



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Programa de Pós-Graduação em Química



EXPLORAÇÃO DE MODELAGENS MATEMÁTICAS EM  
DETERMINAÇÕES POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA  
EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

FÁBIO SANTOS DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Mauro Korn

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Federal da  
Bahia, UFBA, para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências Naturais -  
Química.

Salvador, BA  
2001

# AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por todos os momentos bons e ruins que fizeram me conduzir sempre ao bom caminho e me desviar dos maus pensamentos

Aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a Michelle por ela estar presente sempre ao meu lado, dando-me o apoio necessário na elaboração dessa dissertação.

Gostaria de agradecer,

aos meus colegas do laboratório da UNEB, Sivanildo e Jacira. Sem o apoio e amizade de vocês esta dissertação não seria concluída.

a meu orientador, Mauro Korn, pela amizade e dedicação ao trabalho durante todo o tempo que fiquei sob sua orientação, sem seu incentivo certamente não teria chegado até o final.

a todos da UNEB e UFBA : professores, alunos e funcionários pelo amigável convívio durante esses anos

ao Dr. Celso Spínola e Dr. Leonardo Teixeira por permitirem o uso de resultados dos seus trabalhos e por todas discussões essenciais na confecção dessa dissertação

e a CAPES pela bolsa concedida durante a elaboração dessa dissertação.

# SUMÁRIO

I	Introdução .....	1
II	A espectrofotometria em fase sólida.....	3
III	Objetivos.....	17
IV	Descrição do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria em fase sólida .....	19
IV.1	Experimental.....	19
IV.2	Equipamento e acessórios .....	20
IV.3	Descrição dos diagramas de fluxo.....	21
IV.4	As celas de fluxo para o sistema FI-EFS.....	25
IV.5	O 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) imobilizado em C <sub>18</sub> .....	28
IV.6	O sincronizador.....	30
V	Avaliação e modelamento da dispersão em sistemas FI-EFS empregando multicomutação.....	33
V.1	Estudo e modelagem dos perfis dos sinais transientes gerados no sistema FI-EFS.....	36
V.1.1	Experimental – Procedimento.....	36
V.1.2	Resultados e discussão.....	39
V.1.3	Conclusões.....	54
V.2	Estudo da reação em linha de zinco e oxalato empregando multicomutação e detecção por FI-EFS.....	56
V.2.1	Experimental – Procedimento.....	57
V.2.2	Resultados e discussão.....	59
V.2.3	Conclusões.....	74
VI	Aplicações de métodos matemáticos em sistemas FIA.....	76
VII	Desenvolvimento de modelos matemáticos para determinação de zinco empregando padrão único em sistema de análise por injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria em fase sólida.....	78
VII.1	Estudos preliminares.....	84
VII.1.1	Experimental – Procedimento.....	85

VII.1.2	Resultados e discussão.....	86
VII.1.3	Conclusões.....	94
VII.2	Desenvolvimento de sistema FI-EFS para construção de curvas analíticas obtidas pelo emprego de injeções seqüenciais do padrão único para determinação de zinco.....	94
VII.2.1	Procedimento – Experimental.....	96
VII.2.2	Resultados e discussão.....	97
VII.2.3	Conclusões.....	103
VII.2	Desenvolvimento de metodologia analítica para construção de curvas analíticas pelo emprego de uma única injeção de solução de padrão único para determinação de zinco em sistema FI-EFS.....	104
VII.2.1	Procedimento – Experimental.....	105
VII.2.2	Resultados e discussão.....	106
VII.2.3	Conclusões.....	111
VIII	Aplicação do método dos mínimos quadrados parciais nas determinações por espectrofotometria em fase sólida associada à sistema de análise por injeção em fluxo.....	112
VIII.1	O método dos mínimos quadrados parciais (PLS).....	116
VIII.2	Aplicação do método dos mínimos quadrados parciais na determinação de zinco por espectrofotometria em fase sólida acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo...	128
VIII.2.1	Experimental – Procedimento.....	129
VIII.2.2	Resultados e discussão.....	130
VIII.2.3	Conclusões.....	135
VIII.3	Aplicação do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) na determinação simultânea de zinco e níquel em misturas por FI-EFS.....	136
VIII.3.1	Reagentes e Soluções.....	137
VIII.3.2	Diagrama de fluxo.....	137
VIII.3.3	Resultados e discussão.....	139
VIII.3.4	Conclusões.....	149
IX	Potencialidades e aplicações.....	150

<b>X</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>151</b>
	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>152</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** *Relação entre a absorção do complexo Fe(III)-ferroína, em presença de ácido ascórbico, com o inverso da massa da fase sólida ..... 14*
- Fig. 2** *Relação entre a absorção do analito imobilizado e o volume de solução-amostra utilizado, na análise de hidrazina utilizando pDAB como reagente ..... 15*
- Fig. 3** *Relação entre o intervalo de tempo de agitação e a absorbância do complexo formado entre V(V) e 5-BrSHA imobilizado em Sephadex QAE A-25 ..... 15*
- Fig. 4** *Diagrama de fluxo do sistema FI-EFS desenvolvido, onde Am é a solução-amostra ou a solução de referência, Ca é a solução carregadora ( $H_2O$  ou tampão hexamina  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=6,2$ ) e HCl é a solução do eluente a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , DET – espectrofotômetro equipado com cela de fluxo contendo fase sólida. .... 22*
- Fig. 5** *Diagrama de fluxo do sistema FI-EFS desenvolvido para análise da reação entre zinco e oxalato empregando multicomutação, onde Am é a solução-amostra, Ca é a solução carregadora (tampão hexamina  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=6,2$ ) e HCl é a solução do eluente a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , DET – espectrofotômetro equipado com cela de fluxo contendo fase sólida e Ox – é a solução de oxalato de potássio..... 24*
- Fig. 6** *Representação esquemática da cela de fluxo para FI-EFS..... 26*

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 7** Diagrama esquemático da cela de fluxo para FI-EFS construída especialmente para o espectrofotômetro Femto 432, (a) vista lateral e (b) vista frontal. .... 27
- Fig. 8** Espectro de absorção do complexo Zn-TAN-C18 em pH 6,2 , usando uma solução  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Zn. .... 30
- Fig. 9** Diagrama esquemático do circuito do sincronizador. CH – chave interruptora do tipo “switch”,  $R_1$  – resistor,  $d_7$  – canal 7 da entrada do conversor analógico/digital da interface PCL-711C..... 31
- Fig. 10** Ilustração de dois pulsos do analito separados por um certo intervalo de tempo em sistema de fluxo contínuo..... 37
- Fig. 11** Ilustração de duas injeções consecutivas do analito separadas por diferentes intervalos de tempo, sendo que esse intervalo de tempo aumenta como mostrado em (a), (b), (c) e (d) respectivamente..... 38
- Fig. 12** Diagrama temporal do acionamento das válvulas  $v_1$ ,  $v_2$  e  $v_3$  , correspondentes à solução de zinco, ao carregador e eluente, respectivamente. O traço em nível alto indica o acionamento da válvula correspondente e a largura indica a duração do acionamento. Am – etapa de injeção da uma alíquota da amostras, C – passagem da solução carregadora, Le – etapa de leitura do sinal transiente, EL – etapa de eluição..... 38



## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 13** *Ilustração do perfil de um pico FIA em sistemas ordinários com a passagem do pulso disperso da amostra. .... 40*
- Fig. 14** *Perfil dos sinais transientes em sistema FI-EFS obtido pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco (a) e primeira derivada da absorbância em função do tempo (b). ..... 42*
- Fig. 15** *Perfil do pico obtido pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco (a), gráfico obtido deslocando o gráfico (a) em 30s e (c) soma das curvas (a) e (b) ..... 45*
- Fig. 16** *Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 60 cm..... 46*
- Fig. 17** *Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 100 cm..... 47*

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 18** *Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 150 cm..... 48*
- Fig. 19** *Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 60 cm..... 50*
- Fig. 20** *Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 100 cm..... 51*

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 21** *Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 150 cm..... 52*
- Fig. 22** *Ilustração do processo de mistura quando 3 frações do reagente (vermelho) e da amostra (amarelo) são inseridos por amostragem binária no processo analítico. Em (a) a mistura não é eficiente em (b) inicia-se uma mistura mais eficiente entre as frações e (c) a mistura torna-se homogênea..... 59*
- Fig. 23** *Sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 frações de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 frações de solução 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio com tempo de abertura da válvula do oxalato de (a) 0 s, (b) 0,1 s, (c) 0,2 s, (d) 0,3 s, (e) 0,4 s e (f) 0,5 s..... 63*
- Fig. 24** *Derivadas dos sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda..... 64*

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 25** *Variação do sinal máximo, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **66**
- Fig. 26** *Variação da absorbância na região de patamar, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **67**
- Fig. 27** *Variação do máximo da derivada do sinal obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **68**

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 29** *Sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.....* **69**
- Fig. 30** *Derivadas dos sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.....* **71**
- Fig. 31** *Variação da absorbância na região de patamar, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **72**

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 32** *Variação do máximo da derivada do sinal obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **73**
- Fig. 33** *Técnica de calibração por gradiente (A) calibração com quatro soluções padrão de concentrações decrescentes (a-d) injetadas em triplicata, (B) perfil do pico FIA para a solução padrão de concentração mais elevada, (C) curva de calibração preparada a partir de (B) e relacionada com os sinais nos intervalos de tempo  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ , e  $t_d$ .....* **80**
- Fig. 33** *Perfis dos sinais transientes obtidos a partir de 6 injeções sequenciais de 5 s de abertura de válvula (133  $\mu\text{L}$ ) de solução 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco relacionado com o tempo total de abertura da válvula da solução-amostra (A) e o FIAGrama obtido nas mesmas condições (B).....* **87**

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 34** *Valores de absorvância, obtidos após injeções seqüenciais de solução 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo de abertura das válvulas de 5 s (133  $\mu\text{L}$ ), versus tempo total de abertura de válvula da amostra (A) plotando-se todos os pontos obtidos e (B) plotando-se os pontos relativos a região linear do gráfico..... 88*
- Fig. 35** *Perfis dos sinais transientes obtidos a partir de 20 injeções seqüenciais de solução 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco, com 10s de cada abertura da válvula da amostra (267  $\mu\text{L}$ ) relacionados com o tempo total de abertura da válvula da amostra utilizando-se água destilada e desionizada como carregadora. 90*
- Fig. 36** *Valores máximos de absorvância obtido, após injeções seqüenciais de solução 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo de abertura da válvula da amostra para cada injeção de 10s (267 $\mu\text{L}$ ), versus o tempo total de abertura da válvula da amostra (A) plotando-se todos os pontos obtidos e (B) plotando-se os pontos referentes a região linear do gráfico..... 92*
- Fig. 37** *FIAGrama obtido pelo registro dos sinais transientes da região de patamar obtido após injeções seqüenciais de solução 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo da abertura da válvula de 10 s (267  $\mu\text{L}$ )..... 93*

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 38** *Curvas de absorvância versus tempo total de abertura da válvula do analito, para a solução do padrão único (2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, sendo todos experimentos realizados em triplicata..... 97*
- Fig. 39** *Valores das inclinações das retas ilustradas na Figura 38 versus concentração de zinco..... 98*
- Fig. 40** *Curvas de absorvância , corrigindo o branco, versus tempo total de abertura da válvula do analito, para a solução do padrão único (2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, sendo todos experimentos realizados em triplicata..... 99*
- Fig. 41** *Curvas de absorvância , corrigindo o branco, versus concentração de zinco para diferentes intervalos de tempo de abertura da válvula do analito, sendo todos experimentos realizados em triplicata..... 100*
- Fig. 42** *Absortividade molar aparente do complexo Zn-TAN - C<sub>18</sub> versus volume de solução de zinco injetado..... 102*
- Fig. 43** *Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras sintéticas e do padrão único de zinco..... 106*



## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

<b>Fig. 44</b>	<i>Absorbância versus concentração de zinco.....</i>	<b>107</b>
<b>Fig. 45</b>	<i>Absorbância das amostras sintéticas versus absorbância do padrão único de zinco, em intervalos de tempo de leitura equivalentes.....</i>	<b>108</b>
<b>Fig. 46</b>	<i>Inclinação das retas, obtidas empregando metodologia do padrão único e injeção única, versus concentração de zinco em amostras sintéticas.....</i>	<b>109</b>
<b>Fig. 47</b>	<i>Uma matriz de dados químicos com <math>n</math> linhas e <math>p</math> colunas, da matriz <math>x_{ki}</math> , indicando o valor do <math>k</math>-ésimo objeto e da <math>i</math>-ésima variável.....</i>	<b>116</b>
<b>Fig. 48</b>	<i>Ilustração da projeção dos dados nos componentes principais.</i>	<b>123</b>
<b>Fig. 49</b>	<i>Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40 <math>\mu\text{L}</math> da solução de zinco com concentrações de 0,00 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>; 0,10 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>; 0,20 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>; 0,30 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>; 0,40 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>; 0,50 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>; 1,00 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math> e 2,00 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>.....</i>	<b>131</b>
<b>Fig. 50</b>	<i>PRESS versus número de variáveis latentes empregadas no PLS.....</i>	<b>133</b>

## LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Fig. 51** *Diagrama de fluxo do sistema empregado na análise por espectrofotometria em fase sólida. Na posição (a) de amostragem e (b) de injeção; W-amostra; C-fluxo carregador (H<sub>2</sub>O); L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>-loops da amostra e do solvente (400μL e 625μL, respectivamente); B-bobina de delay-80cm; W-descarte; DET – espectrofotômetro equipado com uma cela contendo a fase sólida.....* **138**
- Fig. 52** *Picos FIA das soluções de referências e amostras sintéticas de zinco e níquel, analisadas em duplicata.....* **141**
- Fig. 53** *FIAgrama das soluções de referência e amostras sintéticas (a) antes e (b) após a correção da linha de base. A linha vermelha liga os valores da linha de base calculadas após cada injeção.....* **143**
- Fig. 54** *Picos usados na calibração por PLS (a) antes e (b) após a correção da linha de base.....* **145**
- Fig. 55** *Perfis dos picos FIA para zinco e níquel baseado no primeiro loading weight dp PLS1.....* **146**
- Fig. 56** *PRESS versus o número de componentes empregados.....* **147**

# LISTA DE TABELAS

<b>Tab. 1</b>	<i>Resultados obtidos empregando a metodologia das injeções seqüências com uso de padrão único (2,00<math>\mu</math>g mL<sup>-1</sup>) na determinação de zinco em amostras sintéticas. ....</i>	<b>101</b>
<b>Tab. 2</b>	<i>Resultados obtidos empregando a metodologia do padrão único (2,00 <math>\mu</math>g mL<sup>-1</sup>) e injeção única no cálculo da concentrações de zinco em amostras sintéticas. ....</i>	<b>110</b>
<b>Tab. 3</b>	<i>Algoritmo PLS para calibração.....</i>	<b>126</b>
<b>Tab. 4</b>	<i>Algoritmo PLS para previsão.....</i>	<b>127</b>
<b>Tab. 5</b>	<i>Resultados obtidos para as concentrações de zinco calculadas por PLS.....</i>	<b>134</b>
<b>Tab. 6</b>	<i>Concentrações das soluções mistas, contendo zinco e níquel, de referência e das amostras sintéticas. ....</i>	<b>142</b>
<b>Tab. 7</b>	<i>Concentrações de zinco e níquel calculadas para amostras sintéticas em duplicata. ....</i>	<b>148</b>

# SIGLAS E ABREVIações

<b>TAN</b>	1-(2-tiazolilazo)-2-naftol
<b>EFS</b>	espectrofotometria em fase sólida
<b>FIA</b>	análise por injeção em fluxo
<b>FI-EFS</b>	análise por injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria em fase sólida
<b>PAN</b>	1-(2-piridilazo)-2-naftol
<b>TPPS</b>	ácido 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H,porfinotetrasulfonico
<b>pDAB</b>	p-(dimetilamina)-benzaldeído
<b>5-BrSHA</b>	ácido 5-bromosalicílico
<b>CLS</b>	método dos mínimos quadrados clássico
<b>ILS</b>	método dos mínimos quadrados inverso
<b>PCA</b>	análise de componentes principais
<b>PLS</b>	método dos mínimos quadrados parciais
<b>PRESS</b>	soma quadrática residual dos erros da previsão
<b>RMSEP</b>	raiz da média dos erros quadráticos da previsão

## RESUMO

A espectrofotometria em fase sólida (EFS) acoplada a sistemas de injeção em fluxo tem sido bastante explorada na determinação de várias espécies químicas em baixas concentrações. Em EFS, um suporte sólido contendo o analito imobilizado é colocado numa cela posicionada no caminho ótico, sendo as medidas realizadas *in situ*, integrando as etapas de imobilização, concentração e detecção. Dentre os trabalhos realizados empregado EFS em sistemas de análise por injeção em fluxo, algumas técnicas de modelagens matemáticas foram aplicadas com sucesso, podendo-se destacar as técnicas derivativas, a calibração multivariada e sistemas de equações lineares. Todavia, certas propriedades inerentes aos sistemas FI-EFS ainda não tinham sido suficientemente exploradas de forma a criar modelos matemáticos aplicados nas determinações.

