantas, especialmente em solos com maior capacidade oxidante, com pH neutro ou levemente alcalino, o que favorece a formação de oxianions como SeO_4^{2-} [27]. O Se^0 , ou selênio elementar, ocorre principalmente em solos sobre condições redutoras, é mais insolúvel e apresenta toxicidade muito baixa [13,27]. A presença de selênio em solos podem variar de acordo com a região, formação geológica [31], pH, conteúdo de óxido de ferro e alumínio, atividade microbiana, potencial de redução, teor de matéria orgânica, argila etc [13]. Entretanto, o Se^{2-} é um gás altamente tóxico e pode ser rapidamente oxidado para o não tóxico (Se^0) na presença de ar [33].

As plantas tem grande facilidade em absorver o selênio em sua forma mais oxidada selenato (VI), pois este se encontra mais disponível em solos, quando se observa a quantidade existente de selenato (VI), é possível determinar um grande aculo nas folhas e comparação com o selenito que se encontra mais concentrado nas raízes, e dentre as espécies conhecidas como acumuladoras de Se podemos destacar as espécies alho (*Allium sativum* L.), cebola (*Allium cepa* L.), brócolis (*Brassica oleracea* L.) e o alho-porro (*Allium tricoccum* L.) [34,35] Em casos especiais, algumas espécies de castanhas, nozes e amêndoas apresentam quantidades bastante elevadas de Se e são consumidas para garantir a dose diária de selênio [13]. Trata-se de produtos de exportação bastante apreciados em países desenvolvidos como o EUA, onde tem despertado bastante a atenção por parte de alguns pesquisadores [13]. No entanto, uma desvantagem em utilizar nozes como fonte dietética de selênio é que elas podem acumular elementos químicos potencialmente perigosos como radio e bário [13].

3.2 Castanhas e amêndoas: características, funções e propriedades

O Brasil é um dos países que apresenta maior diversidade e disponibilidade de plantas nativas do mundo, possuindo uma grande diversidade genética, sendo a região amazônica a principal reserva. Outros centros também contribuem na produção de castanhas ou de espécies nativas como os cerrados do Brasil Central e o Nordeste [36]. Mundialmente conhecidas como *brasilian nuts* (*bertholletia excelsa*) as nozes–do-para ou nozes brasileiras,

são produtos do extrativismo vegetal colhida por seringueiros e demais trabalhadores da região amazônica [13].

A castanha-do-Brasil, pertencente à família das *Lecythidaceae*, é a mais conhecida e possui grande utilidade comercial e industrial. Esta castanha é popularmente conhecida como castanha do Brasil, castanha-do-pará, castanha-da-amazônia, castanha, castanheira, castanha-verdadeira, castanheiro, amendoeira-da-américa, castanha-mansa, e podem ser encontradas em toda a região amazônica incluindo os estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Pará, Roraima, Tocantins e Mato Grosso, bem como na Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guianas [37]. As sementes ou “castanhas” apresentam em sua composição um alto valor nutritivo, podendo ser consumida “*in natura*” ou em mistura com outros alimentos [37].

Os diversos tipos de castanhas são bastante utilizados como ingredientes da indústria alimentícia e na área de cosmética [15]. O óleo extraído destas espécies é muito utilizado na fabricação de cosméticos e fitoterápicos, já o principal destino das cascas é a produção de biocombustível, fabricação de tapetes, peças de artesanato e composição de tintas [38]. Informações nutricionais sobre algumas espécies de castanhas ainda são bem insipientes, e devido a essa falta de conhecimento, algumas espécies de castanhas são pouco aproveitadas [39].

Em relação às amêndoas, fruto oleaginoso contidos no interior do ouriço da castanha, estas são muito utilizadas como alimento, uma vez que são ricas em cálcio, ferro, proteínas, gorduras e carboidratos [40]. As amêndoas são excelentes fontes nutritivas, apresentando composição média, com base em 100 g da fruta, de: 18,6 g de proteínas, 254 mg de cálcio, 475 mg de fósforo, 4,4 mg de ferro e 0,67 mg de vitamina B2 [41]. Algumas espécies como o Baru, o Bacuri e a Bocaiúva, merecem destaque e serão discutidos à seguir.

3.2.1 Baru

A amêndoa do Baru (*Dipteryx alata* Vog.) (Figura 1), proveniente do fruto do barueiro, leguminosa arbórea lenhosa nativa do Cerrado, é classificado como um fruto do tipo drupa [42], isto é, que possui uma polpa fibrosa com um centro endurecido contendo uma única semente comestível [43].

Figura 1 - Foto ilustrativa de amêndoas de Barú.



Fonte: Próprio autor

O barú possui diversos nomes populares, tais como: fruta-de-macaco, castanha-de-burro, cumaru, cumbaru, barujo, castanha-de-ferro, coco-feijão, cumaru-da-folha-grande, cumarurana, cumaru-verdadeiro, cumaru-roxo, cumbaru, emburena-brava, meripará, e pau-cumaru [43]. O barú é constituído por uma casca fina e escura de coloração marrom, polpa com sabor adocicado e adstringente a qual abriga uma amêndoa dura e comestível [43]. Sua castanha representa 5% do rendimento em relação ao fruto inteiro, possui valor de mercado considerável, sendo a polpa ainda pouco utilizada na alimentação humana [44].

A amêndoa de barú apresenta um teor considerável de diversos minerais, entre eles alguns estudos destaca o cálcio, ferro, zinco e selênio [15], que podem contribuir em carências nutricionais e atuam em funções enzimáticas, reguladoras do zinco e do selênio, como parte do sistema de defesa antioxidante do organismo [42].

A amêndoa de barú merece destaque por ser um alimento que se encontra em diversas regiões e de fácil acesso, apresenta um grande potencial agrícola e tecnológico, podendo ser utilizada em substituição ou associada ao amendoim, castanha-de-caju e castanha-do-pará. Além do diversificado aproveitamento tecnológico, o barú tem diversas possibilidades de seleção para propagação da espécie, uma vez que vários autores constataram grande variabilidade das características físicas e nutricionais da amêndoa de

baru entre plantas de diferentes regiões, assim como dentro de uma mesma subpopulação do Cerrado [43].

3.2.2 Bacuri

O bacuri (*Platonia insignis* Mart.) (Figura 2) é um fruto com baga uniloculada, possui formato arredondado, ovalado ou achatado, casca grossa, de cor amarelo-citrina, contém polpa viscosa [48] e peso médio de 300g. O fruto bacuri é nativo da região amazônica, é composto de polpa, casca e sementes [44]. O número de castanhas no interior do fruto pode variar de 1 a 5 [45], e pode ser consumido na forma *in natura* ou fazer parte da composição de outros alimentos do setor agroindustrial, alimentício [46] ou farmacêutico [44,47,48]. Desta maneira, o bacuri apresenta grande potencial, tanto sob o ponto de vista do seu processamento industrial, quanto pelo sabor e aroma agradável, o que permite utilizar a polpa do fruto como agente aromatizante em sorvetes, geleias, iogurtes, cremes, refrescos e compotas [47,49].

Embora seja muito conhecido como uma planta frutífera, o bacurizeiro também apresenta madeira com boas características físico-mecânicas e multiplicidade de usos, podendo ser útil na fabricação de móveis [50].

O bacuri apresenta altas concentrações de cálcio, ferro e fósforo, onde são essenciais para o desenvolvimento saudável dos ossos e dentes [51]. O bacuri também é considerado um remédio natural contra reumatismo e artrite, já que a vitamina C presente tem ação benéfica no fortalecimento imunológico do corpo [51].

Figura 2 - Foto ilustrativa de amêndoas de Bacuri



Fonte: Próprio autor

3.2.3 Bocaiuva

A palmeira bocaiúva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) (Figura 3) é espécie nativa das florestas tropicais, cuja principal característica é a presença de espinhos escuros, longos e pontiagudos na região dos nós [52].

A bocaiuva também conhecida, macacaúba, macaiba, macaibeira, macajuba, macaúba, macaúva, mucaia, mucajá, entre outros [53], é uma espécie comum de palmeira encontrada no Pará, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul [54]. Tradicionalmente, a comunidade da região do Pantanal mato-grossense utiliza as folhas na produção de redes e cordas, seus frutos e sementes para diversos fins como produção de biodiesel e também o uso doméstico alimentar [52,55]. O fruto apresenta uma semente comestível que pode ser consumido *in natura*, na forma cozida, e na composição de sorvetes, biscoitos, bolos [54] ou em doces de amendoim moído e de coco [56]. Da castanha, também é possível obter um óleo incolor, muito utilizado no lugar do azeite [56].

Figura 3 - Foto ilustrativa de amêndoas de Bocaiuva



Fonte: Próprio autor

A utilização da Bocaiúva na prevenção de doenças tem aumentado recentemente, principalmente por auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e doenças do sistema imunológico [57]. Sua polpa pode ser utilizada para uso medicinal, tratamento de doenças respiratórias e propriedades analgésicas [52]. Além disso, estudos farmacológicos demonstraram seus efeitos sobre a redução do colesterol e glicose [58].

Em relação à composição química, os trabalhos apresentados na literatura têm mostrado que esta castanha apresenta elevados teores de β -caroteno, α -tocoferol e ácido oleico na polpa, porém mesmo sendo amplamente utilizada pela população, há pouca informação disponível na literatura sobre os efeitos terapêuticos ou tóxicos dessa espécie [59].

A bocaiúva pode ser utilizada para enriquecer nutritivamente uma formulação nutracêutica, ou seja, seu extrato apresenta alto potencial nutracêutico, por ser rica em carboidratos, fibras, lipídeos, proteínas e minerais como cobre, zinco e potássio, tornando-se uma excelente fonte de nutrientes para as crianças e os adultos [53].

3.2.4 Castanhas-de-caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale, L.*), é uma árvore originária do Brasil de porte médio, típica de clima tropical, e presente em quase todo o território nacional, além de países da África e Ásia [60]. É conhecida também pelos nomes derivados do original na

língua tupi (acayu): acaju, acajaíba, caju-comum, cajueiro-comum, cajuil, caju-manso, cajuzeiro e ocaju [61].

O caju apresenta especial interesse nutricional e econômico, pela qualidade de sua castanha e pela riqueza em vitamina C da polpa comestível, ou seja, do pseudofruto [62].

Assim como outras nozes, a amêndoa de castanha-de-caju (Figura 4) é tipicamente consumida inteira (crua, torrada ou salgada) em lanches diários ou usada como ingrediente para uma variedade de alimentos processados [60]. Também pode ser utilizada como ingrediente para saladas, iogurtes e outros alimentos em qualquer época do ano [63].

Figura 4 - Foto ilustrativa de amêndoas de caju



Fonte: Próprio autor

A amêndoa da castanha-de-caju constitui-se em um dos principais produtos de utilização do cajueiro, sendo muito rica em proteínas, lipídios, carboidratos, fósforo e ferro, além de zinco, magnésio, proteínas e fibras, onde da amêndoa também pode ser extraído um óleo que pode ser utilizado como substituto do azeite de oliva [61]. Ainda em sua composição mineral também é possível observar a presença de selênio, embora não em grande quantidade como na castanha-do-pará [42]. Sendo que a quantidade disponível de selênio em castanhas-do-pará pode variar de região para região sendo relatadas concentrações de 0,5 a 3,5 mg kg⁻¹ em amostras coletadas no Acre, 0,5 a 2 mg kg⁻¹ em amostras do Mato Grosso, 20 a 82 mg kg⁻¹ em amostras do Amapá e 11 a 98 mg kg⁻¹ em amostras do Amazonas [42].

A castanha-de-caju é rica em gorduras monoinsaturada e poli-insaturadas, que diminuem o colesterol ruim (LDL) e aumentam o bom (HDL), além de fortalecer ossos, músculos e o sistema imunológico [61]. A castanha-de-caju faz parte do grupo das oleaginosas (assim como as nozes, avelãs e amêndoas) e possui um sabor bem característico ao paladar brasileiro [63].

Os principais produtores mundiais da castanha de caju são Índia, Brasil, Moçambique, Tanzânia e Quênia [64]. No Brasil, a agroindústria do caju está concentrada no Nordeste, nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, que participam com 99 % da produção [64].

3.3 Preparo de amostra para a determinação de elementos inorgânicos

O maior problema no preparo de uma amostra para análises de elementos na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ é o risco de contaminação proveniente de diferentes fontes, como o grau de pureza do reagente empregado, os frascos utilizados para estocagem, digestão e diluição das amostras, ou aos erros relacionados à coleta e manipulação das amostras [65].

As etapas que antecedem esse momento devem ser realizadas com muita atenção e cuidado, pois a etapa de pré-tratamento é uma das mais importantes, pois quando bem executada pode evitar alguns erros sistemáticos provenientes de contaminação, perda de material por volatilização ou digestão incompleta, fatores estes que interferem de uma forma muito significativa no resultado final, tal etapa é composta por higienização/limpeza, secagem, moagem e por fim a conversão da amostra em uma solução verdadeira [11,67].

Outro grande problema encontrado na determinação de minerais na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ é a sensibilidade das técnicas espectrométricas, sendo necessário por vezes o emprego de técnicas de pré-concentração [65]. Tanto quando se trabalha com espectrometria de absorção atômica como em outras técnicas espectrométricas, é muito importante que toda a amostra original seja convertida em uma solução aquosa, onde o procedimento mais utilizado para determinar as espécies de interesse na matriz é a digestão ácida [66, 67]. Essa etapa além de ser bastante crítica, consome a maior parte do tempo utilizado em uma análise química e também pode ser uma grande fonte de erros [66, 67].

