

## ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE Se EMPREGANDO

### HPLC-UV-HG-ICP OES

Freschi, Gian Paulo Giovanni<sup>1,2</sup> (PQ); Nogueira, Ana Rita Araujo<sup>1</sup> (PQ)

1 Grupo de Análise Instrumental Aplicada, Embrapa Pecuária Sudeste, C. P. 339,  
13560-070, São Carlos SP

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal da Grande Dourados,  
(0xx67) 3411-3600, Dourados, MS – Brasil  
gianpgfreschi@yahoo.com.br

*Palavras-chave: especiação química, selênio, HPLC-UV-HG-ICP OES*

## 1 INTRODUÇÃO

Embora a necessidade de análise de traços ou ultratraço seja clara, informações sobre a mobilidade, biodisponibilidade e o impacto desses elementos no sistema ecológico ou nos organismos vivos são tão ou mais importantes que a análise total de elementos; informações essas que não são obtidas por meio da determinação total dos elementos. O conhecimento das espécies químicas presentes em amostras clínicas proporciona uma maior compreensão dos processos químicos e bioquímicos envolvidos, resultando em informações mais completas e corretas sobre a toxicidade ou essencialidade de cada elemento. Diferentes formas de um mesmo elemento podem estar relacionadas ao estado de oxidação, formas organometálicas, composição isotópica ou estado de complexação [1].

A especiação química refere-se à identificação das várias formas químicas de um elemento presente em uma determinada amostra e à quantificação das mesmas, possibilitando a distinção entre as espécies mais ou menos tóxicas. Um exemplo bastante importante é o selênio, um mineral essencial e indispensável à saúde tanto dos seres humanos como dos animais. O selênio apresenta papel essencial em funções do organismo, tais como crescimento, reprodução, prevenção e proteção da integridade muscular. É um importante componente do tecido do coração e sua deficiência tem sido associada a doenças, tais como cardiomiopatias e distrofia muscular. Desordens no sistema reprodutivo em diferentes espécies animais também têm sido associadas à carência desse elemento [2,3]. A determinação de espécies de selênio em amostras clínicas baseia-se principalmente na hifenação de técnicas de separação e detecção, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida

(LC), ou eletroforese capilar (EC), para a separação, e espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), em forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) ou, mais recentemente, a espectrometria de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS) [1, 4].

A cromatografia líquida possui algumas vantagens comparadas a outras técnicas de separação tais como a GC e EC. A hifenação entre LC e os detectores espectrométricos (FAAS, ICP OES e ICP-MS) é relativamente simples e fácil, enquanto que o acoplamento entre EC e os mesmos detectores não é tão simples, além de proporcionar uma menor sensibilidade comparada à LC. Já com relação à GC a restrição é devido a necessidade de converter o analito em compostos voláteis, o que nem sempre é trivial, além da diluição causada pela grande quantidade de gás do GC que chega ao detector. A técnica de ICP OES é relativamente bem difundida, porém para a especiação de elementos em baixas concentrações, como selênio em amostras clínicas, possui uma sensibilidade considerada baixa. Uma alternativa bastante usada para melhorar a sensibilidade da técnica é o emprego da geração de hidretos (HG) por proporcionar a pré-concentração dos elementos. Essa técnica, HG-ICP OES, apresenta algumas vantagens, tais como excelente sensibilidade para elementos formadores de hidretos, como selênio, devido à eliminação da matriz na etapa de geração do respectivo hidreto, proporcionando em alguns casos, limites de detecção bastante adequados [5,6].

## 2 OBJETIVO

Considerando os aspectos descritos acima relacionados à importância da especiação de Se e a sua relevância do ponto de vista analítico e bioquímico, uma vez que uma melhor compreensão do metabolismo deste elemento no organismo de animais se faz necessário, método empregando a hifenação das técnicas de separação e detecção (HPLC-UV-HG-ICP OES) é proposto para a especiação de selênio.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplada indutivamente com configuração radial, Varian, modelo Vista AX foi empregado para a detecção. Para o processo de extração/redução do selênio foi utilizada uma câmara de foto-redução em linha com lâmpada de 15 W. Um sistema para a geração de hidretos empregando bomba peristáltica de 8 canais (Ismatec, Suíça) e uma câmara de separação gás-líquido, desenvolvido no grupo, também foram empregados.