O trabalho desenvolvido objetivou a exploração de modelos matemáticos aplicados às determinações por espectrofotometria em fase sólida em sistemas de análise por injeção em fluxo. Este foi dividido em três etapas distintas:

- (1) avaliação e modelagem da dispersão em sistema FI-EFS empregando multicomutação
- (2) desenvolvimento de algoritmos e metodologias analíticas para a determinação de zinco utilizando padrão único
- (3) aplicação de regressão multivariada para a determinação de zinco e misturas de zinco e níquel

As metodologias de análise desenvolvidas apresentaram boa precisão e exatidão, para um nível de 95% de confiabilidade, além de baixos limites de detecção e determinação.

## ABSTRACT

Solid phase spectrophotometry (SPS) coupled with flow injection systems have been explored for determination of several chemical species at low concentration levels. In SPS analysis a solid support with an immobilized species is placed into a cell which is positioned at the optic path. Measurements are performed *in situ*, integrating immobilization, concentration and detection analytical steps. Some mathematical models were developed to be employed on flow injection systems coupled with solid phase spectrophotometry detection. On the other hand, certain inherent properties to FI-SPS systems still not explored to develop algorithms applied for chemical species determinations.

In this work mathematical models were applied to determine chemical species and to evaluate the sample zone dispersion by FI-SPS system. This work was divided in three different stages:

- (1) evaluation and modelling of dispersion in FI-SPS system applying multicommutation concept
- (2) development of algorithms and analytical methodologies for zinc determination employing single standard solution
- (3) application of multivariate calibration models for determination of chemical species in FI-SPS systems.

The developed analysis methodologies presented good precision and accuracy at 95% confidence level, besides low detection limits and determination.

# SUMÁRIO

I	Introdução .....	1
II	A espectrofotometria em fase sólida.....	3
III	Objetivos.....	17
IV	Descrição do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria em fase sólida .....	19
IV.1	Experimental.....	19
IV.2	Equipamento e acessórios .....	20
IV.3	Descrição dos diagramas de fluxo.....	21
IV.4	As celas de fluxo para o sistema FI-EFS.....	25
IV.5	O 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) imobilizado em C <sub>18</sub> .....	28
IV.6	O sincronizador.....	30
V	Avaliação e modelamento da dispersão em sistemas FI-EFS empregando multicomutação.....	33
V.1	Estudo e modelagem dos perfis dos sinais transientes gerados no sistema FI-EFS.....	36
V.1.1	Experimental – Procedimento.....	36
V.1.2	Resultados e discussão.....	39
V.1.3	Conclusões.....	54
V.2	Estudo da reação em linha de zinco e oxalato empregando multicomutação e detecção por FI-EFS.....	56
V.2.1	Experimental – Procedimento.....	57
V.2.2	Resultados e discussão.....	59
V.2.3	Conclusões.....	74
VI	Aplicações de métodos matemáticos em sistemas FIA.....	76
VII	Desenvolvimento de modelos matemáticos para determinação de zinco empregando padrão único em sistema de análise por injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria em fase sólida.....	78
VII.1	Estudos preliminares.....	84
VII.1.1	Experimental – Procedimento.....	85
VII.1.2	Resultados e discussão.....	86

VII.1.3	Conclusões.....	94
VII.2	Desenvolvimento de sistema FI-EFS para construção de curvas analíticas obtidas pelo emprego de injeções seqüenciais do padrão único para determinação de zinco.....	94
VII.2.1	Procedimento – Experimental.....	96
VII.2.2	Resultados e discussão.....	97
VII.2.3	Conclusões.....	103
VII.2	Desenvolvimento de metodologia analítica para construção de curvas analíticas pelo emprego de uma única injeção de solução de padrão único para determinação de zinco em sistema FI-EFS.....	104
VII.2.1	Procedimento – Experimental.....	105
VII.2.2	Resultados e discussão.....	106
VII.2.3	Conclusões.....	111
VIII	Aplicação do método dos mínimos quadrados parciais nas determinações por espectrofotometria em fase sólida associada à sistema de análise por injeção em fluxo.....	112
VIII.1	O método dos mínimos quadrados parciais (PLS).....	116
VIII.2	Aplicação do método dos mínimos quadrados parciais na determinação de zinco por espectrofotometria em fase sólida acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo...	128
VIII.2.1	Experimental – Procedimento.....	129
VIII.2.2	Resultados e discussão.....	130
VIII.2.3	Conclusões.....	135
VIII.3	Aplicação do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) na determinação simultânea de zinco e níquel em misturas por FI-EFS.....	136
VIII.3.1	Reagentes e Soluções.....	137
VIII.3.2	Diagrama de fluxo.....	137
VIII.3.3	Resultados e discussão.....	139
VIII.3.4	Conclusões.....	149
IX	Potencialidades e aplicações.....	150
X	Conclusões.....	152



<b>XI</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>153</b>
-----------	--	------------

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** *Relação entre a absorção do complexo Fe(III)-ferroína, em presença de ácido ascórbico, com o inverso da massa da fase sólida ..... 14*
- Fig. 2** *Relação entre a absorção do analito imobilizado e o volume de solução-amostra utilizado, na análise de hidrazina utilizando pDAB como reagente ..... 15*
- Fig. 3** *Relação entre o intervalo de tempo de agitação e a absorbância do complexo formado entre V(V) e 5-BrSHA imobilizado em Sephadex QAE A-25 ..... 15*
- Fig. 4** *Diagrama de fluxo do sistema FI-EFS desenvolvido, onde Am é a solução-amostra ou a solução de referência, Ca é a solução carregadora ( $H_2O$  ou tampão hexamina  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=6,2$ ) e HCl é a solução do eluente a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , DET – espectrofotômetro equipado com cela de fluxo contendo fase sólida. .... 22*
- Fig. 5** *Diagrama de fluxo do sistema FI-EFS desenvolvido para análise da reação entre zinco e oxalato empregando multicomutação, onde Am é a solução-amostra, Ca é a solução carregadora (tampão hexamina  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=6,2$ ) e HCl é a solução do eluente a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , DET – espectrofotômetro equipado com cela de fluxo contendo fase sólida e Ox – é a solução de oxalato de potássio..... 24*
- Fig. 6** *Representação esquemática da cela de fluxo para FI-EFS..... 26*

- Fig. 7** Diagrama esquemático da cela de fluxo para FI-EFS construída especialmente para o espectrofotômetro Femto 432, (a) vista lateral e (b) vista frontal. .... 27
- Fig. 8** Espectro de absorção do complexo Zn-TAN-C18 em pH 6,2 , usando uma solução  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Zn. .... 30
- Fig. 9** Diagrama esquemático do circuito do sincronizador. CH – chave interruptora do tipo “switch”,  $R_1$  – resistor,  $d_7$  – canal 7 da entrada do conversor analógico/digital da interface PCL-711S..... 31
- Fig. 10** Ilustração de dois pulsos do analito separados por um certo intervalo de tempo em sistema de fluxo contínuo..... 37
- Fig. 11** Ilustração de duas injeções consecutivas do analito separadas por diferentes intervalos de tempo, sendo que esse intervalo de tempo aumenta como mostrado em (a), (b), (c) e (d) respectivamente..... 38
- Fig. 12** Diagrama temporal do acionamento das válvulas  $v_1$ ,  $v_2$  e  $v_3$  , correspondentes à solução de zinco, ao carregador e eluente, respectivamente. O traço em nível alto indica o acionamento da válvula correspondente e a largura indica a duração do acionamento. Am – etapa de injeção da uma alíquota da amostras, C – passagem da solução carregadora, Le – etapa de leitura do sinal transiente, EL – etapa de eluição..... 38
- Fig. 13** Ilustração do perfil de um pico FIA em sistemas ordinários com a passagem do pulso disperso da amostra. .... 40

- Fig. 14** *Perfil dos sinais transientes em sistema FI-EFS obtido pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco (a) e primeira derivada da absorbância em função do tempo (b). .....* **42**
- Fig. 15** *Perfil do pico obtido pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco (a), gráfico obtido deslocando o gráfico (a) em 30s e (c) soma das curvas (a) e (b) .....* **45**
- Fig. 16** *Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 60 cm.....* **46**
- Fig. 17** *Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 100 cm.....* **47**
- Fig. 18** *Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 150 cm.....* **48**

- Fig. 19** *Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 60 cm..... 50*
- Fig. 20** *Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 100 cm..... 51*
- Fig. 21** *Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 150 cm..... 52*
- Fig. 22** *Ilustração do processo de mistura quando 3 frações do reagente (vermelho) e da amostra (amarelo) são inseridos por amostragem binária no processo analítico. Em (a) a mistura não é eficiente em (b) inicia-se uma mistura mais eficiente entre as frações e (c) a mistura torna-se homogênea..... 59*
- Fig. 23** *Sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem*

binária de 3 frações de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 frações de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio com tempo de abertura da válvula do oxalato de (a) 0 s, (b) 0,1 s, (c) 0,2 s, (d) 0,3 s, (e) 0,4 s e (f) 0,5 s..... 63

**Fig. 24** Derivadas dos sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda..... 64

**Fig. 25** Variação do sinal máximo, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados..... 66

**Fig. 26** Variação da absorbância na região de patamar, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados..... 67

**Fig. 27** Variação do máximo da derivada do sinal obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de

*abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **68**

**Fig. 29** *Sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.....* **69**

**Fig. 30** *Derivadas dos sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.....* **71**

**Fig. 31** *Variação da absorbância na região de patamar, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.....* **72**

**Fig. 32** *Variação do máximo da derivada do sinal obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$*

$mL^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 mol L^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados..... 73

**Fig. 33** Técnica de calibração por gradiente (A) calibração com quatro soluções padrão de concentrações decrescentes (a-d) injetadas em triplicata, (B) perfil do pico FIA para a solução padrão de concentração mais elevada, (C) curva de calibração preparada a partir de (B) e relacionada com os sinais nos intervalos de tempo  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ , e  $t_d$ ..... 80

**Fig. 33** Perfis dos sinais transientes obtidos a partir de 6 injeções sequenciais de 5 s de abertura de válvula ( $133 \mu L$ ) de solução  $1,00 \mu g mL^{-1}$  de zinco relacionado com o tempo total de abertura da válvula da solução-amostra (A) e o FIAGrama obtido nas mesmas condições (B)..... 87

**Fig. 34** Valores de absorvância, obtidos após injeções seqüenciais de solução  $1,00 \mu g mL^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo de abertura das válvulas de 5 s ( $133 \mu L$ ), versus tempo total de abertura de válvula da amostra (A) plotando-se todos os pontos obtidos e (B) plotando-se os pontos relativos a região linear do gráfico..... 88

**Fig. 35** Perfis dos sinais transientes obtidos a partir de 20 injeções seqüenciais de solução  $1,00 \mu g mL^{-1}$  de zinco, com 10s de cada abertura da válvula da amostra ( $267 \mu L$ ) relacionados com o tempo total de abertura da válvula da amostra



*utilizando-se água destilada e desionizada como carregadora.*

- Fig. 36** *Valores máximos de absorvância obtido, após injeções seqüenciais de solução  $1\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo de abertura da válvula da amostra para cada injeção de 10s ( $267\mu\text{L}$ ), versus o tempo total de abertura da válvula da amostra (A) plotando-se todos os pontos obtidos e (B) plotando-se os pontos referentes a região linear do gráfico.....* **92**
- Fig. 37** *FIograma obtido pelo registro dos sinais transientes da região de patamar obtido após injeções seqüenciais de solução  $1,00\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo da abertura da válvula de 10 s ( $267\mu\text{L}$ ).....* **93**
- Fig. 38** *Curvas de absorvância versus tempo total de abertura da válvula do analito, para a solução do padrão único ( $2,00\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, sendo todos experimentos realizados em triplicata.....* **97**
- Fig. 39** *Valores das inclinações das retas ilustradas na Figura 38 versus concentração de zinco.....* **98**
- Fig. 40** *Curvas de absorvância , corrigindo o branco, versus tempo total de abertura da válvula do analito, para a solução do padrão único ( $2,00\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, sendo todos experimentos realizados em triplicata.....* **99**
- Fig. 41** *Curvas de absorvância , corrigindo o branco, versus*

	<i>concentração de zinco para diferentes intervalos de tempo de abertura da válvula do analito, sendo todos experimentos realizados em triplicata.....</i>	<b>100</b>
<b>Fig. 42</b>	<i>Absortividade molar aparente do complexo Zn-TAN - C<sub>18</sub> versus volume de solução de zinco injetado.....</i>	<b>102</b>
<b>Fig. 43</b>	<i>Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40 µL das soluções das amostras sintéticas e do padrão único de zinco.....</i>	<b>106</b>
<b>Fig. 44</b>	<i>Absorbância versus concentração de zinco.....</i>	<b>107</b>
<b>Fig. 45</b>	<i>Absorbância das amostras sintéticas versus absorbância do padrão único de zinco, em intervalos de tempo de leitura equivalentes.....</i>	<b>108</b>
<b>Fig. 46</b>	<i>Inclinação das retas, obtidas empregando metodologia do padrão único e injeção única, versus concentração de zinco em amostras sintéticas.....</i>	<b>109</b>
<b>Fig. 47</b>	<i>Uma matriz de dados químicos com n linhas e p colunas, da matriz <math>x_{ki}</math>, indicando o valor do k-ésimo objeto e da i-ésima variável.....</i>	<b>116</b>
<b>Fig. 48</b>	<i>Ilustração da projeção dos dados nos componentes principais.</i>	<b>123</b>
<b>Fig. 49</b>	<i>Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40 µL da solução de zinco com concentrações de 0,00 µg mL<sup>-1</sup>; 0,10 µg mL<sup>-1</sup>; 0,20 µg mL<sup>-1</sup>; 0,30 µg mL<sup>-1</sup>; 0,40 µg mL<sup>-1</sup>; 0,50 µg mL<sup>-1</sup>; 1,00 µg mL<sup>-1</sup> e 2,00 µg mL<sup>-1</sup>.....</i>	<b>131</b>
<b>Fig. 50</b>	<i>PRESS versus número de variáveis latentes empregadas no PLS.....</i>	<b>133</b>

- Fig. 51** *Diagrama de fluxo do sistema empregado na análise por espectrofotometria em fase sólida. Na posição (a) de amostragem e (b) de injeção; W-amostra; C-fluxo carregador (H<sub>2</sub>O); L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>-loops da amostra e do solvente (400 $\mu$ L e 625 $\mu$ L, respectivamente); B-bobina de delay-80cm; W-descarte; DET – espectrofotômetro equipado com uma cela contendo a fase sólida.....* **138**
- Fig. 52** *Picos FIA das soluções de referências e amostras sintéticas de zinco e níquel, analisadas em duplicata.....* **141**
- Fig. 53** *FIAGrama das soluções de referência e amostras sintéticas (a) antes e (b) após a correção da linha de base. A linha vermelha liga os valores da linha de base calculadas após cada injeção.....* **143**
- Fig. 54** *Picos usados na calibração por PLS (a) antes e (b) após a correção da linha de base.....* **145**
- Fig. 55** *Perfis dos picos FIA para zinco e níquel baseado no primeiro loading weight do PLS1.....* **146**
- Fig. 56** *PRESS versus o número de componentes empregados.....* **147**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tab. 1</b>	<i>Resultados obtidos empregando a metodologia das injeções seqüências com uso de padrão único (<math>2,00\mu\text{g mL}^{-1}</math>) na determinação de zinco em amostras sintéticas. ....</i>	<b>101</b>
<b>Tab. 2</b>	<i>Resultados obtidos empregando a metodologia do padrão único (<math>2,00 \mu\text{g mL}^{-1}</math>) e injeção única no cálculo da concentrações de zinco em amostras sintéticas. ....</i>	<b>110</b>
<b>Tab. 3</b>	<i>Algoritmo PLS para calibração.....</i>	<b>126</b>
<b>Tab. 4</b>	<i>Algoritmo PLS para previsão.....</i>	<b>127</b>
<b>Tab. 5</b>	<i>Resultados obtidos para as concentrações de zinco calculadas por PLS.....</i>	<b>134</b>
<b>Tab. 6</b>	<i>Concentrações das soluções mistas, contendo zinco e níquel, de referência e das amostras sintéticas. ....</i>	<b>142</b>
<b>Tab. 7</b>	<i>Concentrações de zinco e níquel calculadas para amostras sintéticas em duplicata. ....</i>	<b>148</b>

## SIGLAS E ABREVIACOES

<b>TAN</b>	1-(2-tiazolilazo)-2-naftol
<b>EFS</b>	Espectrofotometria em fase sólida
<b>FIA</b>	Análise por injeção em fluxo
<b>FI-EFS</b>	Análise por injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria em fase sólida
<b>PAN</b>	1-(2-piridilazo)-2-naftol
<b>TPPS</b>	cido 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H,porfinotetrasulfonico
<b>pDAB</b>	p-(dimetilamina)-benzaldeído
<b>5-BrSHA</b>	cido 5-bromosalicílico
<b>CLS</b>	Método dos mínimos quadrados clássico
<b>ILS</b>	Método dos mínimos quadrados inverso
<b>PCA</b>	Análise de componentes principais
<b>PLS</b>	Método dos mínimos quadrados parciais
<b>PRESS</b>	Soma quadrática residual dos erros da previsão
<b>RMSEP</b>	Raiz da média dos erros quadráticos da previsão

# I - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços na análise de espécies químicas em baixas concentrações têm sido estimulados pelo desenvolvimento tecnológico. Além disto, as preocupações vinculadas à saúde e meio ambiente tornaram a determinação de espécies em baixas concentrações um dos principais campos de pesquisa em química analítica.