Os procedimentos de conversão de amostras sólidas em soluções verdadeiras para determinação elementar empregando técnicas espectrométricas podem ser divididos em procedimentos de tratamento por via úmida e por via seca [66, 67,68].

3.3.1 Tratamento das amostras

Normalmente em amostras vegetais são determinados os teores totais dos elementos, sendo que os procedimentos mais utilizados para o preparo de amostras são por via úmida [65]. Para tais digestões costuma-se fazer uso de ácidos minerais diluídos ou concentrados ou ainda misturas de ácidos em sistemas abertos ou fechados, com ou sem aquecimento, na presença ou ausência de pressão [66,67,68] sob radiações ultravioletas [67,69], ultrassônicas [70] ou de microondas [71-74].

No processo de digestão das amostras Ácidos clorídrico, nítrico, sulfúrico, perclórico e fluorídrico podem ser utilizado [66,67]. Durante a escolha do ácido mais adequado para tal processo, algumas propriedades devem ser levadas em consideração como o ponto de ebulição, poder oxidante, grau de pureza e aspectos relacionados à segurança de manipulação desses ácidos [67,71].

Para o preparo de alguns tipos de amostras, é preciso realizar uma variação na proporção das misturas dos ácidos, tendo como exemplo matrizes com elevado teor de matéria orgânica ou até mesmo amostras de ligas metálicas [67,71,68] Durante o processo de digestão pode se utilizar peróxido de hidrogênio juntamente com tais ácidos que quando utilizados concentrados apresentam alto poder oxidante. Algumas misturas são bastantes conhecidas e utilizadas entre elas: HNO_3 , H_2SO_4 , HCl , HClO_4 , HNO_3+HCl , $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$, $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4+\text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{HClO}_4+\text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{H}_2\text{SO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ [65].

A maioria das amostras são totalmente oxidadas, deixando os elementos a serem determinada na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriada para análise [65]. Alguns elementos podem ser perdidos por completo ou parcialmente por volatilização, podendo ser incluídos os halogênios, além de Sb, As, B, Hg e Se, para tais circunstâncias é recomendado o procedimento de digestão em sistema fechado tendo como exemplo o uso de fornos com micro-ondas [65,67].

Procedimentos que requerem o uso de energia térmica, ultrassônica e energia radiante (micro-ondas, radiação UV etc.) podem ser utilizadas para decomposição da matéria por via úmida [71,68], sendo que para tais processo, pode ser destacado a baixa quantidade de reagentes utilizados [71,67].

3.3.2 Técnica para o pré-tratamento de amostras

Diversos tipos de amostras podem ser submetidas ao aquecimento, entre os métodos podem ser os seguintes bicos de gás, blocos digestores, chapas de aquecimento, muflas e estufas [67,71].

Os procedimentos de decomposição que utilizam energia térmica requerem bastante tempo para converter toda amostra sólida em uma solução e podem necessitar de constante observação, atentando-se sempre ao ponto de ebulição das soluções, pois podem surgir diversos problemas, entre os quais a perda por volatilização [71].

Para a prevenção de possíveis problemas é indicado o uso de tratamento de amostras em sistema fechado pois permite contornar os problemas de perdas de analitos e possíveis contaminações [67,71,72,75].

3.4 Determinação de selênio em castanhas

O selênio pode ser determinado em baixíssimos níveis em diversos tipos de amostras ambientais e biológicas, geralmente na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$ (microgramas por kilograma) [13]. Porém a escolha do método utilizado deve ser avaliada, levando em consideração fatores como disponibilidade do equipamento, tempo, complexidade do processamento das amostras, reprodutibilidade, sensibilidade e o limite de detecção [20].

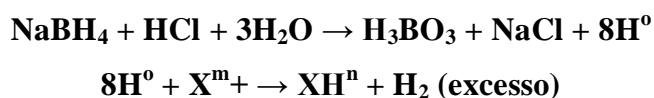
Neste sentido, o selênio pode ser determinado empregando a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) [18] ou molecular (MFS), [19] a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [16], pela espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) [16,20] ou pela espectrometria de absorção atômica acoplada à geração de hidretos (HG AAS) [16,17]. Esta última, a espectrometria de absorção atômica acoplada à geração de hidretos, oferece uma alternativa bastante eficiente, simples e sensível para a determinação de elementos que podem ser convertidos em hidretos [21,22], proporcionando limites de detecção satisfatórios quando comparados com as técnicas convencionais [23-25] e pode ser aplicada na determinação de selênio em diferentes tipos de amostras [27].

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica bastante sensível e seletiva [76], porque permite efetuar a determinação de espécies inorgânicas (metais) em concentrações extremamente baixas [77]. O princípio da técnica se baseia que os átomos livres possam absorver a luz de uma fonte de radiação com um comprimento de onda

específico para cada elemento, onde na maioria dos instrumentos de absorção atômica a fonte de luz utilizada é a lâmpada de catodo oco [66]. Diversas misturas gasosas de combustível/oxidante podem ser utilizadas na espectrometria de chama para a volatilização das amostras, tendo como exemplo o ar-acetileno e óxido nitroso-acetileno [78], onde a temperatura utilizada nesse processo deve ser suficiente para a dissociação das moléculas [66].

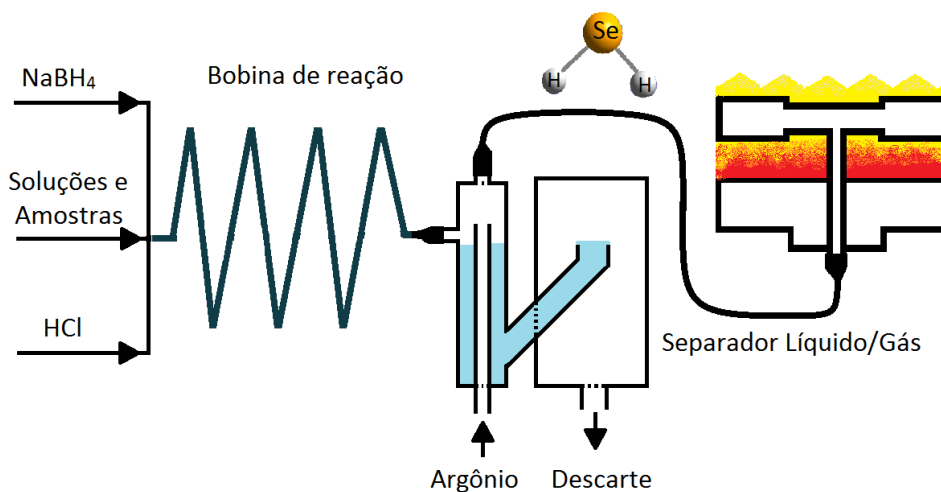
Sabendo que o teor de Se nesta classe de amostra é da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$, é extremamente importante adequar a sensibilidade do equipamento para o teor disponível na amostra. Neste sentido, para a determinação de Se, cuja concentração natural ultrapassa o limite de detecção dos equipamentos que operam em modo chama, a determinação realizada com auxílio da geração de hidreto é uma estratégia bastante utilizada, uma vez que a sensibilidade da técnica para a determinação dos elementos que formam hidreto (p. ex. As, Se, Bi etc) é bastante elevada, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ [18,20,25,79,80].

A geração de hidretos acoplada à técnica de espectrometria de absorção atômica baseia-se na geração do hidreto volátil por meio de uma reação química, onde o transporte do hidreto volátil para o atomizador ocorre sob o fluxo de um gás inerte. Para a geração do hidreto é utilizado agentes redutores, sendo o NaBH_4 em meio alcalino e o SnCl_2 em meio ácido são os agentes redutores mais utilizados, devido a sua eficiência e reprodutividade durante as medidas [81,82]. O processo de formação do hidreto ocorre a partir da evolução de hidrogênio atômico, que é formada através da hidrólise ácida do agente redutor [79,83], cujo mecanismo [18,84] de formação do hidreto está escrito a seguir:



O vapor formado através da reação entre o analito presente na amostra e os reagentes (NaBH_4 e ácido clorídrico) é conduzido por meio de um fluxo de gás inerte para um tubo de quartzo aquecido em chama como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Diagrama do sistema de geração de hidretos.



Fonte: Próprio autor

Para que o elemento seja determinado com elevada seletividade, a otimização do método para a determinação de Se por HG AAS deve ser estabelecido de modo que apresente sensibilidade satisfatória. Concentração do agente redutor, concentração da solução ácida, comprimento da bobina e vazão das soluções utilizadas são os principais parâmetros avaliados para alcançar condições ideais e satisfatórias na determinação de Se [26,85-87]. No processo de geração do hidreto de Se, a princípio somente o Se (IV) tem preferência para formar o hidreto (H_2Se), no entanto se o Se (VI) for reduzido a Se (IV) é possível determinar a concentração de Se total na amostra [88], ou seja, é necessária uma etapa de pré-redução de Se (VI) para o (IV) [24], o que convencionalmente é feito com auxílio de iodeto de potássio [24].

Entre as principais vantagens e características da técnica de geração química de vapor estão: (a) geralmente apenas o analito forma a espécie volátil, então esse passa a ser o único componente da amostra a ser atomizado, evitando possíveis interferências [18,89]; (b) é um sistema de introdução da amostra muito eficiente sendo que o transporte do vapor químico formado pode atingir 100% [18,81]; (c) apresenta melhores limites de detecção, pois a maior eficiência de transporte leva à maior sensibilidade [25]; (d) a determinação pode ser efetuada por qualquer um dos métodos de espectrometria atômica, seja por absorção ou emissão atômica [90] e (e) pode ser acoplada a sistemas que exploram a especiação [18,90]. No entanto, dentre as limitações podemos incluir: (a) suscetibilidade a interferências por concomitantes que possam impedir a reação de geração de vapor [16,18]; (b) fatores físicos associados à solução (densidade, viscosidade, volume etc), que podem

interferir na formação do vapor [89]; (c) o pH e as concentrações dos reagentes podem ser críticos para alguns elementos [16] e (d) o estado de oxidação ou a forma do analito podem ser decisivos [16,18].

3.5 Análise estatística multivariada

Durante a validação e/ou otimização das condições experimentais, estabelecer parâmetros que conduzam para o resultado satisfatório é sempre desejado, uma vez que o uso de condições preliminares e com ausência de confiabilidade pode fornecer resultados pouco confiáveis. Neste sentido, a análise estatística multivariada é uma ferramenta de extrema importância e que pode ser aplicada com êxito em Química Analítica porque permite estabelecer as condições ideais para a determinação do(s) elemento(s) de interesse após o tratamento dos dados obtidos com número reduzido de experimentos. Contudo, para planejar e conduzir um experimento com auxílio da análise estatística é necessário conhecer previamente o comportamento preliminar das variáveis envolvidas no processo (experimento) [44].

Para obter êxito na utilização da estatística multivariada, o ideal é estabelecer um planejamento experimental que envolva as variáveis utilizadas no método de determinação, o que permite identificar os possíveis fatores que influenciam no sistema, seja esta de maneira positiva ou negativa [91,92]. Na otimização das condições experimentais, é bastante comum utilizar planejamentos fatoriais completos ou fracionários, uma vez que estes permitem reduzir o número de experimentos necessários, os quais minimizam o uso de reagentes e resíduos gerados, reduz tempo e elimina algumas variáveis que não são significativas no experimento [92].

Em um planejamento fatorial a influência de todas as variáveis experimentais independentes, e a interação entre elas no sistema é investigada. Se a combinação de k fatores (variáveis) é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos [93]. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos (*p. ex.* concentrações de uma substância, valores de pH etc.) são representados pelos sinais (+) e (-), isto é, os valores máximos e mínimos utilizados para avaliar o comportamento das variáveis, respectivamente [92,94]. Para se obter respostas significativas é necessário fazer um levantamento preliminar das variáveis mais significativas e fazer o planejamento fatorial identificando os níveis mais adequados para cada fator [95].

Para fatores qualitativos como tipo (natureza) do ácido, os valores máximos e mínimos ficam a critério do operador, de maneira a estabelecer algum parâmetro físico-químico para classificar os ácidos envolvidos.

É muito comum aplicar o diagrama de Pareto para avaliar os resultados iniciais obtidos de forma experimental, haja vista que este diagrama é uma representação gráfica que fornece as possíveis causas e efeitos para o experimento de interesse [95]. Com o diagrama de Pareto é possível observar todos os fatores de forma independente, as interações entre as variáveis e identificar as mais significativas [96]. Diante das informações obtidas por meio do diagrama de Pareto, é possível avaliar as variáveis significativas de maneira mais restrita, ou seja, obter respostas mais precisas sobre o sistema avaliado. Esta avaliação pode ser feita utilizando a metodologia de superfície de resposta, na qual modelos matemáticos são utilizados para alcançar a resposta para um sistema experimental ideal [97].

A análise do experimento de segunda ordem, proposto por *David H. Doehlert* em 1970 [98], cujo modelo matemático é representado pela superfície de resposta permite obter os valores de máximo ou mínimo experimental [98]. A matriz de *Doehlert*, quando aplicada para duas variáveis independentes, consiste de um ponto central e mais seis pontos formando um hexágono regular situado sobre um círculo em três dimensões que pode ser visto de diferentes maneiras, dependendo da estrutura geométrica selecionada [99].