Para a separação das diferentes formas de selênio, um sistema cromatográfico empregando uma bomba de alta pressão (Varian Pro-star, mod.210) e coluna de troca aniônica, incluindo pré-colunas foi empregada (Varian-ChromSep HPLC Column SS, 250x4,6 mm).

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada em sistema de purificação Milli-Q, resistividade 18 M $\Omega$  cm (Millipore, Bedford, USA). Para evitar problemas relacionados a contaminação, ácido clorídrico destilado abaixo do seu ponto de ebulição em subdestilador de quartzo DuoPur, (Milestone, Sorisole, BG, Itália) foi empregado no preparo das soluções e amostras. As soluções estoque dos analitos foram preparadas a partir dos sais NaSeO<sub>3</sub>, Selenometionina e Selenocistamina (Sigma-Aldrich).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte dos estudos para promover a especiação de selênio, a hifenação dos sistemas de separação, foto-redução, geração de hidretos e detecção, foi ajustada a vazão de cada um dos sistemas de acordo com a vazão de eluição da bomba de HPLC (0,5 mL.min<sup>-1</sup>). Foram empregados como eluentes diferentes concentrações de tampão fosfato em diferentes valores de pH. Concentrações maiores que 50mM do tampão resultaram em piores separações, ou seja, tais concentrações favoreceram a sobreposição dos picos. Solução tampão com valores de pH entre 6 e 8 favoreceram uma melhor separação das espécies orgânicas, sem sobreposição com o pico de Se<sup>4+</sup>. Foi testado também 100 mM de tampão acetato em pH 7, porém foi observada sobreposição entre os picos dos compostos orgânicos, apesar de ser adequada para a separação de Se<sup>4+</sup>. Assim, o eluente selecionado para a separação das espécies de Se foi 40mM de tampão fosfato em pH 6. No sistema de foto-redução foram avaliados o tempo de exposição à lâmpada de ultravioleta (UV) e a adição de agentes redutores como HCl (50% v/v) e HCl-KBr. A adição de KBr não proporcionou melhora no sistema de redução e apenas HCl (50% v/v) foi suficiente para a redução das espécies orgânicas. O tempo de exposição ao UV foi estabelecido como 5 min nas condições do experimento. As condições para a geração de hidretos e detecção foram estudadas e os melhores resultados foram obtidos empregando solução de 1,1% (v/v) borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) em meio 1% (v/v) de hidróxido de sódio (NaOH) a uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. A separação gás-líquido foi efetuada em câmara confeccionada no laboratório [7], sendo também estabelecidas as condições adequadas de operação do ICP OES, tais como potência da bobina, altura de observação e comprimento de onda.

## 5 CONCLUSÕES

A hifenação das técnicas de separação e detecção foi possível e a redução em linha com a câmara de foto-redução mostrou-se eficaz no processo de redução das espécies de Se orgânicos e inorgânico para  $Se^{4+}$ . A separação das espécies orgânicas e inorgânica foram possíveis empregando 40 mM de tampão fosfato em pH 6.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CARUSO, J.A.; SUTTON, K.L.; ACKLEY, K.L. **Elemental Speciation – New Approaches for Trace Element Analysis**. Elsevier, Amsterdam, 2000, 580p.
- [2] KOT, A.; NAMIESNIK, J. The role of speciation in analytical chemistry, **Trends Anal. Chem.**, v. 19, p. 69-79, 2000.
- [3] CARUSO, J.A.; KLAUE, B.; MICHALKE, B.; ROCKE, D.M. Group assessment: elemental speciation, **Ecotoxicol. Environm. Safety**, v. 56, p. 32-44, 2003.
- [4] SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Determination and Speciation of metals by liquid chromatography, **J. Chromatogr.**, v. 789, p. 301-321, 1997.
- [5] CAPELO, J.L., FERNADEZ, C., PEDRAS, B., SANTOS, P., GONZALEZ, P., VAZ, C. Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS, **Talanta**, v. 68, p. 1442-1447, 2006.
- [6] MAZEJ, D., FALNOGA, I., VEBER, M., STIBILIJ, V. Determination of selenium species in plant leaves by HPLC-UV-HG-AFS, **Talanta**, v. 68, p. 558-568, 2006.
- [7] Crispino, C.C., Determinação de As, Sb e Se em material agrônômico por espectrometria de emissão óptica acoplada a plasma induzido com geração de hidretos, HG-ICP-OES). 2005. 95p. Dissertação de mestrado, DQ/Universidade Federal de São Carlos.