Atualmente, embora se disponha de uma série de técnicas analíticas que propiciem melhor seletividade, sensibilidade e limite de detecção, a realização de algumas operações preliminares à quantificação das espécies de interesse em diferentes matrizes, como a separação e pré-concentração, ainda se constitui numa etapa limitante do processo de análise. Estes processos permitem a minimização dos efeitos de interferência de matriz, podendo também aumentar a sensibilidade dos métodos empregados. Entretanto, a execução manual das etapas de separação e pré-concentração mostra-se morosa e sujeita a erros operacionais, como contaminações e/ou perdas. Muitas vezes estas operações não apresentam precisão adequada para as rotinas de análise, comprometendo os resultados. Neste contexto, a automatização, vinculada a sistemas de Análise por Injeção em Fluxo (FIA do inglês "Flow Injection Analysis"), tem despertado cada vez mais interesse. Estes sistemas são capazes de substituir com vantagens os processos manuais de pré-concentração, reduzindo o tempo de análise, quantidade de resíduos descartados e manipulação de amostras, além de minimizar os riscos de erros operacionais [1-10].

Nos últimos anos as técnicas de sorção (adsorção, troca iônica e extração líquido-sólido) em FIA têm sido mais exploradas para separação e pré-concentração [2,4]. Este destaque, entre as demais metodologias de pré-concentração, deve-se à facilidade de operação em relação às demais técnicas. Além disso, as técnicas de sorção em FIA são bastante versáteis, sob o aspecto da variedade de materiais sorbentes, agentes complexantes, e eluentes possíveis de serem empregados para as diferentes situações.

Os sistemas FIA que utilizam técnicas de sorção podem ser classificados em: (i) sistemas utilizados exclusivamente para separação, objetivando aumentar a seletividade; (ii) sistemas utilizados para efetuar a separação e pré-concentração, onde os interferentes são eliminados e os analitos pré-concentrados e (iii) os sistemas integrados, onde a concentração e detecção são realizados simultaneamente, *in situ*, no sensor ótico em fase sólida [2,11].

Dentre os sistemas FIA empregando técnicas de sorção, vale destacar, aquelas integradores (grupo iii), entre o qual está inserida a espectrofotometria em fase sólida. Esta técnica baseia-se na medida da atenuação da radiação incidente num material sólido contendo a espécie de interesse, sendo a concentração e detecção realizadas em uma única etapa.

## II A ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA

A Espectrofotometria em Fase Sólida (EFS) baseia-se na medida direta do grau de atenuação de um feixe luminoso que incide numa fase sólida na qual o analito de interesse está retido.

A primeira proposta de medida direta de mudança de coloração em um suporte sólido foi realizada por Yoshimura e colaboradores em 1976 [12] usando DOWEX como suporte sólido e difenilcarbazida, 1,10-fenantrolina, tiocianato de amônio e Zincon para determinação de cromo, ferro e cobre, respectivamente. A partir daí as aplicações da EFS vêm crescendo, principalmente devido à simplicidade de uso, automação e baixos limites de detecção que podem ser alcançados [2, 11, 13].

A característica principal desta técnica é a integração das etapas de separação, concentração e detecção, devido a transferência do analito em solução para um pequeno volume de fase sólida na qual a detecção é realizada. Um diferencial da EFS para as demais técnicas de pré-concentração por sorção é a não é necessidade de remoção do analito da fase sólida para um volume relativamente reduzido de fase líquida, provocando uma diluição do analito. Assim, na EFS pode-se também obter maior fator de enriquecimento, já que não é necessária a eluição para efetuar as medidas.

Em EFS há basicamente três procedimentos comumente empregados na preparação do analito para as medidas. A seleção do processo dependerá da natureza do analito, do suporte sólido e do reagente cromogênico [14]. As possibilidades estão descritas na seqüência:



- a) o complexo do metal com o reagente cromogênico formado em solução, ou o par iônico, é retido na fase sólida. Este procedimento pode ser aplicado quando a reação, forma um produto colorido, é suficientemente seletiva e o produto da mesma é facilmente retido por uma fase sólida;
- b) o reagente cromogênico é previamente retido no suporte sólido para então ocorrer a subsequente complexação do analito com o reagente imobilizado. Neste tipo de procedimento, o reagente cromogênico deve ser retido irreversivelmente no suporte sólido em condições que permitam que a reação com o analito ocorra na fase sólida e o complexo permaneça retido;
- c) o analito é previamente retido no suporte sólido para então ser tratado com o reagente cromogênico. Este procedimento pode ser aplicado quando o reagente possui baixa seletividade.

O procedimento (a) é o mais amplamente utilizado em EFS [15], sendo exemplos desse sistema: a determinação de cromo(VI) com difenilcarbazida [12], de cobalto com tiocianato [12] e alumínio com Morin [16]. O processo (b) tem sido cada vez mais empregado, principalmente devido à economia do reagente cromogênico, pois após a eluição do analito, o reagente permanece imobilizado, podendo ser reutilizado. Exemplos do uso do procedimento (b) são os sistemas: níquel – PAN [17], cobre – Zincon [12], fluoreto – Alizarina complexo de cério [18]. O procedimento (c) ainda tem sido aplicado moderadamente, tendo como exemplo a determinação de zinco [19] na forma de complexo aniônico, que pode ser retidos numa resina aniônica para posterior reação com Zincon, e detecção em fase sólida.

Nos procedimentos envolvendo EFS, o feixe luminoso incidente sofre absorção, reflexão e espalhamento da radiação. Dessa forma, o termo

atenuação é mais conveniente que o termo absorção para descrever o processo de interação da radiação luminosa com a espécie retida na fase sólida.

As medidas por EFS são realizadas posicionando-se o suporte sólido, contendo o analito, diretamente no caminho ótico do espectrofotômetro. Uma das formas mais simples de retenção do analito para determinação por EFS se dá com o uso de uma membrana filtrante, sendo esta posicionada adequadamente no espectrofotômetro. Um exemplo desse procedimento é a extração do complexo cobre (II) com o ácido 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H,porfinotetrasulfônico (TPPS) para uma membrana filtrante na qual são realizadas as medidas analíticas [20].

Em geral, as medidas analíticas por EFS tem sido mais freqüentemente realizadas empregando celas, comerciais ou especialmente construídas, para depósito da fase sólida [21,22]. Normalmente são utilizadas celas que propiciem 1 mm de espessura da fase sólida. O aumento da sensibilidade por EFS pode ser obtido aumentando o caminho ótico da radiação que penetra na fase sólida, que geralmente é diferente da espessura da camada de fase sólida fornecida pela cela. Todavia, as medidas utilizando caminhos óticos muito grandes podem ser difíceis devido às grandes perdas de radiação por espalhamento e absorção de fundo (background).

A principal causa de dificuldade nas medidas por perdas de radiação é o espalhamento, pois, em contradição com a Lei de Lambert, o aumento da espessura da camada de fase sólida gera um aumento moderado na absorção de fundo [14,22]. Isso sugere que, minimizando as perdas de radiação por espalhamento, o uso de celas com caminhos óticos maiores pode ser acarretar

num vantajoso aumento de sensibilidade. Uma das formas de minimizar as perdas de radiação por espalhamento é posicionar a cela o mais próximo possível da janela do detector, de forma a possibilitar uma melhor geometria para coleta do feixe luminoso transmitido através da fase sólida. Outra opção é o acoplamento de um tubo cilíndrico, com superfície interna espelhada, posicionado entre a cela e o detector, em paralelo com o feixe luminoso [22]. Com essas modificações celas que têm espessura de até 1 cm de fase sólida podem ser empregadas. Embora se consiga um aumento de sensibilidade com o aumento de espessura da camada do sólido, uma relação diretamente proporcional entre as duas quantidades não é necessariamente obtida [15].

Um grande número de suportes sólidos tem sido empregados em EFS, dentre estes vale destacar: resinas trocadoras catiônicas [12,23,24], aniônicas [25,26], resinas quelantes, resinas não iônicas [21,27,28], vidro poroso sinterizado [29], membranas filtrantes [20,30], espuma de poliuretano [31,32]. Algumas das características necessárias para o uso amplo e por longos períodos do suporte sólido são:

- Resistência mecânica adequada;
- Baixas variações de volume do sólido quando o analito é retido ou quando há variação do solvente;
- Cinética suficientemente favorável para permitir uma fácil retenção e eluição do analito;
- Transparência adequada à radiação luminosa na faixa de comprimento de onda utilizada.

Este último item, de certa forma, limita o emprego dos possíveis sorbentes em relação às demais técnicas de pré-concentração por sorção.

Assim, sorbentes opacos com carvão ativo não podem ser empregados em EFS, exceto quando são realizadas medidas da reflectância da fase sólida.

Dentre os suportes sólidos mais utilizados em EFS vale destacar a resina aniônica Sephadex QAE A-25 [33,34], a resina catiônica Dowex 50W-X4 [15] e sílica funcionalizada C<sub>18</sub> [21,27,35].

A sílica funcionalizada C<sub>18</sub> é a fase estacionária mais utilizada em cromatografia líquida de fase reversa e dentre os suportes sólidos mais utilizados em EFS. Este material se destaca pela alta razão de transferência de massa e resistência mecânica, além de não sofrer alterações de volume quando exposto à diferentes solventes, como ocorre freqüentemente com resinas de troca iônica. Outra vantagem do uso do C<sub>18</sub> é que esta não sofre interferências da salinidade do meio [36].

Para que a fase sólida possa ser reutilizada diversas vezes, a eluição para remoção do analito é necessária. Esse procedimento usualmente é realizado submetendo a fase sólida à ação de uma solução ácida, de um complexante ou um solvente, de maneira que a remoção do analito seja efetiva e não haja degradação da fase sólida. Dependendo do procedimento empregado na imobilização do analito para análise por EFS, a eluição pode ser realizada removendo o complexo ou apenas o analito, deixando o reagente imobilizado no suporte sólido.

Apesar de ser usual a eluição após a análise de cada amostra, pode-se realizar as leituras medindo-se a variação do sinal de absorbância após cada imobilização do analito. Todavia esse procedimento pode acarretar em problemas devido à saturação da fase, levando a uma perda na aditividade dos sinais após cada imobilização das amostras. Portanto, é comum a introdução

do eluente após cada imobilização da amostra, permitindo a extensão da faixa dinâmica de trabalho [33].

O desenvolvimento de métodos de análise utilizando a EFS acoplados a sistemas de análise por injeção em fluxo (FI-EFS) tem crescido bastante [11,21,33,34]. Em sistemas FI-EFS, uma cela de fluxo é preenchida com o suporte sólido e então posicionada no caminho ótico do espectrofotômetro, sendo realizadas simultaneamente a detecção e a concentração do analito. Diferente dos sistemas em batelada, onde a imobilização e reação do analito são realizadas pela mistura sob agitação de analito, reagente e fase sólida até serem alcançadas as condições de equilíbrio, nos sistemas FI-EFS a detecção pode ser feita fora das condições de equilíbrio. Dessa forma, além do aumento da frequência analítica, consumo de pequenos volumes das soluções do analito e dos reagentes propiciado por FIA, um aumento da seletividade pode ser obtido explorando-se as possíveis diferenças nas cinéticas de retenção e eluição das espécies químicas presentes nas amostras [11,37,39].

Diferentes metodologias foram apresentadas na literatura usando FI-EFS. Yoshimura [40] propôs o uso de um sistema FI-EFS para determinação de traços de Cr (III) e Cr (VI) em águas naturais através da formação do complexo de Cr (VI) com difenilcarbazida, sendo este complexo retido em resina catiônica (Muramac 50W-X2). O mesmo autor desenvolveu metodologia por FI-EFS para determinação de cobre imobilizado em resina catiônica monitorando a absorção do íon metálico em 800 nm, não sendo utilizado reagentes cromogênicos [62]. Valcárcel e cols [41] utilizaram FI-EFS para determinação de cobalto(II) em produtos farmacêuticos usando o piroxidal 4-feniltiosemicarbazona como reagente, sendo estudadas diferentes formas de

injeção e imobilização prévia de reagente ou do complexo entre o reagente e o analito. Um método empregando FI-EFS foi desenvolvido para determinação de zinco(II) pela reação com PAN, previamente imobilizado em resina catiônica (Dowex), contida na cela de fluxo [42].

Na EFS, usualmente as etapas de reação e retenção são realizadas em batelada. Inicialmente adiciona-se uma alíquota do analito seguida de uma alíquota do reagente cromogênico Na solução do complexo é adicionada uma determinada massa do sólido sorbente. A reação e retenção são realizadas sob agitação até que as condições de equilíbrio sejam atingidas, sendo o analito uniformemente distribuído nas partículas do material sólido. A partir daí a fase sólida contendo o analito imobilizado é filtrado e empacotado numa cela onde as medidas da atenuação da radiação são realizadas, posicionando esta cela no caminho ótico de espectrofotometria. A atenuação total que ocorre na fase sólida é dada por:

$$A_T = A_{afs} + A_{solv} + A_{reag} + A_{BG} \quad (1)$$

onde  $A_T$  é a atenuação da fase sólida,  $A_{afs}$  é a absorção de complexo formado com o analito retido na fase sólida,  $A_{solv}$  é a absorção da solução intersticial entre as partículas do material sólido,  $A_{reag}$  é a absorção do reagente cromogênico livre retido na fase sólida e  $A_{BG}$  é a atenuação de fundo devido ao espalhamento da radiação e pela absorção devido ao suporte sólido em si. A situação ideal seria um caso em que  $A_{afs}$  pudesse ser obtida diretamente pela medida da absorção no comprimento de onda característico do complexo formado entre o reagente e o analito, utilizando como branco uma fase sólida não contendo o analito preparada da mesma forma que a fase sólida com o analito imobilizado. Todavia, o cancelamento completo da atenuação de fundo

( $A_{BG}$ ) nem sempre é obtido, principalmente devido às pequenas diferenças no empacotamento da fase sólida.

Yoshimura e cols propuseram como correção da atenuação de fundo a medida da fase sólida contendo o analito e da fase sólida do branco em dois comprimentos de onda, um relativo ao máximo de absorção de complexo com o analito e outro onde o complexo com o analito não absorva [15]. Neste ponto os sistemas FI-EFS têm grande vantagem em relação aos sistemas em bateladas, pois, as medidas do complexo formado com o analito e da fase sólida sem o analito retido são realizadas numa cela de fluxo contendo o mesmo suporte sólido, tendo exatamente o mesmo tipo de empacotamento durante as medidas pois a fase sólida não é trocada para as diferentes medidas, sendo que a diferença entre o sinal do complexo de analito na fase sólida e do suporte sólido sem o analito corrige eficientemente a atenuação de fundo sem a necessidade da medida com dois diferentes comprimentos de onda.