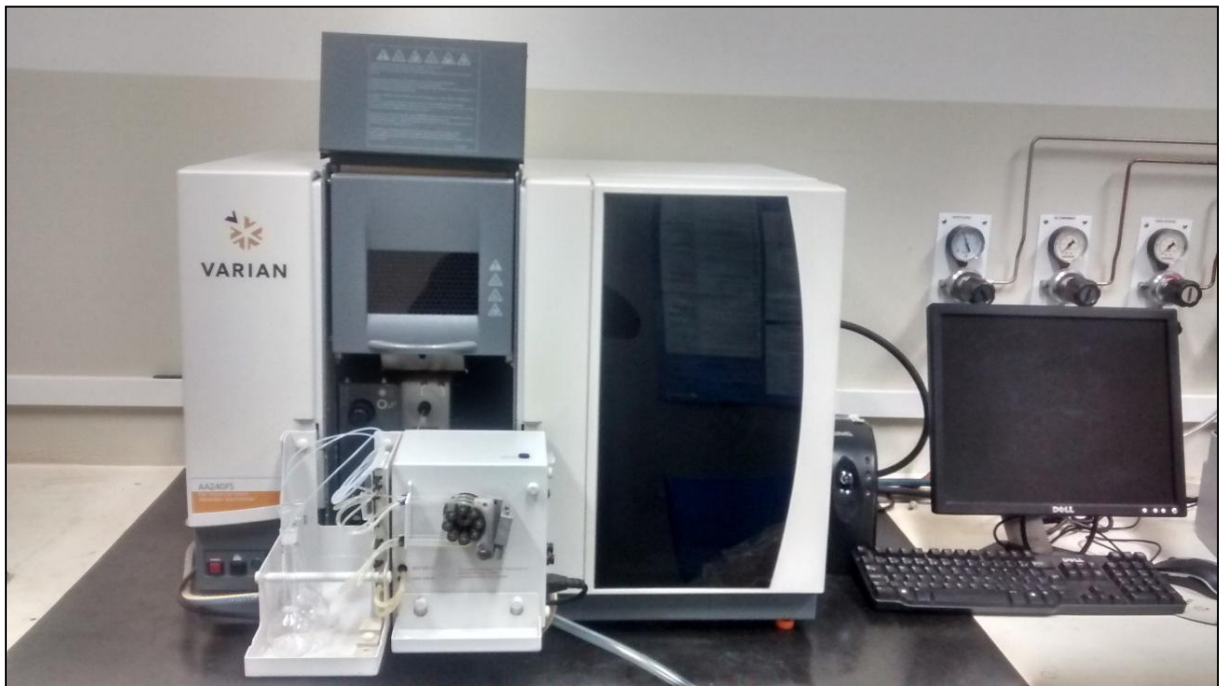
De maneira geral, para que o modelo matemático aplicado aos resultados experimentais obtidos em Química Analítica apresente resultados satisfatórios, este deve reunir alguns critérios desejáveis, sendo os principais: proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigir o preparo de poucos experimentos e fornecer condições satisfatórias para a avaliação dos coeficientes e do modelo obtido, ou seja, da regressão e da falta de ajuste [100,101].

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentações e acessórios

Para as medidas experimentais, um sistema de gerador de hidretos *VGA 77* (*Agilent Technologies*[®], Santa Clara, CA, EUA) acoplado ao espectrômetro de absorção atômica em chama *AA 240FS* (*Agilent Technologies*[®], Santa Clara, CA, EUA) equipado com lâmpadas de cátodo oco (LCO) monoelementares (Figura 6) foi utilizado operando nas condições descritas na Tabela 1.

Figura 6 - Foto ilustrativa do sistema de geração de hidretos acoplado ao espectrômetro de absorção atômica em chama.



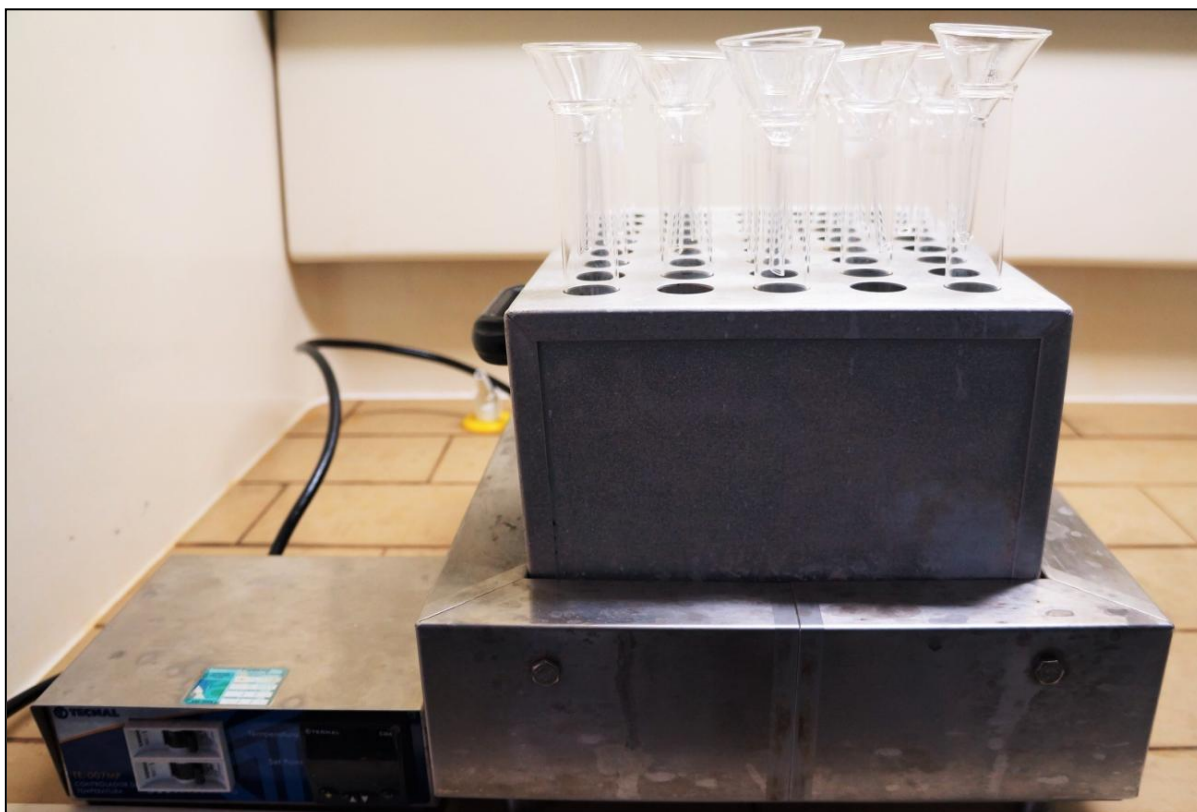
Fonte: Próprio autor.

Tabela 1 - Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de Se em castanhas por espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de hidreto.

Parâmetros Instrumentais	Selênio
Fonte de radiação	LCO
Corrente de lâmpada (mA)	10
Fenda de saída (nm)	1,0
Composição da chama	Ar/Acetileno
Queimador (mm)	100
Vazão de oxidante (L min ⁻¹)	13,0
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	2,0
Condições do Fluxo	
Taxa de aspiração de HCl (mL min ⁻¹)	1,0
Taxa de aspiração de NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	1,0
Taxa de aspiração de amostra (mL min ⁻¹)	8,0

As amostras de castanhas foram secas em estufa Orion 515 (*Fanem*[®], São Paulo, Brasil), processadas em moinho multi-uso TE-631 (*Tecnal*[®], Piracicaba, Brasil) e pesadas em balança analítica M214A1 (*BEL Engineering*[®], Piracicaba, Brasil). Para decomposição das amostras por via úmida, um bloco digestor TE-007MP (*Tecnal*[®], Piracicaba, Brasil) contendo tubos de 100 mL foi utilizado para os procedimentos de decomposição em sistema aberto (Figura 7). Foi avaliada a decomposição por via úmida em sistema fechado utilizando uma bomba caseira submetida ao aquecimento em estufa SL100 (*Solab*[®], Piracicaba, Brasil). O banho ultrassom USC-1400A (*Unique*[®], Indaiatuba, Brasil) operando em frequência de 40 khz e capacidade de 2,8 L foi utilizado na avaliação da extração de Se por meio de energias ultrassônicas.

Figura 7 - Foto ilustrativa do bloco digestor



Fonte: Próprio autor.

Micropipetas Eppendorf[®] (10 - 100 μL e 100 - 1000 μL) foram outros materiais volumétricos utilizados no preparo das soluções.

4.2 Reagentes e soluções analíticas

Água ultrapura (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm} - 25^\circ\text{C}$), obtida a partir do sistema de purificação Osmose Reversa OS10LXE (*Gehaka*[®], São Paulo, SP, Brasil), foi utilizada para o preparo de todas as soluções de trabalho. Para a digestão das castanhas foram utilizados HCl [37% (m/v), Vetec[®], Duque de Caxias, Brasil], HNO₃ [65% (m/v), *Sigma-Aldrich*[®], São Paulo, Brasil], H₂SO₄ [98% (m/v), Vetec[®], Brasil] e H₂O₂ [30% (m/v), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil]. Solução padrão estoque monoelementar de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi preparada a partir de uma solução padrão estoque monoelementares de 1000 mg L^{-1} (*SpecSol*[®], SRM-682) de selênio em meio de 1,0% (v/v) de HNO₃, onde a mesma foi utilizada para preparo das soluções intermediária (1,00 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) de Se, que foram armazenadas em frascos de

polipropileno (*Nalgene*[®], Rochester, NY, EUA) e utilizadas no preparo de soluções analíticas de calibração e em testes de adição e recuperação de analito.

As soluções analíticas de calibração foram preparadas diariamente por meio de diluição apropriada das soluções intermediárias no intervalo de 0,5 – 25,0 µg L⁻¹ Se em meio de 1,0% (v/v) de HNO₃.

Soluções de 1,0% (m/v) NaBH₄ [97% de pureza (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, Brasil], usado como agente redutor, foram preparadas a cada ensaio em meio de 0,5% (m/v) NaOH [99% de pureza (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, Brasil]. Soluções de 0,6 mol L⁻¹ HCl, usada como solução carregadora, foram preparadas e utilizadas para agir na redução do Se (IV) para Se (elementar) durante a geração do hidreto.

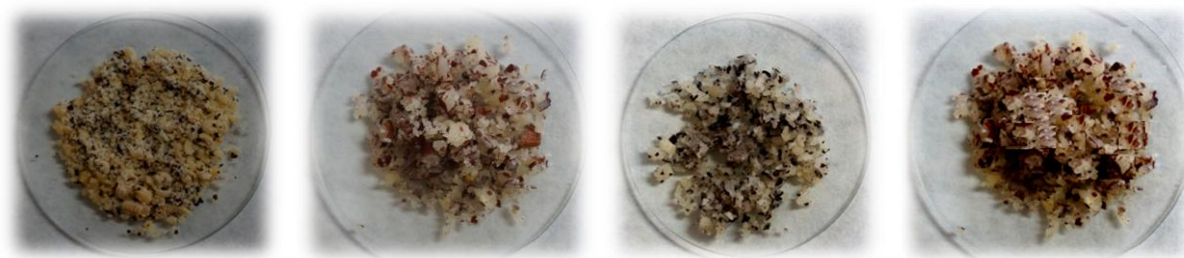
Para o processo de pré-redução foi utilizado uma solução de 10,0% KI [99% de pureza (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, Brasil] em meio de 3,50 mol L⁻¹ HCl.

Todos os materiais utilizados foram descontaminados por imersão em solução 10% (v/v) HNO₃ por 24 horas e enxaguados com água destilada e deionizada.

4.3 Amostragem, pré-tratamento e preparo da amostras

Foram utilizadas nesse estudo castanhas das espécies bacuri (*Platonia insignis*), baru (*Dipteryx alata*), boaiuva (*Acrocomia aculeata*) e caju (*Anacardium occidentale*, L.). A coleta destas amostras foi feita em março de 2015 na cidade de Bonito (bacuri), em agosto de 2015 na cidade de Campo Grande (baru), em novembro de 2015 na cidade de Dourados (bocaiuva) e em fevereiro de 2016 na cidade de Rochedo (caju). Foram coletadas aproximadamente 1000 g de semente de cada uma das variedades citadas acima. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos identificados e conduzidas ao laboratório para a continuidade dos trabalhos. Todo material coletado foi lavado abundantemente com água corrente e posteriormente com água destilada para remoção de partículas sólidas. Em seguida as amostras foram secas em estufa a 50 °C por 30 horas, para a total remoção da água de lavagem, sendo a seguir processadas em moinho multiuso e armazenadas em frascos de polipropileno devidamente identificadas até o momento do preparo de amostra. A Figura 8 ilustra o aspecto das sementes após etapa de lavagem e moagem.

Figura 8 - Foto ilustrativa das amostras de castanhas oleaginosas: (a) baru, (b) bacuri, (c) bocaiuva e (d) caju.



Fonte: Próprio autor.

Para avaliar e estabelecer o procedimento de decomposição das amostras e/ou extração do elemento de interesse mais eficiente, foram utilizados procedimentos por via úmida em sistema aberto e fechado conforme descrito abaixo:

4.3.1 Decomposição de amostra em bomba digestora:

Massas de 0,5000 g ($\pm 0,0001$ g) de amostra foram pesadas em balança analítica e transferidas para o tubo de reação. A esta foram adicionados 4,5 mL de HNO_3 e 1,5 mL de HCl . Em seguida o sistema de decomposição foi vedado com fita veda rosca para evitar perdas do analito e introduzido dentro do sistema de digestão, que foi submetido ao aquecimento de 150 °C por 150 minutos. Após a digestão e resfriamento da bomba, as amostras foram filtradas e transferidas para frascos de polietileno 25 mL, completando-se o volume com água deionizada.

4.3.2 Extração de analito em banho de ultrassom

Em 0,5000 g ($\pm 0,0001$ g) de amostra foram adicionados 10,0 mL de solução extratora $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ [1,4:1,2 mol L^{-1}]. Em seguida os frascos de polipropileno foram posicionados no centro do banho e então submetido à sonicação por 30 minutos. Os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro ($\varnothing = 150\text{mm}$ e 80 g m^2) e transferidos para frascos de polietileno de 25 mL, completando-se o volume para 20 mL com água deionizada e mantidos sob refrigeração até análise.

4.3.3 Decomposição das amostras em sistema aberto com refluxo

Massas de 0,5000 g ($\pm 0,0001$ g) de amostra foram pesadas e transferidas para o tubo de reação. A estas foram adicionados 5,0 mL de HNO_3 e 3,0 mL de H_2SO_4 e os tubos digestores foram levados ao bloco digestor e submetidos ao aquecimento lento até 100 °C, no qual permaneceu por 7h. Em seguida foi adicionado 1,0mL de H_2O_2 onde permaneceu em aquecimento por mais 60 min. Após a digestão e resfriamento, as amostras foram filtradas e transferidas para frascos de polietileno e o volume completado para 20 mL com água deionizada.

4.4 Procedimento de pré-redução

Após efetuar o preparo dos digeridos das amostras de castanhas, um volume de 6,0 mL de amostra foi transferido para um tubo *corning*[®] de 15 mL, e a este foi adicionado 1,0 mL de KI 10%, e 3,0 mL de HCl [37% (m/v)], de maneira a conter 3,5 mol L⁻¹ HCl. Logo a seguir as soluções foram submetidas ao sistema de agitação por *Vortex*, e mantidas em repouso durante 1 hora. Este procedimento resultou em soluções homogêneas e de aspecto incolor. Todas as soluções foram preparadas em triplicata.

4.5 Método para determinação de Se em castanhas por HG AAS

4.5.1 Aplicação da análise multivariada na otimização das variáveis de redução e geração do hidreto

Antes de dar início as análises das amostras previamente preparadas, foi preciso estabelecer as melhores condições de geração do hidreto para a determinação de Se em castanhas, para isso foi utilizado um planejamento fatorial completo (2³) de dois níveis para três variáveis com auxílio do programa *Statistica*[®] 10. Os parâmetros concentração de HCl (1,0 e 5,0 mol L⁻¹), concentração de NaBH₄ (0,15 e 1,5%) e comprimento de bobina (30 e 100 cm) foram avaliados, utilizado uma solução de 25 µg L⁻¹ de Se, com base em uma matriz de planejamento 2³, produzindo 8 experimentos executados aleatoriamente em duplicata.

Os resultados obtidos através do planejamento fatorial foram avaliados por meio do diagrama de Pareto, e as variáveis estatisticamente significativas, ou seja, com maior

influência no sistema, foram otimizadas pela metodologia de superfície de resposta aplicando a matriz de *Doehlert*.

Para avaliar o erro experimental, as medidas de absorvância para o ponto central foram repetidas 3 vezes, o que aumentou o número total de experimentos para 9.

4.5.2 Procedimento de medida experimental

O hidreto volátil de Se foi gerado com auxílio do VGA 77. Neste sistema a introdução da amostra e/ou soluções padrão, solução carregadora e redutor é feita em fluxo (FI), de modo simultâneo com auxílio do sistema peristáltico. As soluções foram transportadas por meio de capilares (tubos *Tygon*) de 1,00 mm (diâmetro interno) até a bobina reacional de 100 cm, onde ocorreu a mistura e a formação do hidreto volátil de selênio (H_2Se). Utilizando argônio (99,999%, White Martins[®], Dourados, Brasil) a uma pressão de 8 kgf cm^{-2} , o seleneto de hidrogênio é transportado do separador gás/líquido do VGA 77 até a cela de quartzo (tipo “T” com 17 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro interno) posicionada sob o nebulizar/queimador do AAS. A atomização do elemento foi feita em chama oxidante composta por ar-acetileno ($13,0 \text{ L min}^{-1}$ ar e $2,0 \text{ L min}^{-1}$ C_2H_2), essa chama foi escolhida devido a sua temperatura, quando realizados testes com a chama de óxido nítrico, houve danos na cela de quartzo, chegando a derreter a mesma, todas as medidas experimentais foram feitas empregando o comprimento de onda em 196,0 nm no intervalo de calibração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ – $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

A precisão e a exatidão foram avaliadas por testes de adição e recuperação de analito, utilizando as amostras de bacuri e baru por meio da adição de alíquotas da solução padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de modo a conter $1,00 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se nas amostras de castanhas. O método estabelecido para determinação dos teores de Se em castanha foi avaliado por meio do cálculo dos seguintes parâmetros de confiabilidade analítica: sensibilidade, intervalo linear de trabalho, precisão, exatidão e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de acordo com as normas da IUPAC [102], empregando os programas *Microsoft Office Excel*[®] e *Microcal OriginPro*[®] como ferramentas de cálculo.

Previamente foi realizada a validação do método, sendo então selecionadas 2 tipos de amostras, sendo essas bacuri e baru, pois além de se apresentarem bem diferentes em relação ao seu teor de óleo, as mesmas podem ser encontradas facilmente na região.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

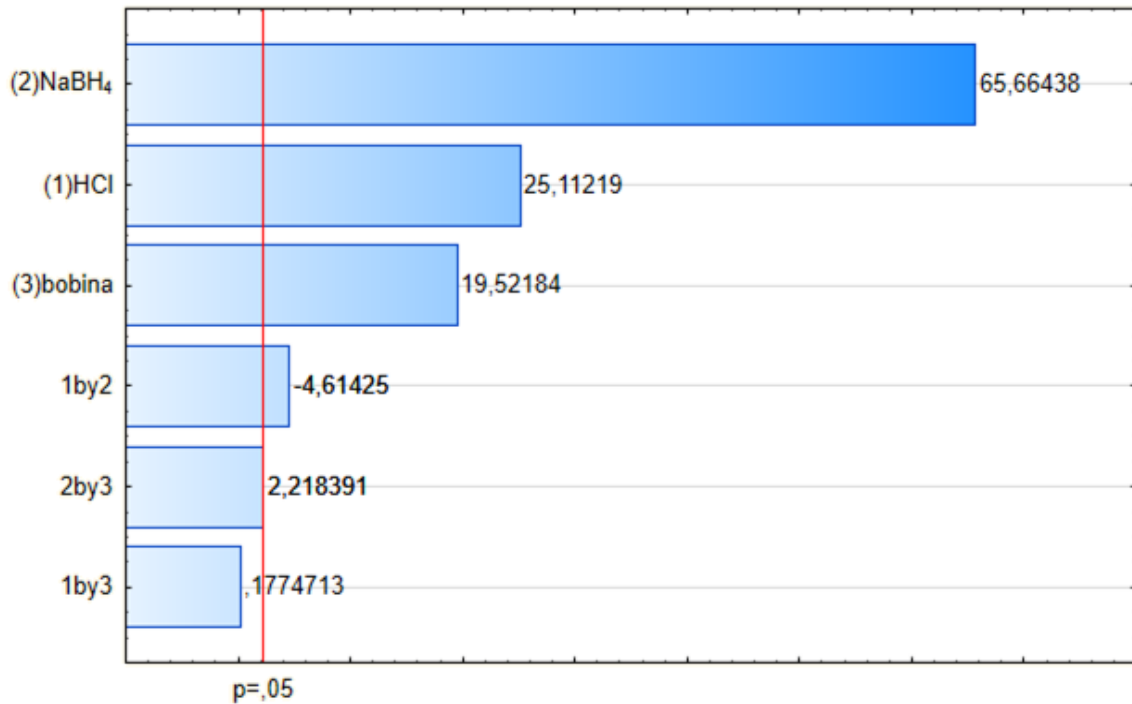
5.1 Avaliação da estatística multivariada aplicada ao sistema HG AAS na otimização das condições de geração do hidreto de Se

Para estabelecer as melhores condições instrumentais para o sistema de geração de hidreto, foi aplicada a análise estatística multivariada nos resultados experimentais, utilizando uma solução de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ Se, com auxílio de um planejamento fatorial completo de 2^3 . Inicialmente, a análise multivariada foi efetuada para estabelecer a concentração de HCl, de NaBH_4 e o comprimento da bobina. Os domínios experimentais para cada fator foram definidos com base em dados da literatura [20,26,95], Foram utilizados a média dos sinais analíticos (absorbância), onde os mesmos estão apresentados na Tabela 2. Estes resultados foram avaliados por meio do diagrama de Pareto (Figura 9) para evidenciar a influência dos fatores individuais e das interações no sistema.

Tabela 2 - Planejamento fatorial completo de 23, feito em duplicata, utilizado para otimizar os parâmetros experimentais para a geração do hidreto de selênio.

Fatores				Nível	
				Baixo (-)	Alto (+)
HCl (mol L ⁻¹)				1,0	5,0
NaBH ₄ (%)				0,15	1,5
Comprimento da bobina (cm)				30	100
Experimento	HCl	NaBH ₄	Bobina	Absorbância média	
1	-	-	-	0,253	
2	+	-	-	0,311	
3	-	+	-	0,427	
4	+	+	-	0,502	
5	-	-	+	0,285	
6	+	-	+	0,387	
7	-	+	+	0,508	
8	+	+	+	0,549	
9	-	-	-	0,256	
10	+	-	-	0,317	
11	-	+	-	0,418	
12	+	+	-	0,505	
13	-	-	+	0,273	
14	+	-	+	0,387	
15	-	+	+	0,506	
16	+	+	+	0,534	

Figura 9 - Diagrama de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para a determinação de Se por HG AAS (intervalo de confiança em 95%)



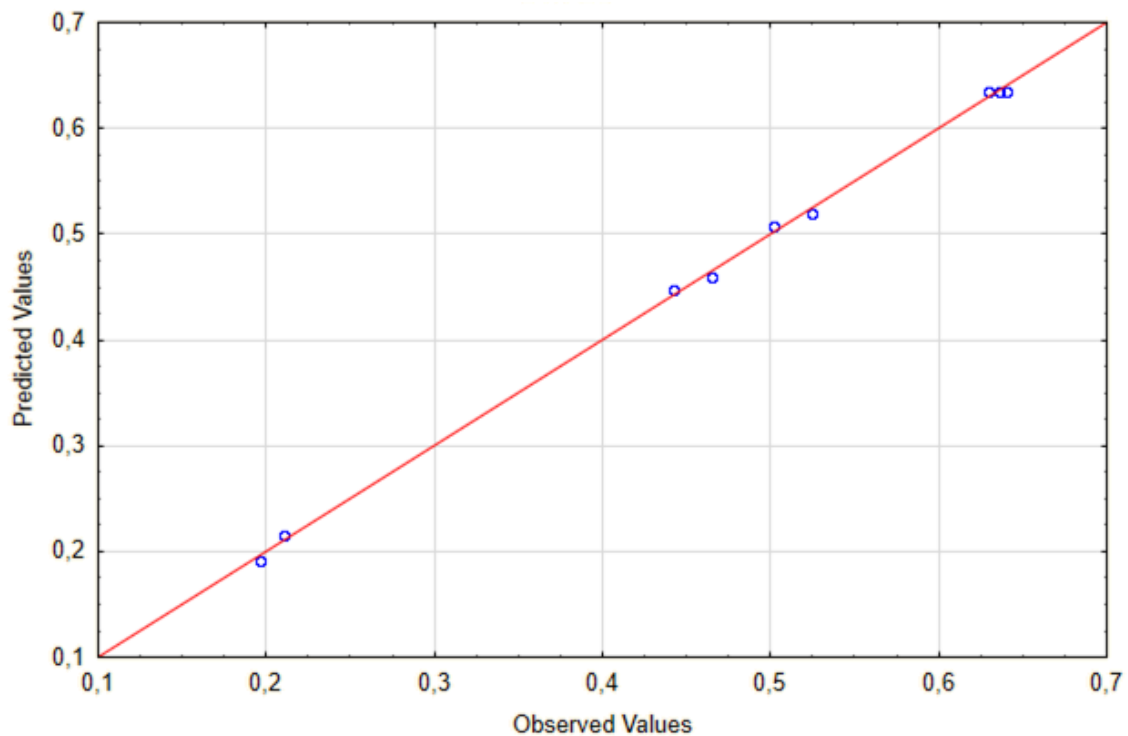
É possível observar na Figura 8 que as variáveis, quando analisadas de forma independente, apresentam efeito significativo, ao nível de 95 % de confiança, no método avaliado, sendo a variável concentração do redutor (NaBH₄), simbolizada por (2) foi a que apresentou maior significância em seu maior nível no sistema. No entanto, quando é avaliado a interação entre estas variáveis – concentração de HCl (1), concentração de NaBH₄ (2) e o comprimento da bobina (3) codificadas como 1by3, 2by3 e 1by2 – não é observado efeito significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) para as interações 1by3 (HClbybobina) e 2by3 (NaBH₄bybobina). Somente para a interação 1by2 (HClbyNaBH₄) o diagrama de Pareto apresenta efeito significativo porém com sinal negativo. O resultado obtido para esta interação demonstra que as variáveis não estão trabalhando em sinergismo, onde a ação combinada entre os dois fatores contribuem para o resultado final positivo do processo. Neste caso pode-se observar um trabalho de antagonismo, onde os dois fatores agem de forma contrária indicando que enquanto uma variável estiver em seu maior valor, os resultados serão melhores se a outra estiver em um nível inferior.