A relação entre a absorção do complexo com o analito na fase sólida e a concentração do analito em solução foi estudada por Yoshimura e cols [15,22] quando a reação e a retenção foram realizadas em condições de equilíbrio.

A absorbância do complexo de analito na fase sólida é dada por:

$$A_{afs} = a_{afs} \cdot b_{fs} \cdot C_{afs} \quad (3)$$

onde  $a_{afs}$  é a absorvidade do complexo com o analito em  $\text{cm}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{mL}$ ,  $b_{fs}$  é o caminho ótico médio de feixe ao atravessar a fase sólida (cm), sendo este diferente da espessura da cela contendo a fase sólida,  $C_{afs}$  é a concentração do analito na fase sólida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), devendo-se destacar que a

concentração do analito na fase sólida é dada pela massa do analito retido por volume de fase sólida.

A relação entre a concentração do analito na fase sólida e do mesmo em solução aquosa será aqui deduzida com pequenas alterações nas unidades utilizadas por Yoshimura [14].

A razão de distribuição entre a concentração do analito na fase sólida e na fase aquosa após o equilíbrio é dada por:

$$D = \frac{C_{afs}}{C_{aaq}} \quad (4)$$

onde  $C_{afs}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) é a concentração do analito na fase sólida e  $C_{aaq}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) é a concentração do analito na fase aquosa. Rearranjando a eq (4) tem-se:

$$C_{aaq} = \frac{C_{afs}}{D} \quad (5)$$

A concentração na fase aquosa é dada por:

$$C_{aaq} = \frac{m_{aaq}}{V_{aq}} \quad (6) \quad \Rightarrow \quad C_{aaq} = \frac{m_{at} - m_{afs}}{V_{aq}} \quad (7)$$

onde  $m_{aaq}$ ( $\mu\text{g}$ ) é a massa do analito na fase aquosa,  $m_{at}$ ( $\mu\text{g}$ ) é a massa total do analito adicionado ao sistema,  $m_{afs}$ ( $\mu\text{g}$ ) é a massa do analito imobilizado na fase sólida e  $V_{aq}$ (mL) é o volume da solução aquosa do analito adicionada ao sistema. Daí tem-se que:

$$C_{aaq} = \frac{C_0 V_{aq} - C_{afs} V_{fs}}{V_{aq}} \quad (8)$$

sendo então:

$$C_{aaq} V_{aq} = C_0 V_{aq} - C_{afs} V_{fs} \quad (9)$$

onde  $C_0$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) é a concentração do analito em solução antes desta ser posta em contato com a fase sólida. Rearranjando as equações (5) e (9):



$$\frac{C_{afs}}{D} V_{aq} = C_0 V_{aq} - C_{afs} V_{fs} \quad (10)$$

e

$$C_{afs} V_{aq} = C_0 V_{aq} D - C_{afs} V_{fs} D \quad (11)$$

sendo

$$C_{afs} V_{aq} + C_{afs} V_{fs} D = C_0 V_{aq} D \quad (12)$$

e

$$C_{afs} (V_{aq} + V_{fs} D) = C_0 V_{aq} D \quad (13)$$

então

$$C_{afs} = \frac{C_0 V_{aq} D}{V_{aq} + V_{fs} D} \quad (14)$$

dividindo o numerador e o denominador da equação (14) por D:

$$C_{afs} = \frac{C_0 V_{aq}}{\frac{V_{aq}}{D} + V_{fs}} \quad (15)$$

Admitindo-se que a fase sólida não sofra alterações significativas no seu volume, após a imobilização do analito, pode-se expressar esse volume em função da densidade da fase sólida  $d_{fs}(\text{g mL}^{-1})$ , e da massa de fase sólida,  $m_{fs}(\text{g})$ :

$$C_{afs} = \frac{C_0 V_{aq}}{\frac{V_{aq}}{D} + \frac{m_{fs}}{d_{fs}}} \quad (16)$$

daí a relação entre a absorvância do analito na fase sólida e a concentração do analito em solução aquosa após ser atingido o equilíbrio entre as fases, é dada por:

$$A_{\text{afs}} = a_{\text{fs}} b_{\text{fs}} \frac{C_0 V_{\text{aq}}}{\frac{V_{\text{aq}}}{D} + \frac{m_{\text{fs}}}{d_{\text{fs}}}} \quad (17)$$

A partir da equação (17), verifica-se a dependência da absorção do complexo entre analito-reagente cromogênico retido na fase sólida com a densidade do suporte sólido e a razão de distribuição, propriedades estas relacionadas com o tipo de fase sólida e a sua interação com o analito. A absorção também é inversamente proporcional à massa de fase sólida utilizada, além de ter uma relação não linear com o volume da solução do analito empregada. Quando o volume de solução aquosa é muito pequeno em relação à razão de distribuição tem-se que:

$$\frac{V_{\text{aq}}}{D} \cong 0 \Rightarrow A_{\text{afs}} = a_{\text{fs}} b_{\text{fs}} \frac{d_{\text{fs}}}{m_{\text{fs}}} C_0 V_{\text{aq}} \quad (18)$$

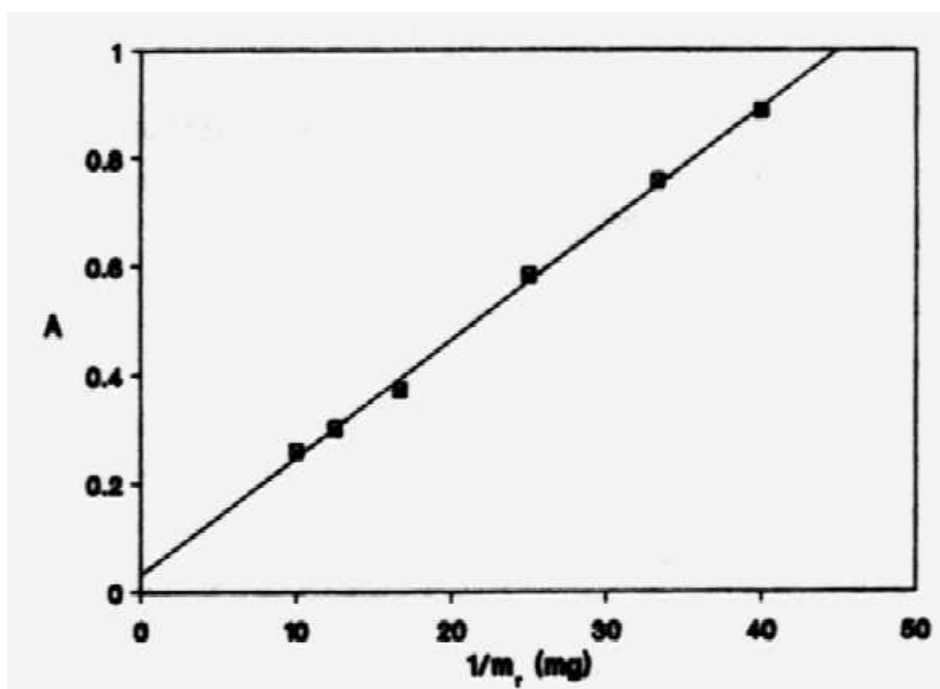
Daí a absorbância do analito retido na fase sólida tem relação linear com o volume da solução do analito utilizado e com sua concentração.

A relação empírica entre o sinal analítico e a massa de fase sólida e volume da solução do analito utilizada foi estudada [43-45] seguindo as relações previstas na equação (17). Outro fator que tem influência na absorção de analito na fase sólida em procedimentos em batelada, fora das condições de equilíbrio, é o intervalo de tempo de agitação da mistura contendo solução amostra, reagente e suporte sólido [43-45]. A curva ilustrada na Figura 1 mostra a relação linear entre a absorção do complexo de ferro (III) com ferroína, em presença de ácido ascórbico, imobilizado numa resina aniônica do tipo Dextran, com o inverso da massa da fase sólida [43].

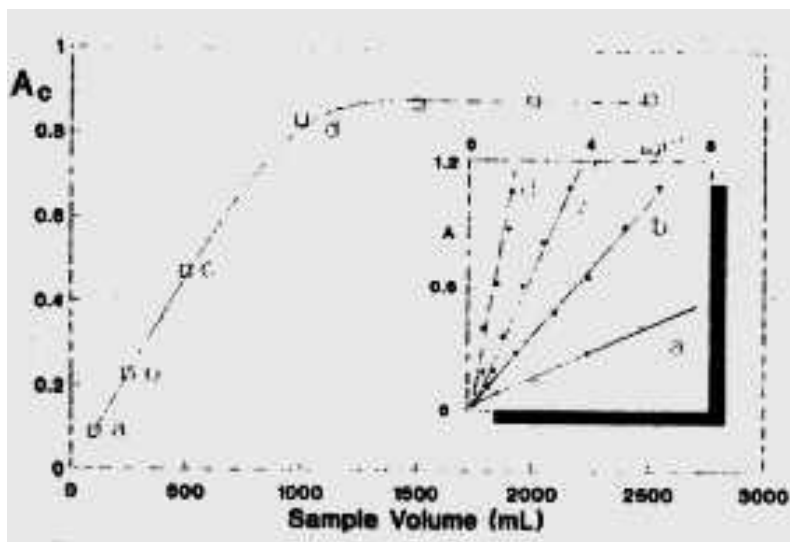
A relação entre a absorção do analito imobilizado na fase sólida e o volume de solução amostra utilizado é mostrado na curva da Figura 2, onde

analisou-se hidrazina utilizando o *p*-(dimetilamina)-benzaldeído (*p*DAB) como reagente [44], sendo o produto da reação imobilizado em resina catiônica Dowex 50WX8. Para volumes pequenos de analito foi verificada uma relação linear entre a absorbância e o volume de solução do analito.

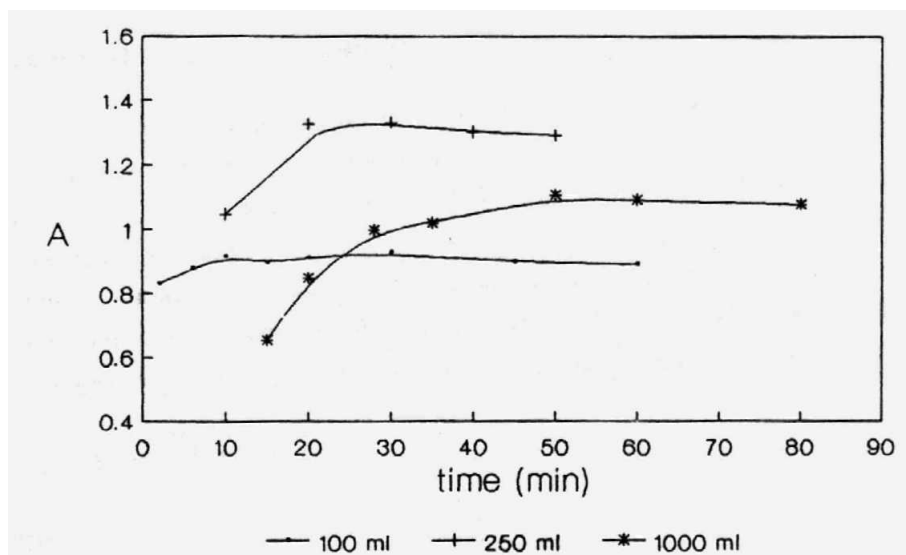
A dependência entre o intervalo de tempo de agitação e a absorbância do complexo formado entre o vanádio(V) e o ácido 5-bromosalicílico (5-BrSHA) imobilizado em resinas Sephadex QAE A-25 [45] é exibida na Figura 3. Foi verificado que a partir de um certo intervalo de tempo de agitação o sinal de absorbância torna-se constante, sendo que este intervalo de tempo depende do volume da solução do analito.



**Figura 1.** Relação entre a absorção do complexo Fe(III)-ferroína, em presença de ácido ascórbico, com o inverso da massa da fase sólida [43].



**Figura 2.** Relação entre a absorção do analito imobilizado e o volume de solução-amostra utilizado, na análise de hidrazina utilizando pDAB como reagente [44].



**Figura 3.** Relação entre o intervalo de tempo de agitação e a absorbância do complexo formado entre V(V) e 5-BrSHA imobilizado em Sephadex QAE A-25 [45].

A dependência do sinal analítico obtido por EFS com a massa de fase sólida, volume de solução amostra e tempo de agitação foi estudada objetivando apenas o controle e a otimização das condições de análise. Entretanto, essas informações não foram ainda convenientemente exploradas na tentativa de desenvolver novas estratégias de análise, principalmente sob o ponto de vista matemático. Ainda mais amplas são as possibilidades quando se associa a EFS com sistemas FIA, devido a existência de novas variáveis controláveis associadas à esses sistemas dinâmicos.

## **VIII. APLICAÇÃO DO MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS NAS DETERMINAÇÕES POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA ASSOCIADA À SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO**

A determinação de mais de analito por amostra utilizando a análise por injeção em fluxo foi avaliada desde os seus primeiros trabalhos [105], sendo que este tornou-se tema de revisão bibliográfica [106].

Em espectrofotometria em fase sólida a determinação multicomponente também é objeto de estudo, sendo que vários trabalhos foram realizado nessa vertente. Entre esses trabalhos, uma grande parte destes empregam reações químicas ou estratégias instrumentais para determinação multicomponentes por EFS [107-110].

Com o advento do desenvolvimento e divulgação de métodos quimiométricos, houve um crescimento significativo no número de trabalhos envolvendo análise multicomponentes em todos ramos da química analítica. A quimiometria é o ramo da química que utiliza e desenvolve técnicas matemáticas, estatísticas e outros métodos empregando a lógica formal para planejar ou seleccionar as condições ótimas para realização de experimentos e permitir a obtenção do máximo de informações a partir de dados químicos [111,112].

O uso intensivo de técnicas quimiométricas na análise multicomponentes deve-se principalmente ao fato que com estas não é necessário um tratamento químico intensivo para separação das espécies químicas a serem quantificadas ou o uso de métodos de análise seletivos, sendo necessário apenas o uso de técnicas instrumentais adequadas para a aquisição dos dados necessários para o tratamento quimiométrico.

Dentre as aplicações de técnicas quimiométricas à EFS destacam-se os métodos derivativos [113-115] e a calibração multivariada [116,117]. Outras técnicas quimiométricas empregadas em EFS, que não se relacionam diretamente com a análise multielementar, também foram empregadas com sucesso no planejamento e otimização de experimentos [118,119] e em testes de robustez, para validação de métodos analíticos e detecção de amostras anômalas (outliers) [120].

A calibração multivariada também foi aplicada em conjunto com os sistemas FIA na análise multicomponentes [101,121,122], principalmente nas análises em misturas complexas e emprego do método generalizado da adição padrão.

Na maior parte dos trabalhos empregando espectrofotometria em fase sólida, em sistemas em batelada ou em fluxo, e dos sistemas FIA usuais que empregaram técnicas de calibração multivariadas foram utilizados espectrofotômetros que possibilitaram a aquisição de espectros em intervalos de tempo reduzidos, sendo necessários para o processo de calibração e previsão das concentrações dos analitos.

Nos sistemas FIA, o uso de espectrofotômetros que permitam uma varredura rápida dos comprimentos de onda para registrar os espectros dos

sinais transientes, é mais indispensável para o uso de espectros para construção de modelos multivariados. A maior parte desses métodos utiliza o espectro na região do máximo dos picos FIA ou se emprega todos espectros, coletados a cada intervalo de tempo, e utiliza-se de técnicas de calibração *three-way* [123].

Em sistemas FIA, os sinais transientes que são registrados fornecem um número enorme de dados. Normalmente, apenas o sinal relativo ao máximo dos picos FIA é utilizado no processo de construção de curvas analíticas pelo método univariado, sendo descartado o restante dos dados.

Esses dados contêm informações relativas a cinéticas das possíveis reações, viscosidade das soluções, variações do índice de refração, coeficiente de difusão, entre outras [55]. As informações contidas nos picos FIA podem possibilitar a caracterização dos analitos por métodos multivariados de forma tão satisfatória quanto utilizando dados espectrais. Todavia, o uso dos perfis dos picos FIA, obtidos em um único comprimento de onda, ainda é pouco difundido, sendo poucas as tentativas realizadas nessa vertente [124-126].

Nos procedimentos de análise por FI-EFS empregando técnicas de calibração multivariada, ainda não foram realizados trabalhos suficientemente divulgados na qual emprega-se os sinais transientes, obtidos em um comprimento de onda fixo, para construção de modelos multivariados.

Esse capítulo são apresentados dois trabalhos: (1) aplicação do método dos mínimos quadrados parciais na determinação de zinco por espectrofotometria em fase sólida acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo e (2) aplicação do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) na determinação simultânea de zinco e níquel em misturas por espectrofotometria

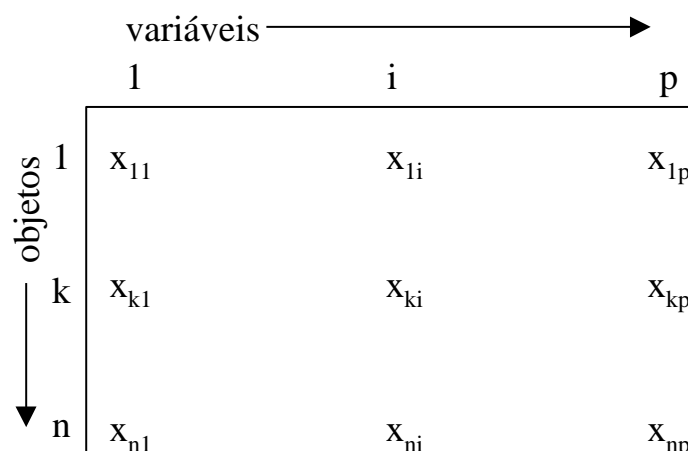


em fase sólida acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo. Porém, antes da apresentação dos métodos desenvolvidos aplicando o PLS aos dados gerados por FI-EFS, serão brevemente introduzidos os conceitos básicos da modelagem de dados pelo método dos mínimos quadrados parciais.

## VIII.1 – O Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os dados químicos multivariados podem ser arranjados na forma de uma tabela de dados, onde os *objetos* são dispostos em linhas e as *variáveis* em colunas. Os *objetos*, freqüentemente são os padrões ou as amostras, e as *variáveis*, os diferentes comprimentos de onda, intervalos de tempo de leitura e elementos presentes na amostra.

A tabela de dados pode ser representada na forma de uma matriz, como ilustrado na Figura 47, da matriz  $x_{ki}$ , indicando o valor do  $k$ -ésimo *objeto* e da  $i$ -ésima *variável*.



**Figura 47.** Uma matriz de dados químicos com  $n$  linhas e  $p$  colunas, da matriz  $x_{ki}$ , indicando o valor do  $k$ -ésimo objeto e da  $i$ -ésima variável.

A notação normalmente empregada em álgebra linear e utilizada pelos principais autores de textos sobre quimiometria [127] será aqui utilizada. Letras maiúsculas em negrito representarão matrizes, e letras minúsculas também em negrito vetores (linhas ou colunas das matrizes). As letras minúsculas em

itálico representarão escalares, que podem ser elementos das matrizes  $(a_{ij})$ , de vetores  $(a_j)$  ou constantes  $(a)$ . A transposta de uma matriz ou vetor será representada por um sobrescrito “T”, como por exemplos  $\mathbf{x}^T$ . A operação de transposição é dada pela troca das linhas pelas colunas.

É possível estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{C}$ , quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. A forma de se estabelecer essa relação é a base da *Calibração Multivariada* [127].

A calibração multivariada consiste basicamente em duas fases: a calibração e a previsão.

A fase de calibração, tomando como exemplo as determinações por FI-EFS a serem apresentadas neste trabalho,  $n$  soluções de referência e os sinais analíticos são medidos em  $p$  intervalos de tempo diferentes. É obtida uma matriz  $\mathbf{A}$ , com  $p$  colunas e  $n$  linhas, dos perfis dos sinais transientes correspondentes às soluções de referência, e uma matriz  $\mathbf{C}$  das concentrações com  $m$  colunas e  $n$  linhas, das concentrações das  $m$  diferentes espécies analisadas. Essas matrizes constituem o *Conjunto de Calibração*.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado que melhor possa reproduzir  $\mathbf{C}$  a partir dos dados da matriz  $\mathbf{A}$  obtida para amostras de concentrações desconhecida. Esse modelo é usado na *Fase de Previsão* para estimar as concentrações dos analitos em amostras, a partir dos seus sinais transientes obtidos por FI-EFS. Os dados utilizados nessa fase constituem o *Conjunto de Previsão*.

Muitas vezes, antes que o modelo seja desenvolvido, é conveniente tratar os dados de modo a tornar os cálculos computacionais melhor

condicionados. Normalmente, o primeiro passo envolve a *normalização* [128], que consiste em fazer com que cada variável tenha a mesma influência no estágio inicial dos cálculos. Esta operação é realizada pela subtração de todos os termos de uma certa variável pela sua média, dividindo esse resultado pelo desvio padrão dessa variável, de forma que todos os termos de uma certa variável tenham média igual a zero (centralizados na média) e variância unitária (escalados). A centralização na média remove os termos constantes presentes nos dados, fazendo com que estes só possuam termos que variam conforme variam-se os *objetos*, removendo dados espúrios. O escalonamento serve para que todas as variáveis estejam na mesma unidade, unidade de desvio padrão. Quando as variáveis estão na mesma escala o processo de escalagem pode degradar os resultados pela amplificação do ruído, a que se pode dar a mesma importância que o sinal útil. Durante toda discussão a seguir, assume-se que as variáveis estão centralizadas na média.

Os métodos de calibração multivariada tem sido utilizado cada vez mais em química analítica [129], principalmente quando componentes de uma mistura precisam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade. Dentre esses métodos, há um enorme destaque ao Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) [127, 130-132], que vem ganhando importância devido principalmente à simplicidade do algoritmo e excelente poder de previsão.

O PLS está relacionado com outros métodos de calibração multivariada como o método dos mínimos quadrados clássico (CLS, do inglês *Classical Least Squares*) [133], com o método dos mínimos quadrados inverso (ILS, do

inglês *Inverse Least Squares*) [133,134] e com a regressão dos componentes principais (PCR, do inglês *Principal Components Regression*) [130,132].

O CLS assume que a matriz das respostas instrumentais (absorbância em diferentes comprimentos de onda, absorbância em diferentes intervalos de tempo, etc) varia em função da variação da matriz das concentrações dos constituintes das amostras. Numa notação matricial isso pode ser escrito como:

$$\mathbf{A} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{E}_A \quad (30)$$

onde  $\mathbf{B}$  é uma matriz  $m \times p$  das constantes de proporcionalidade e  $\mathbf{E}_A$  é uma matriz  $n \times p$  dos erros na previsão de  $\mathbf{A}$ . A resolução desse problema de calibração envolve o cálculo de  $\mathbf{B}$  pela equação:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{A} \quad (31)$$

E as concentrações, dos elementos nas amostras, previstas é dada por:

$$\hat{\mathbf{C}} = (\mathbf{B} \mathbf{B}^T) \mathbf{B} \mathbf{A} \quad (32)$$

Este método tem como vantagem o uso de um número elevado de diferentes respostas instrumentais por amostra na etapa de calibração. O fato de utilizar um grande número de variáveis nos cálculos gera um “efeito de média” que torna o modelo menos suscetível aos ruídos instrumentais. De fato, para que esse efeito seja eficiente, o número de variáveis em  $\mathbf{A}$  deve ser muito maior que o número de soluções de referência empregadas na etapa de calibração.

Por outro lado, a maior desvantagem é o fato que a concentração de todos constituintes das amostras do conjunto de calibração devem ser conhecidas e incluídas na etapa de calibração, de outra forma os outros constituintes irão interferir nas respostas instrumentais, gerando resultados incorretos.

Um grande problema com o uso do CLS é que é muito incomum, e as vezes inteiramente impossível, conhecer a composição completa das amostras. Uma solução para esse problema é realizada tirando vantagem da álgebra e rearranjar a equação 30.

$$\mathbf{C} = \mathbf{A}\mathbf{P} + \mathbf{E}_c \quad (33)$$

Onde  $\mathbf{P}$  é uma matriz  $p \times m$  dos coeficientes da calibração dos  $m$  analitos e  $\mathbf{E}_c$  é uma matriz  $n \times m$  dos erros na estimativa de  $\mathbf{C}$ . A solução da equação 33 é dada por:

$$\mathbf{P} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{C} \quad (34)$$

A etapa de previsão é semelhante a equação 33, onde  $\mathbf{A}$  é substituída pela matriz das resposta instrumentais das amostras de concentrações desconhecidas.

Essa modificação matemática do CLS tem sérias implicações nos experimentos. Este método é conhecido como método dos mínimos quadrados inverso (ILS). A relação ilustrada na equação 33 implica que a matriz das concentrações ( $\mathbf{C}$ ) varia em função das variações na matriz das repostas instrumentais ( $\mathbf{A}$ ). Dessa forma, para o cálculo das concentrações das espécies de interesse nas amostras é necessário a construção de um modelo que emprega a matriz das respostas instrumentais e uma matriz das concentrações contendo a concentração das espécies de interesse apenas, sendo desnecessário a inclusão das concentrações dos demais componentes da amostras.

Dessa forma, o ILS pode ser utilizado na análise de algumas espécies químicas presentes em misturas complexas.

Uma das desvantagens do ILS é que, devido a dimensionalidade das equações matriciais, o número de respostas instrumentais não pode exceder o número de soluções de referência utilizadas na etapa de calibração ou haverá mais coeficiente de calibração desconhecidos que *objetos* no conjunto de calibração. Dessa maneira o ILS está sujeito a empregar um número de variáveis em **A** restrito ao número de soluções de referência, o que faz com que o “efeito de média” seja desprezível.

Seria possível aumentar o número de variáveis em **A** aumentando o número de soluções de referência do conjunto de calibração. Todavia, quanto mais respostas instrumentais são adicionadas, pode ocorrer que entre as variáveis haja uma relação aproximadamente linear. Esse efeito, conhecido como colinearidade, faz com que a solução da equação (5) seja numericamente instável (singularidade).

Outro problema do ILS é conhecido como *overfitting*, ocorre quando o número de resposta instrumentais é excessivo e o modelo começa a incluir ruído instrumental e outras variações extremamente peculiares ao conjunto de calibração, sendo que quando esse modelo é utilizado na previsão da concentrações dos analitos em amostras os erros nas estimativas são relativamente elevados.

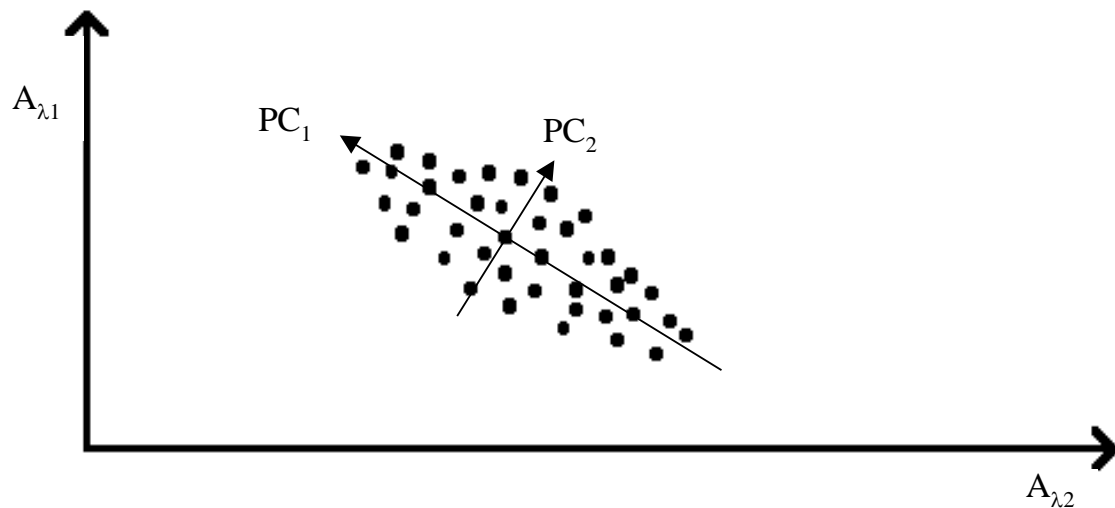
No ILS, as vantagens do CLS ao incluir um número elevado de variáveis nas respostas instrumentais são definitivamente perdidas. Então deve-se empregar um sistema adequado de seleção das variáveis na matriz **A** para evitar esse problema. Esta tarefa, para um grande número de possibilidade, pode ser impraticável devido ao número absurdamente grande de possíveis

combinações a serem testadas no modelo, para encontrar-se o subconjunto de variáveis ótimo.

Um método melhor seria aquele que permitisse o uso de um elevado número de diferentes respostas instrumentais, usando o efeito de média do CLS, e , ao mesmo tempo, propiciasse a construção de modelo conhecendo-se apenas as concentrações da espécies de interesse nas soluções de referência do conjunto de calibração, vantagem do ILS.

Felizmente, as variações nas concentrações são explicadas por um conjunto reduzido de fatores abstratos, e não relacionadas diretamente com as respostas instrumentais. Esse conjunto de fatores abstratos pode ser encontrado projetando a matriz **A** num espaço, com um número de dimensões inferior ao número de variáveis em **A**, que maximize a variância de **A**. Um método largamente empregado para esse propósito é a análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal Component Analysis) [135]. Esse método usa toda informação contida em **A** e reconstrói uma nova matriz (*scores*), com um número menor de variáveis que a matriz original, isenta de problemas de colinearidade, podendo ser usada para calibração por ILS. Essa técnica projetiva preserva as vantagens do CLS, uma vez que usa todas possíveis respostas instrumentais contidas em **A** para o cálculo da nova matriz, e do ILS pois o número de variáveis da nova matriz é menor que o número *objetos* do conjunto de calibração. A Figura 48 ilustra a projeção dos dados referentes a absorbância em dois comprimentos de onda diferentes nos componentes principais.





**Figura 48.** Ilustração da projeção dos dados nos componentes principais.

Pela Figura 48 observa-se que o primeiro componente (PC1) consegue explicar a maior parte da variação dos dados, enquanto que o segundo componente principal (PC2) é ortogonal ao primeiro e explica a variação dos dados não explicada pelo primeiro componente. Nesse exemplo, basta um componente principal para explicar todo conjunto de dados.

As duas técnicas de calibração multivariada que empregam princípios do PCA são a regressão dos componentes principais (PCR) e o método dos mínimos quadrados parciais (PLS).

O PCR começa os cálculos decompondo a matriz  $\mathbf{A}$  numa soma do produto de dois vetores que constituem os componentes principais:

$$\mathbf{A} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_a\mathbf{p}_a^T + \mathbf{E}_A \quad (35)$$

que pode ser escrita numa forma matricial como:

$$\mathbf{A} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_A \quad (36)$$

onde  $\mathbf{T}$  é uma matriz  $n \times a$  contendo os vetores dos *scores*,  $\mathbf{P}$  é uma matriz  $p \times a$  contendo os vetores dos *loadings* e  $a$  é o número de componentes principais, ou variáveis latentes, que explicam  $\mathbf{A}$ . O número de componentes principais

deve ser menor ou igual ao número de *objetos* utilizados na etapa de calibração.

O segundo passo do PCR é realizar a regressão empregando  $\mathbf{T}$  por ILS:

$$\mathbf{C} = \mathbf{T}\mathbf{B} + \mathbf{E}_c \quad (37)$$

onde a solução dessa equação é dada por:

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}^T\mathbf{A} \quad (38)$$

onde  $\mathbf{B}$  é uma matriz  $a \times m$  dos coeficientes da regressão por PCR. A resolução da equação 38 é possível pois a matriz de *scores* é ortogonal, não apresentando problemas de colinearidade.

A principal desvantagem do PCR é que o cálculo dos *scores* é realizado por PCA nenhum conhecimento sobre a capacidade desses *scores* em explicar as concentrações das espécies de interesse.

O PLS é uma técnica de calibração multivariada no qual as matrizes  $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{A}$  são decompostas por PCA, de tal forma que os *scores* e *loadings* são calculados buscando explicar ao máximo as concentrações dos analitos, mantendo a ortogonalidade dos *scores* e *loadings*. A decomposição de  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{C}$  consiste em:

$$\mathbf{A} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}_A \quad (39)$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_C \quad (40)$$

e a relação entre os *scores* (inner relation), que é calculada objetivando explicar ao máximo  $\mathbf{C}$ , é dada por

$$\mathbf{U} = \mathbf{T}\mathbf{B} \quad (41)$$

onde  $\mathbf{B}$  são os coeficientes da regressão entre as matrizes dos *scores* de  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{C}$ .