Foi observado que durante as análises houve um grande desprendimento de H⁺ quando as análises eram realizadas com concentrações muito elevadas de NaBH₄, deixando

a reação mais turbulenta e variando os sinais. Diferentemente de quando se utilizava NaBH_4 em concentrações mais baixas.

Para tal teste foi obtido o gráfico dos valores preditos vs valores observados (Figura 10) que comprovam a concordância dos valores observados em relação aos valores que o modelo linear estabelece.

Figura 10 - Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido para a geração do hidreto de selênio por HG AAS.



Diante dos resultados obtidos e observados através do diagrama de pareto, foi determinado que o comprimento de bonina em seu maior nível apresentou maior significância, sendo então fixado em 100 cm. Através do planejamento fatorial a interação que apresentou mais significativa estatisticamente (concentração do ácido e da solução redutora) foram selecionadas e submetidas à matriz de *Doehlert* (Tabela 3), que inclui três repetições do ponto central para avaliar o erro experimental, para obter a superfície de resposta (Figura 11). Como a influência da concentração do agente redutor foi mais significativa em relação à concentração de HCl (Figura 8), o fator NaBH_4 foi avaliado em cinco níveis, enquanto que a concentração de ácido clorídrico em três.

Tabela 3 - Matriz de experimentos do planejamento *Doehlert* utilizada para estabelecer as condições de geração do hidreto na determinação de Se em castanhas por HG AAS.

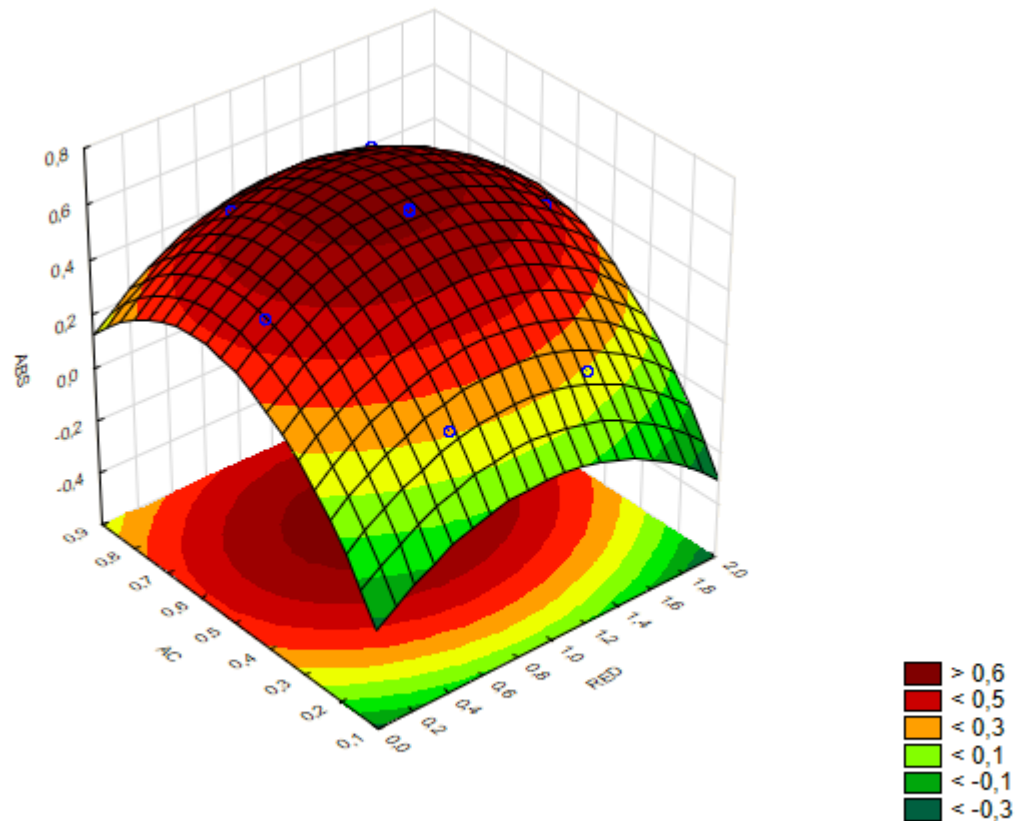
Experimento	NaBH ₄ , %		HCl, mol L ⁻¹		Absorbância
1	1	(0)	0,5	(0)	0,640
2	1	(0)	0,5	(0)	0,636
3	1	(0)	0,5	(0)	0,630
4	1,8	(1,0)	0,5	(0)	0,442
5	1,4	(0,5)	0,8	(0,866)	0,525
6	0,2	(-1,0)	0,5	(0)	0,465
7	0,6	(-0,5)	0,2	(-0,866)	0,210
8	1,4	(0,5)	0,2	(-0,866)	0,196
9	0,6	(-0,5)	0,8	(0,866)	0,502

Os dados obtidos com os nove experimentos compõem a matriz de *Doehlert*, que relaciona a concentração do agente redutor, a concentração do HCl e a medida do sinal analítico (absorbância), e produziram a superfície de resposta apresentada na Figura 10, que pode ser descrita pela Eq. 1.

$$\text{Abs} = 0,505 + 0,522 \text{ RED} - 0,284 \text{ RED}^2 - 3,014 \text{ AC} + 2,574 \text{ AC}^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$(\pm 0,016) \quad (\pm 0,018) \quad (\pm 0,007) \quad (\pm 0,044) \quad (\pm 0,038)$$

Figura 11 - Superfície de resposta obtida para a interação entre HCl vs NaBH₄ vs Abs na otimização do processo de geração do hidreto de Se



Os valores críticos obtidos utilizando a matriz de *Dohler* foram de 0,6 mol L⁻¹ HCl e 1,00 % NaBH₄. Os resultados obtidos foram comparados com trabalhos da literatura que fazem uso da geração de hidreto.

Depoi e colaboradores [103] efetuaram a determinação de Se e Sb através da geração de hidreto em amostras de nozes e castanha-do-pará e estabeleceu que as melhores condições foram alcançadas quando se utilizou 0,50% (m/v) de NaBH₄ e 0,10mol L⁻¹ de HCl.

Stripeikis e colaboradores [104] relataram que para a determinação de selênio VI e IV em água os melhores sinais foram alcançados quando se utilizou as soluções entre 1,0 e 1,2% (m/v) de NaBH₄ e 7,0 mol L⁻¹ de HCl.

Zhang e colaboradores [105] efetuaram a determinação conjunta de selênio, arsênio e bismuto em água de rio e afirmaram que a maior sensibilidade foi obtida com faixa que varia entre 0,5-1,0 mol L⁻¹ HCl e 0,2 % (m/v) de NaBH₄.

Diante dos resultados obtidos com a superfície de resposta, o modelo quadrático ajustado aos valores experimentais foi avaliado por meio do teste de falta de ajuste (valor de p), que deve ser maior que 0,05 para indicar que o modelo aplicado descreve o domínio experimental estudado. A Tabela 4 apresenta os dados obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicada aos resultados experimentais apresentados na Tabela 3.

Tabela 4 - Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 3 para geração do hidreto de Se.

	SQ	GI	MQ	F	P
1 RED (L)	0,000114	1	0,000114	4,503	0,167856
RED (Q)	0,039676	1	0,039676	1566,159	0,000638
(2) AC (L)	0,096410	1	0,096410	3805,668	0,000263
AC (Q)	0,114454	1	0,114454	4517,907	0,000221
1L by 2L	0,000342	1	0,000342	13,510	0,066699
Falta de ajuste	0,000171	1	0,000171	6,737	0,121886
Erro puro	0,000051	2	0,000025		
Total SS	0,229562	8			

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

De acordo com a análise de variância (ANOVA), utilizada para avaliar os resultados da matriz de *Doehlert*, o valor de $F_{\text{calculado}}$ (6,737) para falta de ajuste foi menor que o valor de F_{tabelado} (18,51), ao nível de 95% de confiança, e o valor de p obtido para a falta de ajuste é de 0,121886, o que demonstra ausência de falta de ajuste, indicando que o modelo de regressão obtido pode ser utilizado como representação dos dados experimentais.

Diante dos resultados obtidos com a avaliação multivariada, as melhores condições (0,6 mol L⁻¹ HCl, 1,0% NaBH₄ e bobina de 100 cm) para a geração do hidreto de selênio foram utilizadas para estabelecer o intervalo linear de calibração e os principais parâmetros de confiabilidade analítica para a determinação de Se.

No entanto, é importante ressaltar que durante os testes foi observado que as absorvâncias de Se diminuem quando a solução de 1,0% (m/v) NaBH₄ preparada no dia anterior era utilizada. A degradação da solução de NaBH₄, que acontece devido um aumento

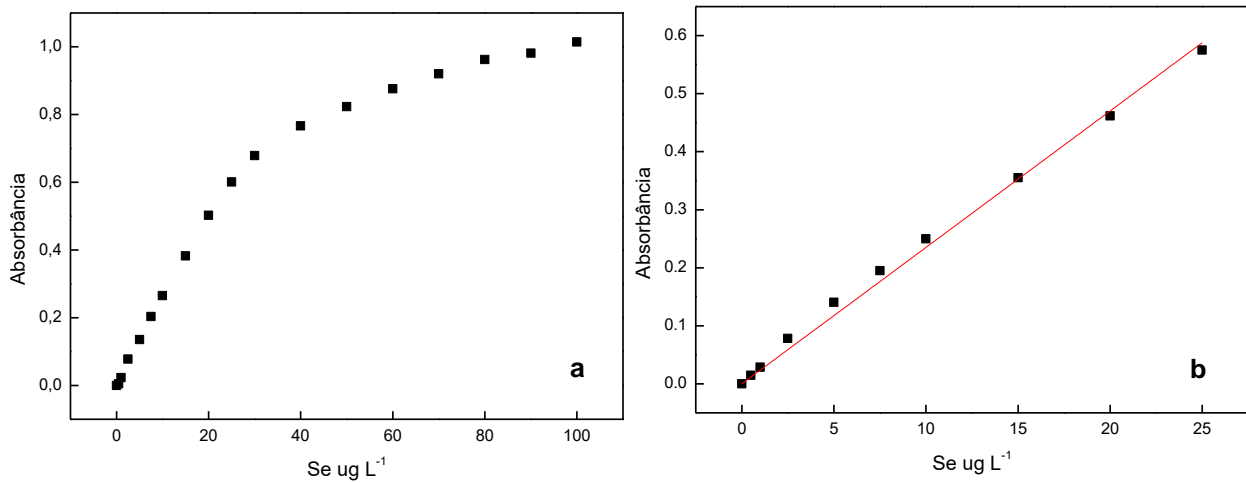
da evolução do hidrogênio proveniente da hidrólise de BH_4^- [106] pode ser uma possível explicação para o observado. Desta maneira, as soluções de 1,0% (m/v) NaBH_4 em meio de alcalino [0,5% (m/v) NaOH] foram preparadas diariamente e minutos antes de iniciar as análises. Outro fator importante e que merece destaque foi a falta de repetibilidade das medidas de absorvância para Se quando a concentração do agente redutor foi superior à 1,0% (m/v). Ficou evidente o aumento do sinal analítico, mas a reação para a geração do hidreto volátil foi turbulenta, devido à grande produção de H_2 , proporcionando elevados valores de branco analíticos e medida com desvio padrão relativa pouco satisfatória, ou seja, maior que 57,0%.

Coelho e colaboradores [26] efetuaram a determinação de selênio em urina, no qual observaram comportamento semelhante aos observados neste trabalho. O sinal de Se aumentava gradativamente até 0,5% (m/v) de NaBH_4 de HCl na concentração de 1,00 mol L^{-1} . Sendo que aumentando a concentração do ácido a valores de 2,00 mol L^{-1} os sinais diminuíram. Os autores concluíram que essa queda no sinal era devido a formação de grande quantidade de hidrogênio tanto para o uso de NaBH_4 quanto de HCl .

5.2 Método para determinação de Se em castanhas por HG AAS

O teor do micronutriente Se em castanhas, assim como nos mais variados tipos de amostras ambientais, estão na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ [13]. Para alcançar limites de detecção e quantificação satisfatórios para a determinação deste elemento, as medidas experimentais foram efetuadas através técnica de geração de hidretos acoplada ao espectrômetro de absorção atômica. Para definir o intervalo linear de calibração para a determinação de Se, foram preparadas soluções padrão contendo 0,01 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se. Estas soluções foram aspiradas pelo queimador/nebulizador do equipamento sob as condições instrumentais otimizadas – vazão do combustível (gás acetileno), vazão do oxidante (ar), ganho da lâmpada, corrente da lâmpada, tipo de queimador, posicionamento da cela de quartzo, taxa de aspiração do redutor do carregador e da amostra – para obter máxima sensibilidade. Neste sentido, curvas de resposta e de calibração obtidas por meio da aspiração destas soluções estão ilustradas na Figura 12.

Figura 12 - Curvas de resposta (a) e analítica (b) obtidas para a determinação de Se em castanhas por HG AAS utilizando as condições experimentais estabelecidas.



Observando o gráfico da Figura 12a, fica evidente que o intervalo de calibração para Se é bastante restrito (0,50 – 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se), como apresentado na Figura 12b, uma vez que as soluções contendo Se acima de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram perda de linearidade. Para o intervalo linear de concentração estabelecido, as curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação lineares acima de 0,9970, desvios padrões relativos (RSD) inferiores a 1,9% em todas as medidas e limites de detecção de 0,1315 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a determinação de Se nas amostras de castanhas.

O método estabelecido para determinação dos teores de Se em castanha foi avaliado por meio do cálculo dos seguintes parâmetros de confiabilidade analítica: sensibilidade, intervalo linear de trabalho, precisão, exatidão e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), empregando os programas *Microsoft Excel*[®] e *Microcal OriginPro*[®] como ferramentas de cálculo, de acordo com as equações abaixo:

$$LD = \frac{3 \times sd^{branco}}{k} \quad \text{Eq. 2}$$

$$LQ = \frac{10 \times sd^{branco}}{k} \quad \text{Eq. 3}$$

onde: sd^{branco} é o desvio padrão para 10 ou mais medidas para o branco analítico da curva de calibração. Na Tabela 5 é observado a avaliação dos parâmetros de determinação dos elementos feita por meio do cálculo dos principais parâmetros de confiabilidade analítica

Tabela 5 - Parâmetros de confiabilidade analítica relativos à determinação de Se em castanhas por HG AAS.

Elemento	Sensibilidade	Intervalo da curva	R	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
Se	0,02312	0,50 – 25,0	0,9970	0,1315	0,4385	1,9

Observando os valores apresentados é possível constatar que a técnica de geração de hidreto acoplada à espectrometria de absorção atômica apresentou limite de detecção e quantificação satisfatórios, baixos valores de desvio padrão relativo e pode ser empregada na determinação de baixos teores de Se.

Tabela 6 - Métodos analíticos para a determinação de selênio em amostras ambientais e biológicas.

Técnica	Amostra	LD	Referências
UV-Vis	Água	10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	[107]
ET-AAS	Alho	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[108]
	Cebola	1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	[109]
	Vegetais	0.0017 mg L-1	[110]
HGAAS	Água	0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	[111]
HG-ITA-FAAS	Biológica	3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	[112]
GF-AAS	Ovo	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	[113]
	Água de coco	0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$	[16]
	Vegetais	0.00049 mg L-1	[110]
	Frutas	0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$	[114]
HG-ICP-OES	Bebidas (Chá)	0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[115]
DPCSV	Arroz	0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$	[116]
TS-FF-AAS	Urina	1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	[117]
FI-HG-GFAAS	Cereais	0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$	[118]
LC-UV-HG-AFS	Leite de vaca	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[119]

5.3 Avaliação dos procedimentos de preparo de amostra

Após estabelecer as condições ideais para a geração do hidreto de selênio, foram avaliados procedimentos de preparo de amostra, que envolveram a digestão ácida em sistema fechado (bomba digestora e micro-ondas), sistema aberto (bloco digestor) e a extração (banho de ultrassom) por ondas ultrassônicas.

Como o preparo de amostra em sistema fechado (bomba digestora) e aberto (bloco digestor) envolvem a decomposição da matéria orgânica por meio da adição de ácidos concentrados, o Se presente sofre um processo de oxidação e passa para o estado mais oxidado Se (VI). Por apresentar estado de oxidação (VI), a determinação de Se por HG AAS deve ser realizada somente após prévia redução para (IV), uma vez que se a amostra for diretamente aspirada pelo sistema, o Se (VI) será reduzido para Se (IV), dificultando a formação do hidreto [18,20]. A pré-redução de Se (VI) para Se (IV) acontece de acordo com o esquema abaixo:



No processo de digestão utilizando a bomba digestora, foram avaliados 8 procedimentos diferentes quanto a composição dos reagentes (HCl, HNO₃, H₂O₂ e H₂O) adicionados à massa de amostra (≈0,5000 g) submetida à digestão por 150 min à 150 °C. Em princípio, o aspecto físico (turbidez e/ou oleosidade aparente) das soluções resultantes foi considerado para definir a eficiência do procedimento avaliado.

Tabela 7 – Quantidades de amostra e reagentes utilizados nos procedimentos de decomposição de amostra por via úmida

Procedimento	Massa de amostra		Reagentes
1	0,500 g	+	6,0 mL HNO ₃ + 2,0 mL H ₂ O
2	0,500 g	+	6,0 mL HNO ₃ + 2,0 mL H ₂ O ₂
3	0,500 g	+	6,0 mL HNO ₃ + 2,0 mL HCl
4	0,500 g	+	2,0 mL HNO ₃ + 4,0 mL HCl
5	0,500 g	+	4,0 mL HNO ₃ + 0,5 mL HCl + 1,5 mL H ₂ O ₂
6	0,500 g	+	4,0 mL HNO ₃ + 2,0 mL H ₂ O ₂
7	0,500 g	+	3,0 mL HNO ₃ + 3,0 mL HCl
8	0,500 g	+	4,5 mL HNO ₃ + 1,5 mL HCl + 2,0 mL H ₂ O

Dentre os procedimentos avaliados (Tabela 7) aquele que utilizava 0,5000 g de amostra + 6,0 mL HNO₃ + 2,0 mL HCl (procedimento 3) apresentou solução digerida incolor, indicando a possível decomposição de todo material. Diante destas informações, a precisão e a exatidão do procedimento 3 foram avaliados utilizando as amostras de bacuri e baru, e os resultados obtidos no teste de adição e recuperação de analito estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Recuperação de Se em amostra de castanha digerida por via úmida em sistema fechado utilizando o procedimento 3.

Amostra	Se adicionado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Se determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
Bacuri	0,00	0,088 \pm 0,050	-	56,8
	1,00	0,049 \pm 0,012	4,89	24,8
Baru	0,00	0,120 \pm 0,024	-	20,1
	1,00	0,065 \pm 0,025	6,42	38,5

Os resultados descritos na Tabela 8 evidenciam baixos valores (< 6,42%) de recuperação de Se nas amostras avaliadas com valores de %RSD superiores a 10%. Tais valores podem estar relacionados a perdas por volatilização, adsorção ou por variação em seu estado de oxidação [26], evidenciando que o procedimento de preparo da amostra precisa ser cuidadosamente selecionado para prevenir a perda de selênio durante a decomposição. Esses valores indicam que o procedimento de digestão utilizado (n. 3) não

pode ser utilizado para a decomposição das amostras de castanhas porque apresenta precisão e exatidão insatisfatórias, ou seja, os resultados não são concordantes ao nível de 95% de confiança (teste-*t* de *Student*) para a determinação de Se em castanhas empregando a HG AAS.

Diante dos resultados obtidos para as digestões das amostras de castanhas por via úmida em sistema fechado (bomba digestora), optou-se por empregar um procedimento de preparo de amostra menos agressivo com base na extração de analito por energias ultrassônicas, pois acreditasse que ocorreu perda por volatilização no decorrer da reação, ou após abrir os tubos, pois ocorreu um grande desprendimento de gás, decorrente da oxidação do selênio com o HNO₃ [120]. Neste procedimento, a ocorrência do fenômeno de cavitação gerado em líquidos expostos a ondas ultrassônicas possibilita a solubilização de amostras e a extração de substâncias inorgânicas e orgânicas de matrizes sólidas, quando sistemas líquido-sólidos são irradiados [20,95,121,122].

Para avaliar a eficiência do processo de extração do analito por ondas ultrassônicas, as condições utilizadas foram 10 mL de uma solução de 1,2 mol L⁻¹ HCl: 1,4 mol L⁻¹ HNO₃ para ≈0,5000 e ≈1,0000 g de amostra, onde permaneceu no banho de ultrassom por 30 min. Os melhores resultados foram obtidos para massa de 0,5000g e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados (média ± desvio padrão) da determinação (n= 3) dos teores de Se (µg g⁻¹) em amostras de castanhas de bacuri e baru submetida ao procedimento de extração em banho de ultrassom.

Amostra	Se adicionado (µg g ⁻¹)	Se determinado (µg g ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Bacuri	0,00	< LQ*	-	
	1,00	0,3421 ± 0,0243	34,2	7,1
Baru	0,00	< LQ*	-	
	1,00	0,3233 ± 0,0077	32,3	2,4

LQ*: 0,7033 µg g⁻¹ Se.

Podemos observar na Tabela 9 que os valores de recuperação variaram entre 32,3 – 34,2%, com RSD inferiores a 7,1%. Estes resultados demonstram que o procedimento de preparo de amostra para os materiais em estudo ainda não é satisfatório, ao nível de 95% de confiança (teste-*t* de *Student*). Vale ressaltar ainda que os teores obtidos na determinação de

Se nas amostras de castanhas estão abaixo do limite de quantificação ($0,7033 \mu\text{g L}^{-1}$) do método de HG AAS.

É importante destacar que dentre os três procedimentos de preparo de amostra avaliado, aquele que utilizou a extração por energias ultrassônicas foi o que apresentou os mais elevados valores de recuperação, mesmo que estes ainda estejam abaixo do valor aceitável (80 – 120%) para teores na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$.

Diante dos resultados obtidos, o procedimento de digestão ácida em bloco digestor foi avaliado. Inicialmente, o processo foi conduzido utilizando as amostras de bacuri e baru em sistema aberto, no qual massas de 0,5000 g de amostra foram pesadas e a estas foram adicionados 5,0 mL HNO_3 + 3,0 mL H_2SO_4 + 1,0 mL H_2O_2 . As misturas foram submetidas à temperatura de 120 °C por 420 min, resultando em digeridos lípidos e incolores, indicando a possível decomposição de todo material. Como estes testes iniciais foram feitos em sistema aberto, os valores obtidos para Se nos digeridos utilizando a HG AAS ficaram abaixo do limite de detecção do método ($0,1315 \mu\text{g L}^{-1}$), o que não permitiu avaliar o procedimento de preparo de amostra utilizado.

Como o procedimento de preparo de amostra utilizado resultou em teores de Se abaixo do limite de detecção, perdas por volatilização do analito, adsorção ou variação do estado de oxidação [26] podem ser as causas os resultados insatisfatórios. Desta maneira, fica evidente que a escolha do procedimento de preparo da amostra mais adequado precisa ser cuidadosamente selecionado para prevenir a perda do elemento durante o processo de decomposição.

Diante do observado, e para avaliar novamente este procedimento de digestão, as amostras selecionadas foram submetidas ao procedimento de digestão em sistema aberto (bloco digestor), no entanto desta vez em sistema refluxo com auxílio de um funil posicionado na boca do tubo digestor. Utilizando este procedimento de digestão, testes de adição e recuperação foram efetuados com as amostras bacuri e baru e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação (n= 3) dos teores de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de castanhas de bacuri e baru utilizando o procedimento de preparo de amostra em bloco digestor em sistema refluxo.

Amostra	Se adicionado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Se determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
Bacuri	0,000	0,107 \pm 0,005	-	4,7
	0,600	0,549 \pm 0,008	91,5	1,5
Baru	0,000	0,347 \pm 0,001	-	0,3
	0,600	0,542 \pm 0,002	90,3	0,4

As recuperações variaram entre 90,3 – 91,5% com valores de RSD inferiores à 4,9 %. Estes resultados demonstram que o procedimento de preparo de amostra para as amostras foi satisfatório ao nível de 95% de confiança (teste-*t* de *Student*). Diante destes resultados, o procedimento de preparo de amostra em bloco digestor em sistema aberto sob refluxo foi escolhido para a continuidade do trabalho.

5.4 Determinação de Se em castanhas por HG AAS

Após estabelecer as condições instrumentais e experimentais para determinar Se por HG AAS, o método desenvolvido foi aplicado a outras castanhas/amêndoas sendo elas bacuri, baru, bocaiúva e caju por meio da geração de hidreto acoplado à espectrometria de absorção atômica em chama. Os teores obtidos para as amostras estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação (n= 3) dos teores de Se em amostras de castanhas por HG AAS.

Amostra	Se, $\mu\text{g g}^{-1}$	RSD, %
Bacuri	0,107 \pm 0,005	4,9
Baru	0,347 \pm 0,001	0,3
Bocaiuva	0,374 \pm 0,006	1,6
Caju	0,331 \pm 0,006	1,8

Os desvios padrão relativos (%RSD) obtidos na determinação de Se utilizando a metodologia proposta variaram entre 0,3 – 4,9%, o que demonstra que a metodologia proposta para determinar Se em amostras de castanhas/amêndoas têm precisão satisfatória.

Segundo a ANVISA Portaria n ° 31, de 13 de janeiro de 1998 [123], um alimento pode ser considerado fonte nutricional quando 100 g do produto forneçam 15% da recomendação diária e rico quando fornecer cerca de 30% da recomendação diária. Sabendo-se que a ingestão recomendada diária (IRD) de selênio é de 55 µg/dia [124]. De acordo com estas informações, as castanhas/amêndoas avaliadas apresentam 10,7 µg (bacuri), 34,7 µg (baru), 37,4 µg (bocaiuva) e 33,1 µg (caju) de Se a cada 100 g de amostra, o que classificam baru, bocaiuva e caju como fontes ricas em Se.