Maiores detalhes sobre os passos do algoritmo para calibração e previsão por PLS são dados na literatura [130-132]. As Tabelas 3 e 4 mostram os algoritmos PLS para calibração e previsão, respectivamente.

**TABELA 3.** Algoritmo PLS para calibração

---

Passo 1.	Centralize na média <b>A</b> e <b>C</b>
Passo 2.	Faça <b>u</b> igual a qualquer coluna de <b>C</b> pré-processada
Passo 3.	$\mathbf{w} = \mathbf{A}^T \mathbf{u} / \mathbf{u}^T \mathbf{u}$
Step 4.	$\mathbf{w} = \mathbf{w} / \ \mathbf{w}\ $
Passo 5.	Se o bloco <b>C</b> tiver apenas uma coluna faça $\mathbf{q}=1$ e vá para o passo 11, senão continue
Passo 6.	$\mathbf{t} = \mathbf{A} \mathbf{w}$
Passo 7.	$\mathbf{q} = \mathbf{C}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
Passo 8.	$\mathbf{q} = \mathbf{q} / \ \mathbf{q}\ $
Passo 9.	$\mathbf{u} = \mathbf{C} \mathbf{q}$
Passo 10.	Cheque a convergência de <b>t</b> comparando-o com <b>t</b> na iteração precedente, se convergir continue senão vá para o passo 3
Passo 11.	$\mathbf{p} = \mathbf{A}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
Passo 12.	$\mathbf{t} = \mathbf{t} \ \mathbf{p}\ $
Passo 13.	$\mathbf{w} = \mathbf{w} \ \mathbf{p}\ $
Passo 14.	$\mathbf{p} = \mathbf{p} / \ \mathbf{p}\ $
Passo 15.	$b = \mathbf{u}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
Passo 16.	Calcule os resíduos
	$\mathbf{E}_{A_h} = \mathbf{E}_{A_{h-1}} - \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h^T$ ; $\mathbf{E}_{A_0} = \mathbf{A}$
	$\mathbf{E}_{C_h} = \mathbf{E}_{C_{h-1}} - b_h \mathbf{t}_h \mathbf{q}_h^T$ ; $\mathbf{E}_{C_0} = \mathbf{C}$
Passo 17.	Retorne ao passo 2 e troque <b>A</b> e <b>C</b> por $\mathbf{E}_{A_h}$ e $\mathbf{E}_{C_h}$ para o próximo <i>h</i> componente principal. Isso é repetido até alcançar-se o número de componentes principais desejado.

---

**TABELA 4.** Algoritmo PLS para previsão

---

Passo 1. Centralize **A** com as médias obtidas na calibração

Passo 2.  $\mathbf{t}_h = \mathbf{E}_{A_{h-1}} \mathbf{w}_h$ ;  $\mathbf{E}_{A_0} = \mathbf{A}$

Passo 3.  $\mathbf{E}_{A_h} = \mathbf{E}_{A_{h-1}} - \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h^T$

Passo 4. Se  $h$  = número de variáveis latentes desejadas, continue, senão vá para o passo 2

Passo 5.  $\mathbf{C} = \sum_{h=1}^a b_h \mathbf{t}_h \mathbf{q}_h^T$  onde  $a$  é o número de componentes principais desejado

Passo 6. Some a cada coluna de **C** prevista à média da respectiva coluna da matriz **C** da calibração

---

## **VIII.2 – Aplicação do Método dos Mínimos Quadrados Parciais na Determinação de Zinco por Espectrofotometria em Fase Sólida Acoplada a Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo**

Em sistemas FIA associado com a detecção por espectrofotometria em fase sólida ainda não foram realizados trabalhos aplicando técnicas de calibração multivariada empregando o perfil dos sinais transientes para determinação de espécies químicas com as leituras realizadas em um único comprimento de onda.

O perfil dos sinais transientes nos sistemas FI-EFS contem informações sobre a velocidade de reação, coeficiente de difusão, distribuição do analito na fase sólida, concentração do analito, absorvidade entre outros. Os perfis dos sinais transientes em sistemas FI-EFS podem ser utilizados para construção de modelos multivariados de calibração assim como o máximo desses sinais é comumente empregado na construção de curvas analíticas em modelos univariados.

Dentre os métodos de calibração multivariada destaca-se o método dos mínimos quadrados parciais (PLS). O PLS é um método quimiométrico que pode ser aplicado tanto na determinação multicomponente quanto na determinação de apenas um componente, tendo uma série de vantagens em relação as técnicas univariadas de calibração.

Com a aplicação do PLS a determinação de uma ou mais espécies químicas é possível de ser realizada, com obtenção de resultados aceitáveis,

mesmo que nos sinais instrumentais haja a presença de até 99% de ruído aleatório [136]. O PLS também permite a detecção de amostras anômalas (outliers), indicando a possibilidade do modelo falhar na previsão dessas amostras [137,138], sendo que mesmo nesses casos os erros nos resultados são muito mais aceitáveis que aqueles gerados a partir da calibração univariada.

No presente trabalho foi desenvolvido um algoritmo para construção de modelos PLS para calibração e previsão [130,132], escrito em Quick Basic 4.5, que emprega os sinais transientes obtidos no sistema FI-EFS desenvolvido para determinação de zinco empregando um único comprimento de onda.

### ***VIII.2.1 - Experimental - Procedimento***

Soluções de referência de zinco com concentrações na faixa de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas a partir da diluição de solução estoque de zinco com concentração  $1000,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o pH destas foi ajustado para 6,2 com solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de hexamina.

Através de um sistema FI-EFS desenvolvido foram realizadas injeções de  $40 \mu\text{L}$  das soluções contendo zinco. A vazão foi mantida em  $1 \text{ mL min}^{-1}$  sendo que todas as injeções foram realizadas sincronizada com a bomba peristáltica.

A leitura dos sinais transientes foi realizada por um intervalo de tempo de 60 s, sendo os sinais adquiridos de 0,1 s em 0,1 s.

A eluição de zinco imobilizado foi realizada pela injeção de  $40 \mu\text{L}$  de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl.

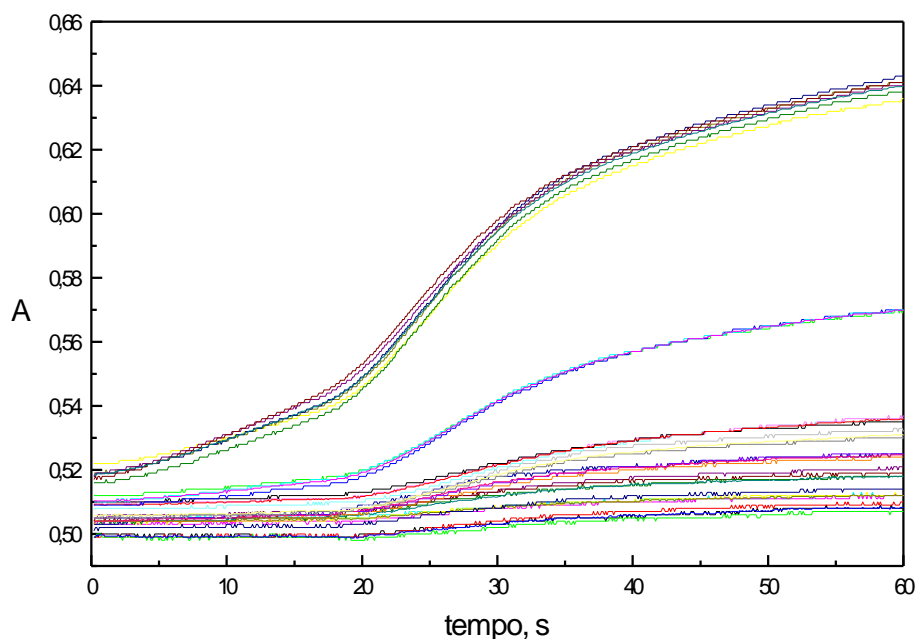
Todas as análises foram feitas em quadruplicata, sendo que as medidas realizadas em ordem aleatória, num total de 32 medidas.

### ***VIII.2.2 - Resultados e discussão***

As soluções de referência de zinco foram analisadas pelo sistema FI-EFS e os perfis dos sinais transientes foram adquiridos logo após cada injeção da solução do analito. A Figura 49 mostra os perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco com concentração de 0,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , realizadas em quadruplicata com leitura realizada em 585 nm.

O algoritmo PLS foi aplicado para a construção de modelo para previsão de zinco com leitura realizada em um único comprimento de onda empregando os perfis dos sinais transientes mostrados na Figura 49.





**Figura 49.** Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  da solução de zinco com concentrações de 0,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

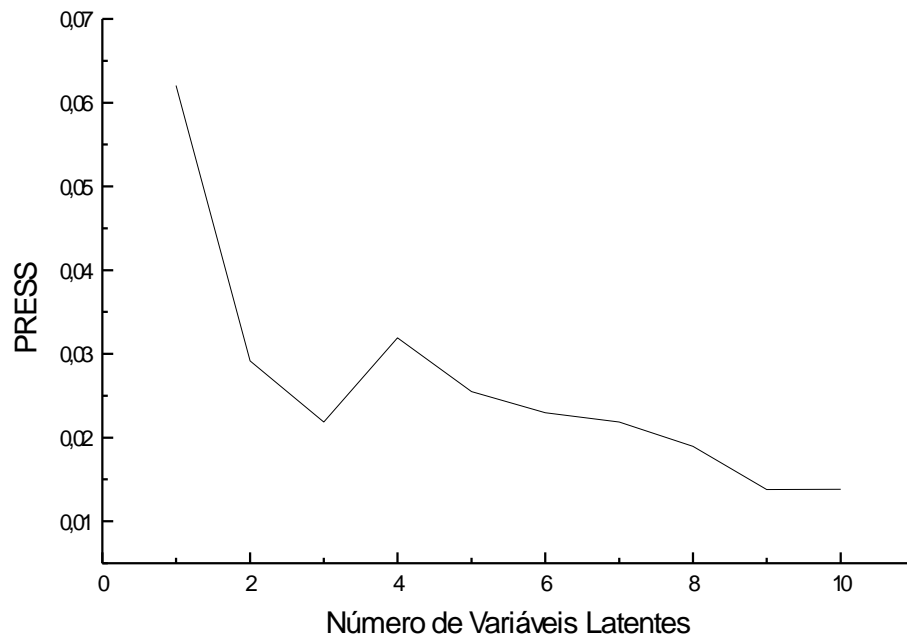
O número de componentes, ou variáveis latentes, foi encontrado empregando-se o método da validação cruzada completa (complete cross validation). Nesse método, remove-se um dos padrões do conjunto de calibração e constrói-se um modelo PLS usando esse novo conjunto de calibração, sendo a concentração do padrão removido prevista por esse novo modelo. Esse processo é repetido para todos os padrões do conjunto de calibração, e a soma quadrática residual dos erros da previsão (PRESS, do inglês Prediction Residual Sum of Squares) é calculado. O valor de PRESS é

calculado para diferentes números de componentes e o número de componentes que propicia o menor valor de PRESS é escolhido para ser usado nas previsões [130,131].

Todavia, deve-se evitar ao máximo o uso de um número de componentes maior que o necessário, pois a inclusão de outros componentes principais e relevantes inclui no modelo erros e variações que são exclusivos aos padrões usados na calibração, tornando o modelo pouco apropriado para previsão em amostras com concentrações desconhecidas. Para isso, o algoritmo desenvolvido procura o menor número de componentes cujo valor de PRESS não é significativamente maior que o menor valor de PRESS encontrado, sendo essa comparação realizada empregando o teste- $F$  [132].

A curva da Figura 50 mostra o valor de PRESS versus o número de variáveis latentes empregadas, no modelo PLS para determinação de zinco por FI-EFS.

O número de componentes necessário para os cálculos encontrados pelo software desenvolvido foi igual a 9. Todavia, esse resultado foi comparado com os obtidos por PLS empregando o programa *The Unscrambler 6.0* e, este programa, sugeriu o uso de apenas um componente. A partir desse resultado optou-se por utilizar apenas um componente nos cálculos, sendo este número mais coerente, uma vez que apenas um íon metálico estava presente em solução, sendo que este componente explica 99,64% da variação total dos dados.



**Figura 50.** PRESS versus número de variáveis latentes empregadas no PLS.

O intervalo de tempo que o algoritmo desenvolvido leva para realizar os cálculos na etapa de calibração para encontrar o número de componentes principais empregando o processo de validação cruzada completa em um microcomputador 486 é de cerca de 15 minutos, sendo que após essa etapa o programa leva 10 ms para prever a concentração de zinco por amostra. Dessa forma, o software desenvolvido pôde ser aplicado na previsão da concentração de zinco em tempo real. Deve-se levar em consideração que o algoritmo realiza os cálculos numa matriz **A** do tipo 36 x 600, com um total de 96000 dados, sendo justificável o intervalo de tempo necessário para o processo de calibração e validação do modelo.

A Tabela 5 mostra os resultados da validação de modelo pelo cálculo das concentrações dos padrões empregando o método de validação cruzada completa, evitando resultados tendenciosos.

**TABELA 5.** Resultados obtidos para as concentrações de zinco calculadas por PLS ( $n=4$ ).

<b>Zn, <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	
<b><i>Real</i></b>	<b><i>Previsto</i></b>
0,10	0,12 $\pm$ 0,02
0,20	0,21 $\pm$ 0,02
0,30	0,30 $\pm$ 0,01
0,40	0,38 $\pm$ 0,02
0,50	0,46 $\pm$ 0,01
1,00	0,93 $\pm$ 0,04
2,00	2,02 $\pm$ 0,05

Os resultados obtidos mostram que o método desenvolvido apresentou, de maneira geral, boa precisão e exatidão, sendo que as concentrações de zinco calculadas concordam com as concentrações reais com 95% de confiabilidade (*teste t- pareado*).

Como o programa para modelagem por PLS foi associado aos programas de controle de válvulas do sistema FI-EFS desenvolvido e aquisições dos sinais transientes, as determinações de zinco podem ser realizadas em tempo real.

O consumo máximo das soluções das amostras sintéticas de zinco foi inferior a 1  $\mu\text{g}$  de zinco (1,00 mL) por análise.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados como sendo 18  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 62  $\mu\text{g L}^{-1}$  de zinco, respectivamente.

O sistema proposto possibilitou a análise de até 30 amostras por hora, sendo possível realizar até 50 injeções sem a necessidade de repor o TAN pela imobilização do reagente cromogênico em C<sub>18</sub>.

O algoritmo desenvolvido para construção de modelos por PLS para calibração e previsão de concentrações de zinco empregando os perfis dos sinais transientes obteve resultados concordantes com os obtidos empregando programas comerciais como o The Unscrambler 6.0 (Camo) e o PLS Toolbox para Matlab (Eigenvector) versão 1.5.1 [139].

### ***VIII.2.3 - Conclusões***

O método proposto mostrou-se eficiente na determinação de zinco, empregando algoritmo para calibração multivariada por PLS desenvolvida, em amostras sintéticas empregando os sinais transientes obtidos pelo sistemas FI-EFS com leitura realizadas em um comprimento de fixo (585 nm).

A simplicidade, sensibilidade e robustez do método desenvolvido mostrou-se adequadas, demonstrando o potencial desta para determinações de zinco em amostras reais.

O acoplamento do algoritmo PLS com os programas de aquisição de dados e controle das válvulas solenóides do sistema FI-EFS possibilitou que a previsão das concentrações de zinco nas amostras fosse realizada em tempo

real, sem a necessidade de transferência de dados para tratamento após a análise para um outro programa.

O algoritmo PLS desenvolvido não foi construído para ser dedicada apenas aos sistemas FI-EFS do presente trabalho, podendo ser aplicado para calibração e previsão de qualquer conjunto de dados multivariados.

### **VIII.3 – Aplicação do Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) na Determinação Simultânea de Zinco e Níquel em Misturas por FI-EFS**

Os perfis dos sinais transientes obtidos pelo sistema FI-EFS com leitura em um único comprimento de onda podem ser utilizados para construção de modelos multivariados empregando o PLS para calibração e previsão da concentração de espécies químicas conforme os resultados do trabalho apresentado anteriormente nessa dissertação.