De forma complementar, o teor de Se por castanha foi calculado levando em consideração o valor médio de cada castanha/amêndoa. Para determinar estes valores, foram pesados 10 castanhas/amêndoas inteiras de cada uma das amostras e os valores médios obtido podem ser observados na tabela 12, juntamente com a concentração de selênio por unidade de castanhas.

Tabela 12 - Teor de selênio disponível nas castanhas

Amostra	Massa média/castanha	Teor/unidade	Teor/100g
Bacuri	0,9140 g	0,0977 µg	10,7 µg
Baru	1,1999 g	0,4163 µg	34,7 µg
Bocaiuva	1,5121 g	0,5655 µg	37,4 µg
Caju	1,5467 g	0,5119 µg	33,1 µg

IDR: 55 µg/dia de Se

Os resultados obtidos neste estudo apresentam concentrações abaixo daqueles descritos na literatura [125] para a castanha-do-pará, que chegam a conter teores em torno de 513 µg g⁻¹.

6 CONCLUSÕES

O método de digestão em sistema aberto com aquecimento convencional (bloco digestor) apresentou eficiência satisfatória quando efetuado em sistema sob refluxo, uma vez que permitiu prevenir as perdas do analito por volatilização, haja vista os valores obtidos de adição e recuperação de analito no procedimento de validação da metodologia.

A pré-redução de Se (VI) para Se (IV) é um procedimento necessário quando a digestão ácida é utilizada, uma vez que todo selênio presente na amostra é convertido para Se (VI) na etapa de digestão.

A avaliação multivariada aplicada aos resultados experimentais para a geração do hidreto volátil de Se é uma ferramenta bastante útil e permitiu reduzir a quantidade de experimentos necessários para a otimização dos parâmetros selecionados.

O método de determinação de Se pela técnica de geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica apresentou elevada sensibilidade, baixos limites de detecção e quantificação, baixos desvios padrão relativos (%RSD), velocidade analítica satisfatória e facilidade no manuseio do equipamento.

A ingestão adequada de Se fornecido por espécies alternativas – castanhas nativas do cerrado sul-mato-grossense – pode ser uma fonte alimentar diversificada para atender o IDR para o elemento.

7 REFERÊNCIAS

- [1] CUNHA, E. S. M.; DANTAS, F. L. C. G. O que você precisa saber sobre a castanha-do-brasil: de informações técnicas a curiosidades. Macapá: SEMA, 1997.93 p.
- [2] KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; GHASEMI, E.; FASIHI, J.; SHAMSIPUR, M. Imprinted polymer particles for selenium uptake: synthesis, characterization and analytical application. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, n. 2, p. 208-213, 2007.
- [3] HYMER, C. B.; CARUSO, J. A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 1-20, 2006.
- [4] WANG, Y.; FU, L. Forms of selenium affect its transport, uptake and glutathione peroxidase activity in the Caco-2 cell model. **Biological trace element research**, v. 149, n. 1, p. 110-116, 2012.
- [5] WAKE, B. D.; BOWIE, A. R.; BUTLER, E. C.; HADDAD, P. R. Modern preconcentration methods for the determination of selenium species in environmental water samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 491-500, 2004.
- [6] UDEN, P. C. Modern trends in the speciation of selenium by hyphenated techniques. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 373, n. 6, p. 422-431, 2002.
- [7] KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; WUILLOUD, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 153-159, 2005.
- [8] PANZIERA, F. B.; DORNELES, M. M.; DURGANTE, P. C.; SILVA, V. L. D. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. **Revista brasileira de geriatria e gerontologia**, v. 14, n. 1, p. 49-58, 2011.
- [9] Propriedades e benefícios da castanhas-do-pará. Disponível em: <<http://www.castanhasdobrasil.com.br/beneficios-da-castanha>> Acesso em: 25 de fevereiro 2015.
- [10] KOCYIGIT, A.; KOYLU, A. A.; KELES, H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 16, n. 3, p. 202-209, 2006.
- [11] TRUMBO, P.; YATES, A. A.; SCHLICKER, S.; POOS, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 3, p. 294-301, 2001.
- [12] HARRIS, N. G. In: MAHAN, L. K.; STUMP, S. S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo: **Rocca**, 2005, p. 304-323.
- [13] PRAUCHNER, C. A.; **A importância do Selênio para a agropecuária e saúde humana**; PRAUCHNER, C. A.; Santa Maria. Ed. Da UFSM, 2014, 374p.

- [14] FREITAS, S. C.; GONÇALVES, E. B.; ANTONIASSI, R.; FELBERG, I.; OLIVEIRA, S. P.; Braz. J. Meta-análise do teor de selênio em castanha-do-brasil. **Braz J Food Technol**, v. 11, p. 54-62, 2008.
- [15] SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 120-128, 2004.
- [16] ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. D. A.; SANTOS JÚNIOR, D.; MÜLLER, R. C. S. Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 310-312, 2000.
- [17] NAVARRO, M.; LOPEZ, H.; RUIZ, M. L.; GONZALEZ, S.; PEREZ, V.; LOPEZ, M. C. Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake. **Science of the total environment**, v. 175, n. 3, p. 245-252, 1995.
- [18] TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; DE CAMPOS, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1132-1144, 2002.
- [19] JOHANSSON, K.; LUO, X.; OLIN, Å. Rapid one-step derivatization of Se (VI) to a piaszelenol for the spectrofluorimetric determination of selenium in biological material. **Talanta**, v. 42, n. 12, p. 1979-1987, 1995.
- [20] JUNIOR, A. G. **Determinação de selênio em água subterrânea utilizando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafita (gfaas) e geração de hidretos (hgaas)**. São Paulo-SP, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- UNESP,2008. Tese de Doutorado, 115p.
- [21] COELHO, N. M. M.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, C. M. Determination of As (III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 460, n. 2, p. 227-233, 2002.
- [22] COELHO, N. M. M.; PARRILHA, C.; CERVERA, M. L.; PASTOR, A. DE LA GUARDIA, M. High performance liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometric determination of arsenic species in beer samples. **Analytica chimica acta**, v. 482, n. 1, p. 73-80, 2003.
- [23] DESSUY, M. B.; KRATZER, J.; VALE, M. G. R.; WELZ, B.; DĚDINA, J. Hydride generation in-atomizer collection atomic absorption spectrometry for the determination of antimony in acetic acid leachates from pewter cups. **Talanta**, v. 87, p. 255-261, 2011.
- [24] ZAPPELINI, A. I.; **Desenvolvimento do Método Hg – ICP OES para determinação simultânea Se arsênio e selênio**. Florianópolis-SC. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, 2014, Dissertação de mestrado, 82p.

- [25] HESSE, S.; RISTAU, T.; EINAX, J. W. Chemical vapor generation by coupling high-pressure liquid flow injection to high-resolution continuum source hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of arsenic. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 42-50, 2015.
- [26] COELHO, N. M. M.; BACCAN, N. Determinação de ultratraços de selênio em urina por geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica em fluxo. **Eclética Química**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 7-14, 2004.
- [27] SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. D. A. O selênio no meio ambiente. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 264-276, 2007.
- [28] CAVALCANTE, D. D. **Estratégias analíticas para determinação de arsênio e selênio em amostras de alimentos utilizando a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos–HG AFS**. Salvador-BA, Programa de Pós-Graduação em Química-Universidade Federal da Bahia-UFB, 2014. Tese de Doutorado, 113p.
- [29] ARTHUR, J. R.; BECKETT, G. J. Thyroid function: review. **Br Med Bull**, Oxford (UK), v.55, p. 658–668, 1999.
- [30]. KÖLBL, Gottfried. Concepts for the identification and determination of selenium compounds in the aquatic environment. **Marine chemistry**, v. 48, n. 3, p. 185-197, 1995.
- [31] MORAES, M. F. Selênio em solos, plantas e fertilizantes. In: II ENCONTRO SOBRE SELÊNIO E TELÚRIO - BRASIL, 2008, Campos do Jordão - SP. Livro de resumos do II Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil. 118p. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2008. p.19.
- [32] COZZOLINO, S. M. F. **Mineral deficiencies: estudos avançados**, v. 21, n. 60, p. 119-126, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ea/v21n60/a09v2160.pdf> acesso em 16 de junho de 2016.
- [33] IKE, M.; TAKAHASHI, K.; FUJITA, T.; KASHIWA, M.; FUJITA, M. Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. **Water Research**, v. 34, n. 11, p. 3019-3025, 2000.
- [34] NEUHIERL, B.; THANBICHLER, M.; LOTTSPREICH, F.; BÖCK, A. A family of S-Methylmethionine-dependent Thiol/Selenol Methyltransferases role in selenium tolerance and evolutionary relation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5407-5414, 1999.
- [35] WHANGER, P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 223-232, 2002.
- [36] RIBEIRO, J. F.; SANO, S.; BRITO, M. A. D.; FONSECA, C. E. L. D. Baru (*Dipteryx alata* Vog.). Jaboticabal: Funep, 2000, 41 p. (Série Frutas Nativas, 10).
- [37] EMBRAPA. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47749/1/folder-castanhadoBrasil.pdf>> Acesso em: 15 de fevereiro de 2015.

[38] BRASIL. Ministério do Interior. Estudos e Pesquisas sobre a Castanha-do-Pará. Belém/PA: SUDAM, p.97. 1976.

[39] FELIPE, E. D. F.; COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; HERNANDEZ, F. F. H. Avaliação da qualidade de parâmetros minerais de pós alimentícios obtidos de casca de manga e maracujá. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 01, p. 79-83, 2006.

[40] CUNHA, E. S. M.; DANTAS, F. L. C. G. O que você precisa saber sobre a castanha-do-brasil: de informações técnicas a curiosidades. Macapá: SEMA, 1997. 93 p.

[41] NASCENTE, A. S. Valor alimentício das frutas. Disponível em: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/valor_alim.htm>. Acesso em: 15 fevereiro de 2015.

[42] FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde: [revisão]. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

[43] BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Cerne**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 2000.

[44] LUSTOSA, A. K. M.; ARCANJO, D. D.; RIBEIRO, R. G.; RODRIGUES, K. A. F.; PASSOS, F. F. B.; PIAUILINO, C. A.; CARVALHO, F. A. A. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 77-82, 2016.

[45] CARVALHO, J. E. U. D.; NAZARÉ, R. F. R. D.; NASCIMENTO, W. M. O. D. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2003.

[46] FERREIRA, F. R.; FERREIRA, S. A. do N.; DE CARVALHO, J. E. U. Espécies frutíferas pouco exploradas, com potencial econômico e social para o Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.9, p.11-22, 1987.

[47] DA COSTA, J. S.; DE ALMEIDA, A. A. C.; DA ROCHA TOMÉ, A.; CITÓ, A. M. D. G. L.; SAFFI, J.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011.

[48] MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O.; PETENATE, A. J. Extraction of the soluble material from the shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO₂ and other solvents. **The journal of supercritical fluids**, v. 11, n. 1, p. 91-102, 1997.

- [49] DA SILVA, V. K. L.; DE FIGUEIREDO, R. W.; DE BRITO, E. S.; MAIA, G. A.; DE SOUSA, P. H. M.; DE FIGUEIREDO, E. A. T. Estabilidade da polpa do bacuri (*Platonia insignis Mart.*) congelada por 12 meses. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, set./out., 2010.
- [50] CARVALHO, J. D.; MÜLLER, C. H.; LEÃO, N. V. M. Cronologia dos eventos morfológicos associados à germinação e sensibilidade ao dessecamento em sementes de bacuri (*Platonia insignis Mart.*-Clusiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 236-240, 1998.
- [51] BEZERRA, K. Bacuri: fruta benéfica para tratar inflamações e colesterol. Disponível em: <http://www.remedio-caseiro.com/bacuri-fruta-e-benefica-para-tratar-inflamacoes-e-colesterol/> acesso em: 10 de maio de 2016.
- [52] LORENZI, GISELE MARIA AMIM CALDAS. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.-Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Curitiba-PR. Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná- UFP, 2006. Tese de Doutorado, 156p.
- [53] FERREIRA, A. N.; SANTOS, C. P. A. D.; COSTA, G. L. D. A.; GEBARA, K. S. Utilização do extrato de bocaiúva (*Acrocomia Aculeata*) como um alimento funcional do tipo “Shake”, **Interbio**, v.7 n.1, p61-71, 2013.
- [54] COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2139-2142, 2011.
- [55] CICONINI, G.; FAVARO, S. P.; ROSCOE, R.; MIRANDA, C. H. B.; TAPETI, C. F.; MIYAHIRA, M. A. M.; NAKA, M. H. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 208-214, 2013.
- [56] AMARAL, F. P. D. **Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]**. Botucatu-SP. Faculdade de Ciências Agrônômicas Campus de Botucatu- Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, 2007. Dissertação de mestrado, 52p.
- [57] COIMBRA, M. C. **Caracterização dos frutos e dos óleos extraídos da polpa e amêndoa de guariroba (*Syagrus oleracea*), Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e macaúba (*Acromia aculeata*)**. São José do Rio Preto- SP. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista- UNESP, 2010, Dissertação de mestrado, 92p.
- [58] SILVA, P. V. B. S. **Caracterizacao quimica e avaliacao do potencial antidiabetico e citotoxico de oleo extraido de *Acrocomia aculeata* (macauba)**. Dourados-MS, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental- Universidade Federal da Grande Dourados, 2012. Dissertação de mestrado, 68p.