A partir do conhecimento que o uso de técnicas de calibração multivariada possibilitam o cálculo da concentração de uma única espécie ou de mais espécie, simultaneamente, mesmo na presença de interferências químicas ou sinais sobrepostos, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de metodologia analítica aplicada na determinação simultânea de zinco e níquel, com leituras realizadas em um único comprimento de onda utilizando os perfis dos sinais transientes, obtidos em

sistemas FI-EFS desenvolvido, para construção de modelos para calibração e previsão das concentrações dessas espécies químicas.

O zinco e o níquel reagem com o TAN imobilizado em C18, formando complexo vermelho em pH 6,0. Uma rotina para os cálculos por PLS escrita em Quickbasic 4.5 foi utilizada nas etapas de calibração e previsão das concentrações dos analitos. Este trabalho foi recentemente publicado em periódico de circulação internacional [140].

### ***VIII.3.1 - Reagentes e Soluções***

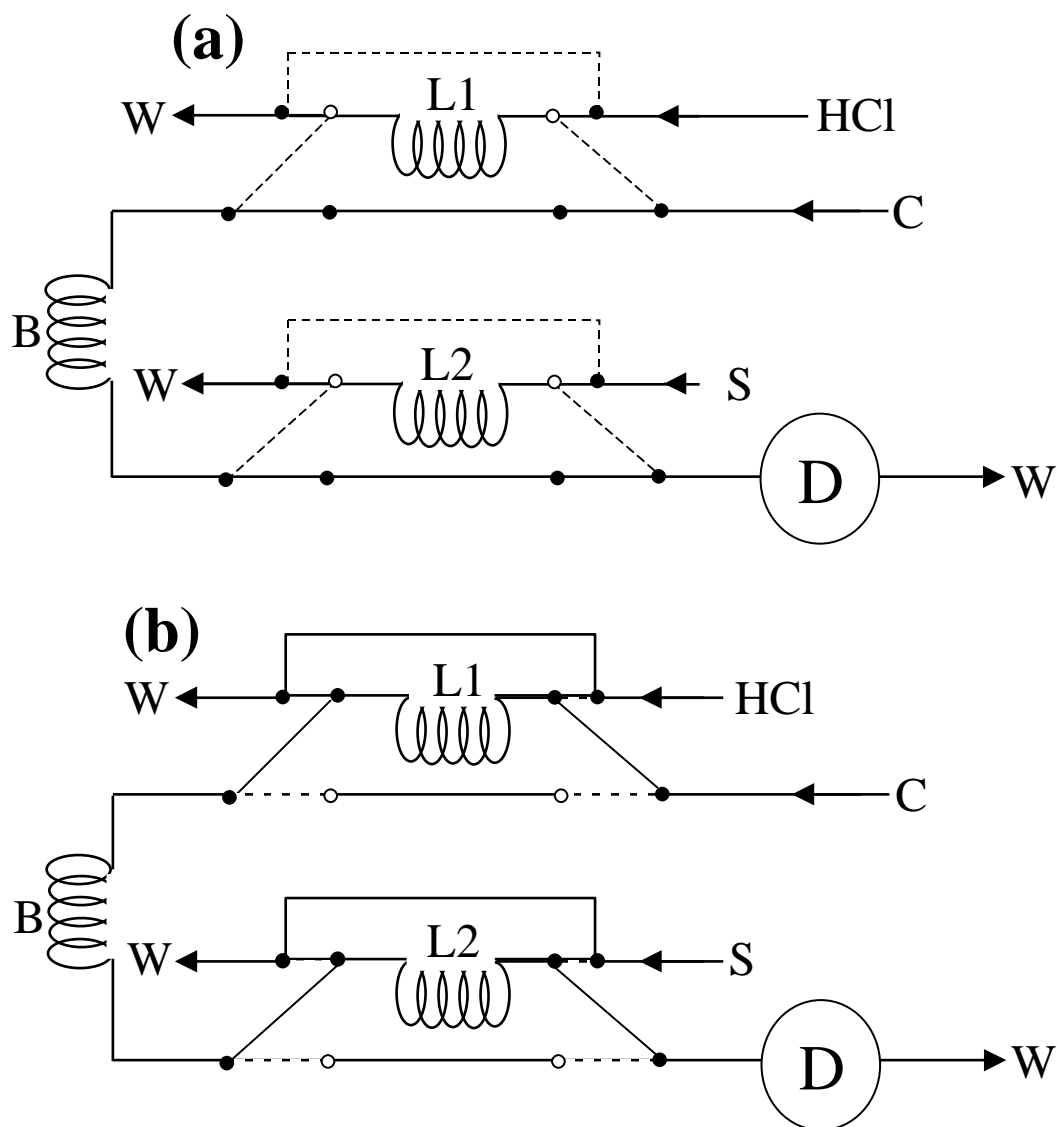
Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico. As soluções de referência das misturas de zinco e níquel com concentrações entre  $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$  –  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas pela diluição apropriada de soluções estoques de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Uma solução tampão  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina foi preparada, sendo seu pH ajustado para 6,0 com ácido clorídrico. Uma solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi utilizada como eluente.

### ***VIII.3.2 - Diagrama de Fluxo***

O sistema de fluxo utilizado emprega um injetor comutador [141], sendo as linhas de fluxo constituídas por tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno.

Um diagrama esquemático do sistema de fluxo está apresentado na Figura 51.



**Figura 51.** Diagrama de fluxo do sistema empregado na análise por espectrofotometria em fase sólida. Na posição (a) de amostragem e (b) de injeção; W-amostra; C-fluxo carregador (H<sub>2</sub>O); L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>-loops da amostra e do solvente (400 $\mu$ L e 625 $\mu$ L, respectivamente); B-bobina de delay-80cm; W-descarte; DET-Espectrofotômetro equipado com uma cela contendo a fase sólida.

Na posição (a), os loops L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> são preenchidos com soluções de HCl e da amostra, respectivamente, numa vazão de 0,9 mL min<sup>-1</sup>. Comutando o



injetor (Figura 51b), as alíquotas de solução de HCl e da amostra são simultaneamente inseridas no caminho analítico, e transportadas pelo carregador até o detetor. O zinco e o níquel, presentes nas amostras, reagem com o TAN, imobilizado em C<sub>18</sub> e o complexo é retido na fase sólida, sendo a absorbância medida continuamente a 595 nm. Quando a solução de HCl chega na cela de fluxo os íons são eluídos sem remover o reagente cromogênico em quantidade significativa. A bobina B propicia um intervalo de tempo entre a injeção dos analitos e do ácido, evitando a sobreposição das alíquotas das mesmas. O caminho analítico foi fixado em 50 cm.

As soluções de referência das misturas de zinco e níquel foram preparadas empregando um planejamento fatorial 4<sup>2</sup> em duplicata [142,143], sendo as medidas realizadas em ordem aleatória.

### ***VIII.3.3 - Resultados e Discussão***

O TAN imobilizado em C<sub>18</sub> reage instantaneamente com Co (II), Cu (II), Fe (II) e Zn (II) formando complexos vermelhos em pH 6,2 [53]. Nas mesmas condições, a retenção de níquel (II) em TAN-C<sub>18</sub> é extremamente dependente da vazão [144].

As constantes de estabilidade e a absorvidade dos complexos do TAN-C<sub>18</sub> com o zinco e níquel são semelhantes e independentes da velocidade do fluxo. A partir desse dado presume-se que a cinética de retenção do níquel é significativamente mais lenta que para o zinco.

Para que seja possível a análise de níquel pelo sistema FI-EFS, apresentado, a velocidade do fluxo deve ser suficientemente baixa de forma a

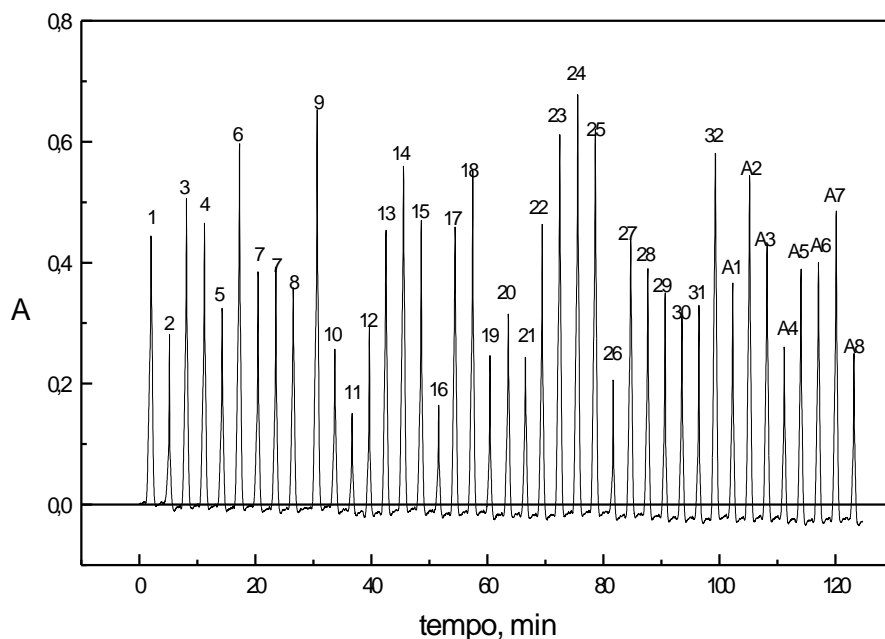
maximizar a retenção de níquel na fase sólida, sem comprometer a frequência analítica.

A concentração de ácido deve ser suficientemente elevada para promover uma eluição rápida dos íons metálicos, aumentando a velocidade analítica, sem que o reagente seja removido da fase sólida. O comprimento da bobina B deve ter o comprimento mínimo necessário para separar as alíquotas da amostra do ácido, permitindo que o tempo de residência da amostra na cela seja suficiente para que a reação ocorra apreciavelmente, antes de ser realizada a eluição.

A determinação de zinco e níquel em misturas foi realizada em outro trabalho empregando sistema FI-EFS, idêntico ao empregado no presente trabalho, explorando as diferentes velocidades de reação dos íons com o TAN-C18 mantendo fixo o comprimento de ondas de leitura em 595 nm. Todavia, para que fosse diferenciado o sinal proveniente do zinco e do níquel, já que esses íons absorvem na mesma faixa de comprimento de onda, foi necessário realizar as medidas em diferentes vazões, o que tornou seqüencial a determinação dos analitos [144].

No método proposto no presente trabalho a determinação de zinco e níquel é realizada simultaneamente, mantendo fixados a vazão, o comprimento de onda de leitura (595 nm), as concentrações dos reagentes e configuração do sistema de fluxo, sem a realização de separação ou mascaramento dos analitos. Para isso, foram empregados os perfis dos sinais transientes e aplicou-se o PLS para calibração e previsão das concentrações de zinco e níquel.

Os picos FIA obtidos para as soluções de referência e amostras sintéticas estão ilustradas na Figura 52 e a Tabela 6 mostra as concentrações de zinco e níquel referentes aos picos da Figura 52.



**Figura 52.** Picos FIA das soluções de referências e amostras sintéticas de zinco e níquel, analisadas em duplicata.

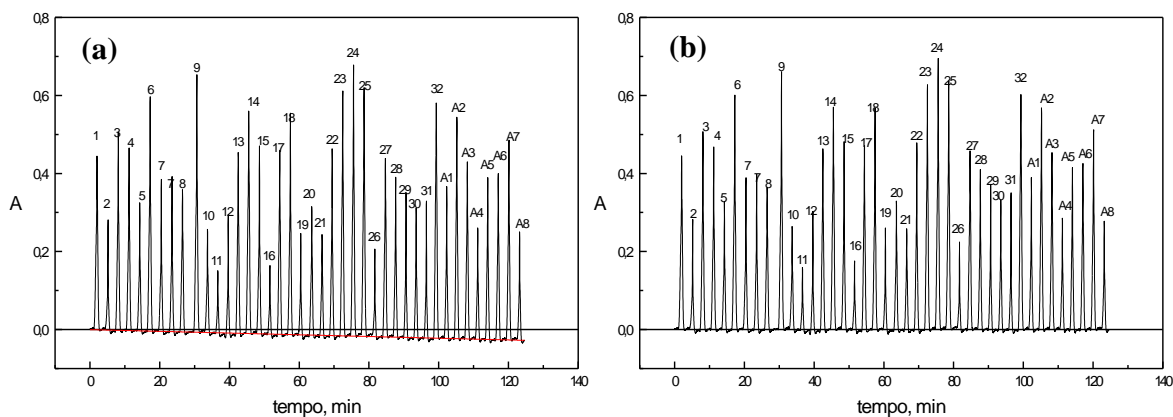
Uma pequena queda na linha de base, com o tempo, pode ser observada na Figura 52. Isso ocorre principalmente devido a remoção de pequenas quantidades do reagente cromogênico pelo ácido, conforme são realizadas várias eluições, podendo alterar os resultados.

Para que o efeito da queda da linha de base fosse corrigido o valor médio da linha de base (BL) foi calculado, após cada injeção, sendo esse valor assumido como a nova linha de base, sendo este valor subtraído dos sinais analíticos da injeção subsequente. A Figura 53 mostra os picos FIA e os

valores da linha de base calculados após cada injeção (a) e da linha de base (b).

**TABELA 6.** *Concentrações das soluções mistas, contendo zinco e níquel, de referência e das amostras sintéticas.*

Soluções de Referência	Concentração, $\mu\text{g mL}^{-1}$		Soluções de Referência	Concentração, $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Zn	Ni		Zn	Ni
(1) e (27)	0,30	1,00	(2) e (12)	0,75	0,30
(3) e (4)	0,75	0,75	(5) e (30)	0,55	0,55
(6) e (18)	1,00	0,75	(7) e (28)	0,75	0,55
(8) e (20)	0,30	0,75	(9) e (24)	1,00	1,00
(10) e (21)	0,30	0,55	(11) e (16)	0,30	0,30
(13) e (17)	0,55	0,75	(14) e (32)	0,55	1,00
(15) e (22)	1,00	0,55	(19) e (26)	0,55	0,30
(23) e (25)	0,75	1,00	(29) e (31)	1,00	0,30
Soluções Amostras			Soluções Amostras		
(A1) e (A5)	0,80	0,50	(A2) e (A7)	0,80	0,80
(A3) e (A6)	0,50	0,80	(A4) e (A8)	0,50	0,50



**Figura 53.** FIAGRAMA das soluções de referência e amostras sintéticas (a) antes e (b) após a correção da linha de base. A linha vermelha liga os valores da linha de base calculadas após cada injeção.

Nos cálculos por PLS, o número de pontos de cada pico FIA a ser empregado nos cálculos deve ser o mesmo. Como as leituras dos sinais transientes foram realizadas continuamente, o intervalo de tempo onde cada injeção foi iniciada não foi registrado, desenvolveu-se uma metodologia para definir os intervalos de tempo onde cada pico inicia e termina.

O primeiro passo dessa rotina foi o cálculo do sinal médio referente a linha de base (BL), após o processo de correção da linha de base, e o desvio padrão dessas medidas (S). Quando o sinal analítico é maior que  $BL+3S$  ou menor que  $BL-3S$  uma variável lógica (FLAG) passa a ser verdadeira, indicando o início do pico. A partir daí quando o sinal analítico estiver dentro do intervalo  $BL\pm 3S$  a variável FLAG torna-se falsa novamente, indicando o fim do pico FIA. Esse processo é repetido para os três primeiros picos usados como teste, sendo contados os números de pontos antes e após o máximo de cada

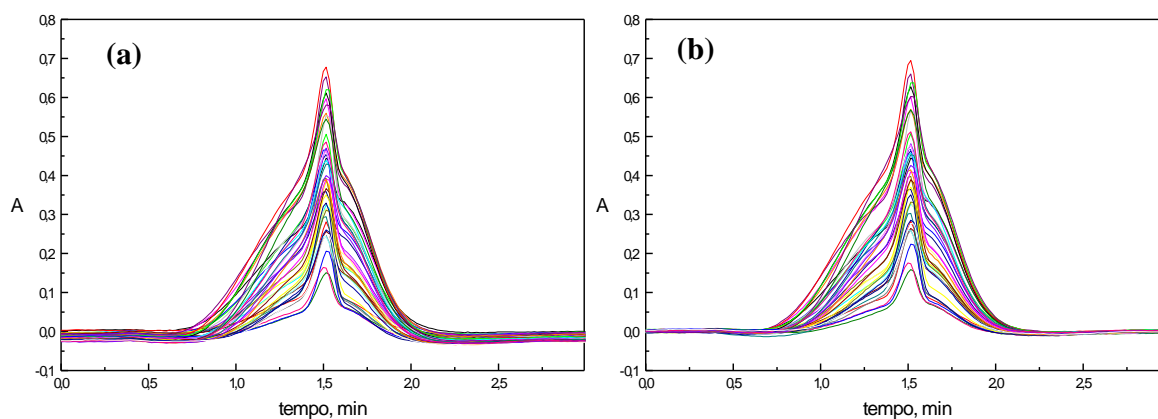
um desses três picos e o valor médio desse número de pontos é utilizado subseqüentemente para definir onde inicia e termina o pico FIA.