- [59] TRAESEL, G. K.; DE SOUZA, J. C.; DE BARROS, A. L.; SOUZA, M. A.; SCHMITZ, W. O.; MUZZI, R. M.; ARENA, A. C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 320-325, 2014.
- [60] LIMA, A. C.; GARCIA, N. H. P.; LIMA, J. R. Obtenção e Caracterização dos Principais Produtos Do Caju. 2004. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Janice_Lima/publication/266468727_OBTENO_E_CARACTERIZAO_DOS_PRINCIPAIS_PRODUTOS_DO_CAJU_/links/5501a3ef0cf24cee39f82671.pdf Acesso em: 17 de maio de 2016
- [61] GAZZOLA, J.; GAZZOLA, R.; COELHO, C. H. M.; WANDER, A. E.; CABRAL, J. E. D. O. **A amêndoa da castanha-de-caju: composição e importância dos ácidos graxos – produção e comércio mundiais**. Florianópolis- SC. Departamento de nutrição-ufsc, embrapa sede, arroz e feijão e agroindústria tropical. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Alcido_Wander/publication/222099880_A_amendoa_da_castanha-de-caju_composicao_e_importancia_dos_acidos_graxos_-_producao_e_comercio_mundiais/links/09e4150dc974b942c8000000.pdf acesso em 19 de junho de 2016.
- [62] GARRUTI, D. S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. Campinas-SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. Tese de Doutorado, 218 p.
- [63] Benefícios da castanha de caju para a saúde. Disponível em:
<http://www.wickbold.com.br/os-beneficios-da-castanha-de-caju-para-a-saude/> acesso em: 15 de abril de 2016
- [64] MELO, M. L. P.; MAIA, G. A.; SILVA, A. P. V.; OLIVEIRA, G. S. F.; FIGUEIREDO, R. W. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) crua e tostada. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 18, n. 2, p. 184-187, 1998.
- [65] DE ARAUJO NOGUEIRA, A. R.; PREPARO DE AMOSTRAS. **VIII Encontro nacional sobre métodos dos laboratórios da Embrapa**. Embrapa, Jaguariuna- SP, 2003. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/portalmat/images/arquivos/08MET/Palestras/preparoamostras.pdf>. Acesso em: 10 de abril de 2016
- [66] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª Ed., São Paulo: Trad. de M.T. Grassi, Cengage Learning, 2006.
- [67] KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: F. J. Krug, 2008. 340p.
- [68] HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis — facts and traps. **Talanta**, v. 54, n. 6, p. 1021–1038, 2001.

- [69] BELTRÃO, N. E. DE M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel**. Embrapa Algodão. Documentos, 201, 2008. Acesso em: 25 nov. 2012
- [70] PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, L. Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 299–310, 2007.
- [71] DE OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174–182, 2003.
- [72] NEMATI, K.; ABU BAKAR, N. K.; ABAS, M. R. B.; SOBHANZADEH, E.; LOW, K.H. Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1–3, p. 453–459, 2010.
- [73] SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, n. 8, p. 1207–1268, ago. 1996.
- [74] NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L. C.; ARAÚJO, G. C.; NOGUEIRA, A. R. A. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 1855-1876, 2002.
- [75] CHAO, T. T.; SANZOLONE, R. F. Decomposition techniques. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 44, n. 1–3, p. 65–106, 1992.
- [76] DANTAS, E. S. K. **Procedimentos analíticos em determinações multielementares de particulados de aerossol atmosférico para uso em modelo receptor**. São Paulo-SP, Instituto de química - UNESP, 1999. Tese de Doutorado, 82p.
- [77] MUSTRA, C. D. J. G. **Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metalóides em amostras biológicas: preparação de amostras por digestão com a tecnologia microondas**. Lisboa- Portugal, Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, 2009. Dissertação de mestrado, 124p.
- [78] FRESCHI, G. P. G.; DAKUZAKU, C. S.; GOMES NETO, J. A.; MORAES, M. D. Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite—uma revisão da técnica e aplicações. **Eclética Química**, v. 25, n. 1, p. 213-226, 2000.
- [79] DEDINA, J.; TSALEV, D. L. **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**, John Wiley, Chichester (1995).
- [80] ROLDAN, P. D. S.; KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. D. A. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica empregando filamentos de tungstênio. v. 13400, p. 970.
- [81] BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. D. L. Arsenic speciation-A review. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 58-70, 2000.

- [82] MOLLO, A; FERREIRA, S. L. C.; MOISES, K. Sequential Injection Analysis in Selenium Determination by HG-AAS: Optimisation and Interference Study. **Current Analytical Chemistry**, v. 9, p. 296-304, 2013.
- [83] ROBBINS, W. B.; CARUSO, J. A. Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 889-898, 1979.
- [84] 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: Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 6, p. 793-825, 2004.
- [85] MORETTO, A. L. **Determinação de arsênio por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto em um sistema de injeção em fluxo**. Campinas –SP, Instituto de química- Departamento de química analítica- Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2001. Tese de Doutorado, 116p.
- [86] NÉRI, T. D. S. **Desenvolvimento de um método para determinação de Sb (III) e Sb total em amostra de interesse ambiental utilizando geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica com chama**. Uberlândia- MG. Universidade Federal de Uberlândia- UFB, 2014. Dissertação de mestrado, 97p.
- [87] SIGRIST, M.; ALBERTENGO, A.; BELDOMÉNICO, H.; TUDINO, M. Determination of As (III) and total inorganic As in water samples using an on-line solid phase extraction and flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of hazardous materials**, v. 188, n. 1, p. 311-318, 2011.
- [88] BRINDLE, I. D.; ŁUGOWSKA, E. Investigations into mild conditions for reduction of Se (VI) to Se (IV) and for hydride generation in determination of selenium by direct current plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 2, p. 163-176, 1997.
- [89] SILVA, L. O. B. **Estratégias analíticas para determinação de cobre e cádmio em amostras ambientais empregando espectrometria de absorção atômica com geração de vapor químico**. Salvador- BA. Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia- UFB, 2016. Tese de Doutorado, 154p.
- [90] REZENDE, H. C. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos para especiação de As (III) e As total e determinação de Cd, Cr e Pb em fertilizantes fosfatados utilizando espectrometria de absorção atômica e extração assistida por ultrassom**. Uberlândia- MG. Programa de pós-graduação em Química Universidade Federal de Uberlândia-UFU, 2014. Tese de Doutorado, 117p
- [91] PINHO-ALVES, J. **Atividades Experimentais: Do Método À Prática Construtivista**. Florianópolis- SC. Programa de Pós-Graduação em educação, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2000. Tese de Doutorado, 303p.
- [92] FERREIRA, S. L. C.; SANTOS W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; BARROS NETO, B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry- review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004.

- [93] LAGO, A. C. D. **Método espectrofotométrico mecanizado de análise "on-line" baseado na pré-concentração de urânio em nanotubo de carbono**. Alfenas, MG, Universidade Federal de Alfenas, 2010. Dissertação de mestrado, 89 p.
- [94] FERREIRA, S. L.; DOS SANTOS, W. N.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004.
- [95] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338, 2006.
- [96] NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). **Miq. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, 2005.
- [97] COMPARINI, A.; PASSOS, G.; GRAZIADEI, H.; FERREIRA-SILVA, P. H.; LOUZADA, F. Metodologia de superfície de resposta: uma introdução nos softwares re estatística. **São Carlos**, v. 1001, p. 14, 2009.
- [98] DOEHLERT; D. H. Uniform shell designs. **Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)**, v. 19, p. 231-239, 1970.
- [99] CAMPAÑA, A. G.; RODRÍGUEZ, L. C.; GONZÁLEZ, A. L.; BARRERO, F. A.; CEBA, M. R. Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. **Analytica chimica acta**, v. 348, n. 1, p. 237-246, 1997.
- [100] MYER, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiment. **John Wiley and Sons**, New York, p. 343-350, 2002
- [101] BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Empirical Model-Building and Response Surfaces**, Wiley: New York, v.224, 1987, 663p.
- [102] CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105–126, 1999.
- [103] DEPOI, F. D. S.; POZEBON, D. The use of cloud point extraction and hydride generation for improving the Sb and Se limits of detection in ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2211-2221, 2012.
- [104] STRIPEIKIS, J.; COSTA, P.; TUDINO, M.; TROCCOLI, O. Flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometric determination of Se (VI) and Se (IV): utility of a conventionally heated water bath for the on-line reduction of Se (VI). **Analytica chimica acta**, v. 408, n. 1, p. 191-197, 2000.

- [105] ZHANG, Y.; ADELOJU, S. B. Flow injection–hydride generation atomic absorption spectrometric determination of selenium, arsenic and bismuth. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 724-730, 2008.
- [106] MACEDO, S. M. **Estratégias analíticas para análise de especiação de arsênio, antimônio e selênio em amostras ambientais usando amostragem por suspensão e HG AAS**. Salvador-BA, Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia- UFBA, 2010. Tese de doutorado, 101p.
- [107] AGRAWAL, K.; PATEL, K. S.; SHRIVAS, K. Development of surfactant assisted spectrophotometric method for determination of selenium in waste water samples. **Journal of hazardous materials**, v. 161, n. 2, p. 1245-1249, 2009.
- [108] IZGI, B.; GUCER, S.; JACIMOVIĆ, R. Determination of selenium in garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) by electro thermal atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 99, n. 3, p. 630-637, 2006.
- [109] HEGEDŰS, O.; HEGEDŰSOVÁ, A.; ŠIMKOVÁ, S.; PAVLÍK, V.; JOMOVÁ, K. Evaluation of the ET-AAS and HG-AAS methods of selenium determination in vegetables. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 6, p. 1287-1291, 2008.
- [110] ZHANG, Y.; ADELOJU, S. B. Flow injection–hydride generation atomic absorption spectrometric determination of selenium, arsenic and bismuth. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 724-730, 2008.
- [111] MATUSIEWICZ, H.; KRAWCZYK, M. On-line hyphenation of hydride generation with in situ trapping flame atomic absorption spectrometry for arsenic and selenium determination. **Analytical sciences**, v. 22, n. 2, p. 249-253, 2006.
- [112] IEGGLI, C. V. S.; BOHRER, D.; NOREMBERG, S.; DO NASCIMENTO, P. C.; DE CARVALHO, L. M.; VIEIRA, S. L.; REIS, R. N. Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 605-609, 2009.
- [113] SHRIVAS, K.; PATEL, D. K. Ultrasound assisted-hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of selenium in vegetable and fruit samples by using GF-AAS. **Food chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1673-1677, 2011.
- [114] ESCUDERO, L. A.; PACHECO, P. H.; GASQUEZ, J. A.; SALONIA, J. A. Development of a FI-HG-ICP-OES solid phase preconcentration system for inorganic selenium speciation in Argentinean beverages. **Food chemistry**, v. 169, p. 73-79, 2015.
- [115] Li, S. X.; ZHENG, F. Y.; CAI, S. J.; CAI, T. S. Determination of mercury and selenium in herbal medicines and hair by using a nanometer TiO_2 coated quartz tube atomizer and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of hazardous materials**, v. 189, n. 1, p. 609-613, 2011.

- [116] PANIGATI, M.; FALCIOLA, L.; MUSSINI, P.; BERETTA, G.; FACINO, R. M. Determination of selenium in Italian rices by differential pulse cathodic stripping voltammetry. **Food chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1091-1098, 2007.
- [117] KLASSEN, A.; KIM, M. L.; TUDINO, M. B.; BACCAN, N.; ARRUDA, M. A. Z. A metallic furnace atomizer in hydride generation atomic absorption spectrometry: Determination of bismuth and selenium. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 8, p. 850-855, 2008.
- [118] AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; BELLA, Z.; BOLLA, S.; SZAKÁL, P.; BENCS, L. Determination of total selenium content in cereals and bakery products by flow injection hydride generation graphite furnace atomic absorption spectrometry applying in-situ trapping on iridium-treated graphite platforms. **Microchimica Acta**, v. 150, n. 1, p. 1-8, 2005.
- [119] MUNIZ-NAVEIRO, O.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; BERMEJO-BARRERA, A.; BERMEJO-BARRERA, P.; COCHO, J. A.; FRAGA, J. M. Selenium speciation in cow milk obtained after supplementation with different selenium forms to the cow feed using liquid chromatography coupled with hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1587-1593, 2007.
- [120] SILDA, J. B. **Selênio: fontes alimentares e estado nutricional**. Campos dos goytacazes – RJ, Universidade federal do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2009. Dissertação de mestrado, 79p.
- [121] OLIVEIRA, E. D. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.
- [122] MATOS, W. O. **Desenvolvimento de Procedimentos de Digestão e Especificação para Amostras Biológicas**. São Carlos- SP, Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, 2011, Brasil. Tese de Doutorado, 110p.
- [123] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/31_98.htm acesso em 10 abril de 2016.
- [124] INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Selenium. In: _____. Dietary reference intakes: vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington (DC): **National Academy Press**, 2000. cap. 7, p. 284-324.
- [125] REILLY, P. C. Brazil nuts-the selenium supplement of choice. **Nutrition Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 177-184, 1999.