A região que define cada pico FIA foi encontrada, tornando os máximos dos picos como referência, sendo o início do pico 66 pontos (46,2 s) antes do máximo e o final a 53 pontos (37,1 s) após o máximo, tendo cada pico um total de 120 pontos. As leituras foram realizadas de 0,7 s em 0,7 s.

Objetivando melhorar a qualidade dos modelos por PLS [145] e a velocidade dos cálculos, realizou-se a tentativa de encontrar um número menor de pontos, para cada pico FIA, que minimize os erros estimados de modelo. Utilizando o Simplex [146] para encontrar o número de pontos antes e após o máximo dos picos mínimos para os cálculos por PLS. Após 25 testes empregando a metodologia Simplex, para determinação de modelos, o ganho na minimização dos erros na previsão foi de menos de 0,05% e o ganho no tempo dos cálculos por PLS foi de menos de 10 s, não justificando o emprego de um número menor de pontos por pico FIA, já que a otimização teria que ser novamente realizada para cada nova calibração por PLS.

A determinação de zinco e níquel usando os perfis dos picos FIA com leitura em 595 nm torna-se possível principalmente devido as diferenças nas cinéticas de retenção e eluição dos dois íons metálicos, uma vez que num pico FIA as informações sobre o zinco e o níquel estão totalmente sobrepostas.

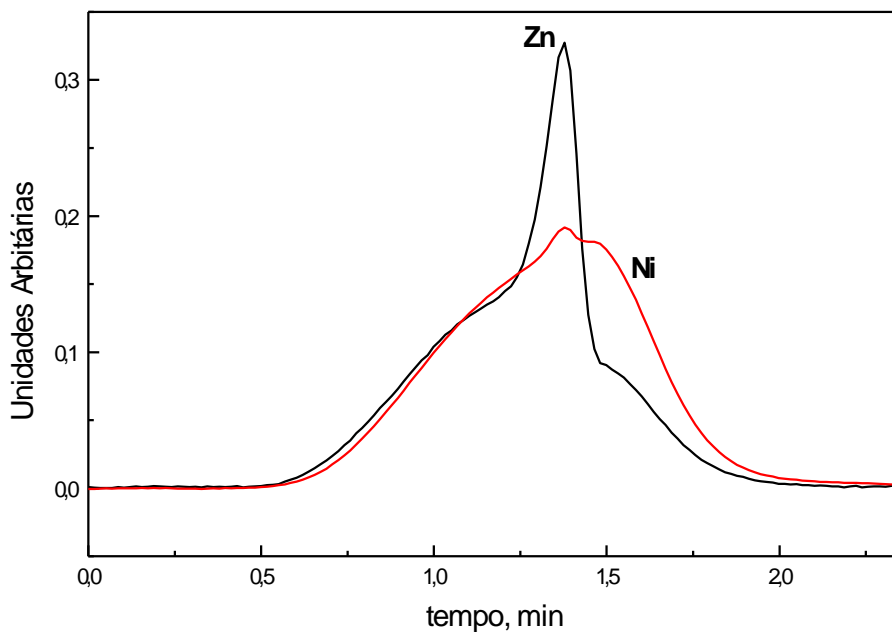
A Figura 54 mostra os perfis dos picos FIA antes (a) e após a correção da linha de base.



**Figura 54.** Picos usados na calibração por PLS (a) antes e (b) após a correção da linha de base.

A Figura 54 mostra que é impossível notar as diferenças entre os perfis dos sinais transientes relacionadas com as diferentes cinéticas de retenção e eluição do zinco e níquel.

As curvas da Figura 55 mostram os gráficos dos *loadings weights* calculados usando PLS1 (onde um modelo diferente é feito para um dos analitos) para o zinco e para o níquel. Esse gráfico fornece informações sobre o perfil do pico FIA estimados para quando cada analito está puro em solução [132]. Esse gráfico ilustra mais claramente as diferenças nas cinéticas de retenção e eluição entre zinco e níquel.



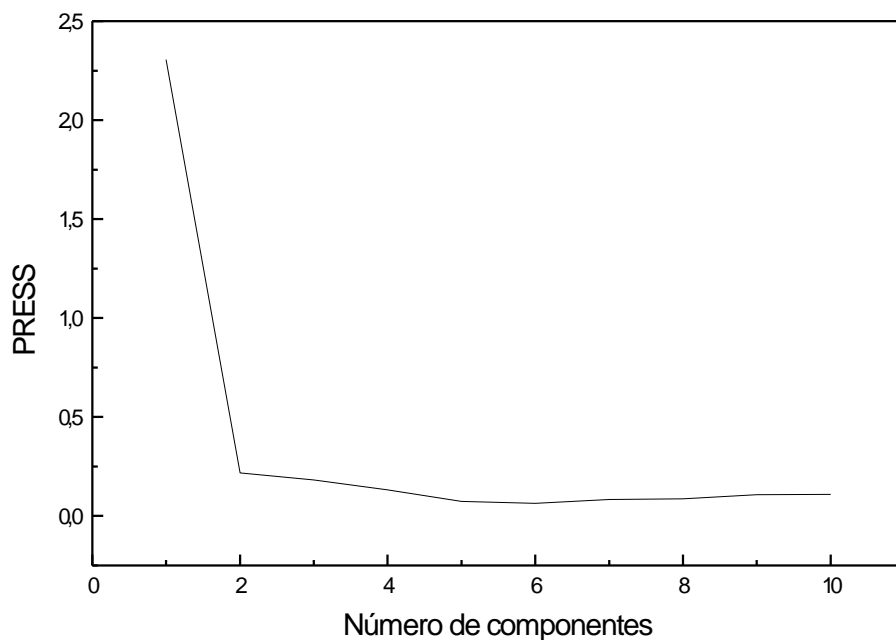
**Figura 55.** Perfis dos picos FIA para zinco e níquel baseado no primeiro loading weight do PLS1.

O algoritmo para PLS2 (onde os dois analitos são modelados em uma única etapa) obteve resultados mais satisfatórios que o PLS1, sendo o primeiro empregado nos cálculos. O número de componentes ótimo foi estimado pelo processo de validação cruzada completa (full cross-validation) e pelo valor da soma residual quadrática (PRESS) calculado para cada componente.

O número de componentes ótimo encontrado pelo algoritmo desenvolvido foi igual a 5, concordando com o número de componentes calculado empregando o programa The Unscrambler 6.0. Dois dos componentes principais estão relacionados com a presença de dois íons metálicos diferentes e outros fatores estão relacionados com a não linearidade



ou outras condições não específicas. A curva da Figura 55 ilustra o gráfico de PRESS versus o número de variáveis latentes.



**Figura 56.** PRESS versus o número de componentes empregados.

A raiz da média dos erros quadráticos da previsão (RMSEP, do inglês Root Mean Square Errors of Prediction) calculada a partir das amostras sintéticas, não utilizadas no processo de calibração, foi igual a 0,033 e 0,028 para o zinco e níquel respectivamente.

O método proposto permitiu uma drástica redução de consumo de amostras (<1µg de zinco por determinação) e de eluente (700 µL por determinação) minimizando a geração de descarte.

Pode-se realizar mais de 100 determinações de zinco e níquel mantendo a sensibilidade, precisão e exatidão dos resultados.

A precisão do método foi avaliada pelas replicatas realizadas nas amostras sintéticas e o desvio padrão relativo foi menor que 5% em todos os casos. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com os obtidos por ICP-AES e concordaram com 95% de confiabilidade (teste *t*-pareado). As concentrações de zinco e níquel previstas para amostras sintéticas são apresentadas na Tabela 7.

**TABELA 7.** Concentrações de zinco e níquel calculadas para amostras sintéticas em duplicata.

Zn, $\mu\text{g mL}^{-1}$		Ni, $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Real	Previsto	Real	Previsto
0.80	0.79	0.50	0.47
0.80	0.79	0.80	0.76
0.50	0.47	0.80	0.81
0.50	0.46	0.50	0.49

A faixa analítica de trabalho para determinação de zinco e níquel foi de 0,30-1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , podendo ser estendida a partir da otimização dos volumes das soluções amostras empregadas.

O sistema possibilitou a determinação de até 43 amostras por hora, com boa sensibilidade.

### **VIII.3.3 - Conclusões**

O método proposto possibilitou a determinação simultânea de zinco e níquel com comprimento de onda e vazão fixos com boa precisão e exatidão.

O algoritmo desenvolvido para os cálculos por PLS apresentou resultados idênticos aos apresentados por programas de calibração multivariada comerciais, possibilitando a determinação de zinco e níquel em tempo real.

O sistema desenvolvido mostrou-se simples, não necessitando do uso de válvulas solenóides para o gerenciamento das soluções, nem sistema de sincronização com a bomba peristáltica.

## IV. DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA

Neste capítulo serão descritos todos equipamentos utilizados e desenvolvidos nos trabalhos, bem como os procedimentos experimentais gerais empregados nessa dissertação.

### ***IV.1 - Experimental***

Todas soluções foram preparadas com reagentes com grau analítico de pureza, usando água destilada e desionizada.

As soluções de referência, as amostras sintéticas de Zn e as misturas de Ni e Zn foram preparadas pela diluição de soluções estoques de concentração  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  dos íons metálicos, sendo o pH das mesmas ajustado para 6,2 com solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de hexamina. As soluções estoques de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco e níquel foram preparadas pela dissolução de  $0,1000 \text{ g}$  das espécies na forma metálica (Merck), com 99,9% de pureza, com  $5 \text{ mL}$  de solução  $2 \text{ mol L}^{-1}$  em HCl, sendo estas soluções transferidas para seus respectivos balões volumétricos de  $100 \text{ mL}$  que foram completados com água.

As soluções  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina foram preparadas pela dissolução de  $17,5254 \text{ g}$  e  $1,7525 \text{ g}$ , respectivamente, do reagente em balões volumétricos de  $250 \text{ mL}$ , completado com água. O pH das soluções

tampão de hexamina foi ajustado para 6,2 com solução 0,5 mol L<sup>-1</sup> em ácido clorídrico. A solução de ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup> foi preparada pela diluição de 4,1 mL da solução concentrada (Merck, 37%) em balão volumétrico de 100 mL.

A solução do 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) foi preparada pela dissolução de 1,0 mg de TAN em 1mL de etanol, completando-se o volume com solução 5% (m/v) em Triton X-100.

O TAN foi retido em sílica funcionalizada C<sub>18</sub>, contida na cela de fluxo, pelo bombeamento da solução pela cela a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> por 10 min, sendo que após esse período o excesso de TAN não retido foi removido pela passagem da solução de HCl, inicialmente, e de água desionizada ao final, durando 5 min esta etapa. A sílica modificada C<sub>18</sub> (60-100 μm) foi obtida a partir de cartuchos Sep-Pak (Waters), sendo empregada como suporte sólido para as medidas por FI-EFS.

## ***IV.2 - Equipamentos e Acessórios***

Um espectrofotômetro Femto 432 (Brasil) contendo uma cela de fluxo contendo o suporte sólido com o TAN imobilizado.

Uma bomba peristáltica Gilson Minipuls (França) equipada com tubos de Tygon foi empregada como dispositivo propelente.

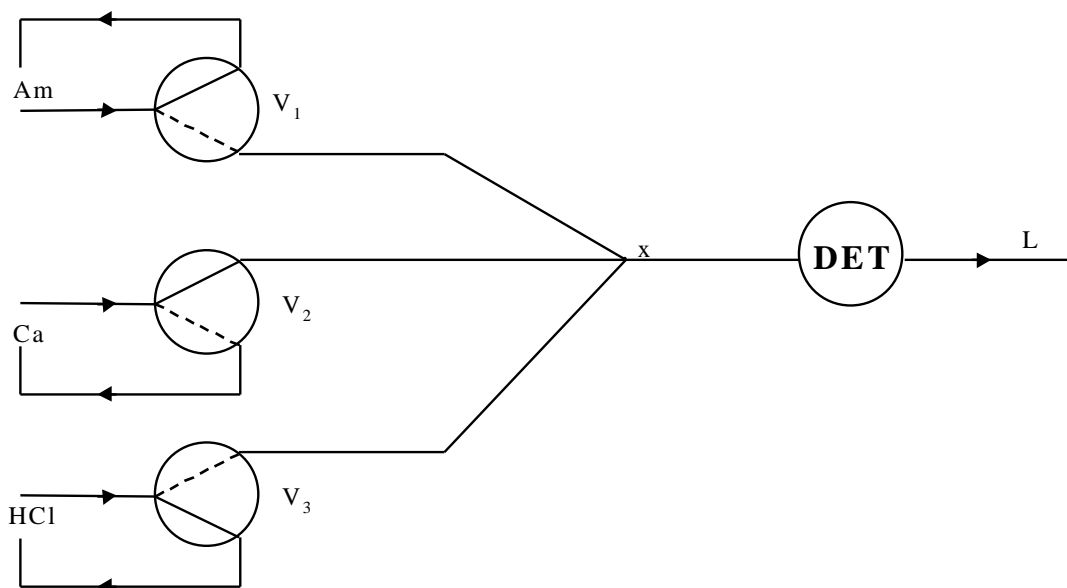
O módulo de análise é constituído por válvulas solenóides de 3 vias, tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm, conectores e junções de acrílico do tipo "T".

Um microcomputador 486 equipado com uma interface eletrônica PCL-711S (Advantech, EUA) foi empregado para aquisição dos dados gerados pelo espectrofotômetro, controle das válvulas solenóides e aquisição do sinal do sincronizador.

A interface PCL-711S possui duas portas digitais de entrada e duas de saída, conversores analógico/digital e digital/analógico com 12 bit de resolução e tempo de conversão de 25  $\mu$ s, 8 entradas analógicas selecionáveis por multiplexador com ganhos de 1, 2, 4, 8 e 16 vezes, sendo a faixa tensão de leitura de -5 V à +5 V. A seleção da entrada analógica e do ganho é realizada por software. Como os sinais de controle emitidos pelas portas de saída digital dessa interface obedecem ao padrão TTL (Transistor-Transistor Logic), isto é, o sinal é considerado 0 se a diferença de potencial da linha especificada for menor ou igual a 0,8 V e é considerado 1 se a ddp for maior que 2,4 V e menor que 5 V, foi necessário o uso de uma interface intermediária para o acionamento das válvulas solenóides, que são acionadas com uma fonte de ddp de 12 V, pois a ddp máxima gerada no padrão TTL da interface não é suficiente para acionar as mesmas.

### ***IV.3 - Descrição dos Diagramas de Fluxo***

A Figura 4 ilustra o diagrama de fluxo empregado em todos experimentos realizados nessa dissertação, excetuando-se os estudos por amostragem binária e a determinação simultânea de zinco e níquel.



**Figura 4.** Diagrama de fluxo do sistema FI-EFS desenvolvido, onde Am é a solução-amostra ou a solução de referência, Ca é a solução carregadora ( $H_2O$  ou tampão hexamina  $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ pH}=6,2$ ) e HCl é a solução do eluente a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , DET – espectrofotômetro equipado com cela de fluxo contendo fase sólida.

Na posição indicada no diagrama de fluxo (Figura 4), todas as válvulas  $v_1$ ,  $v_2$  e  $v_3$  estão desligadas, sendo que somente a solução carregadora é bombeada pelo percurso analítico, enquanto que as demais soluções são recicladas.

Acionando-se as válvulas  $v_1$  e  $v_2$ , simultaneamente, interrompe-se o fluxo do carregador, que passa a ser reciclado, sendo bombeada em seu lugar a solução contendo o analito, que começa a fluir pelo percurso analítico. Tendo passado um intervalo de tempo  $\Delta t_1$ , todas as válvulas são desligadas, voltando a fluir o carregador, sendo que uma alíquota da solução do analito com volume  $V(\mu\text{L}) = \phi(\text{mL min}^{-1}) \Delta t_1(\text{s}) \cdot 16,67$  proporcional ao intervalo tempo abertura da válvula da solução do analito ( $\Delta t_1$ ) e à vazão ( $\phi$ ), é injetada no percurso

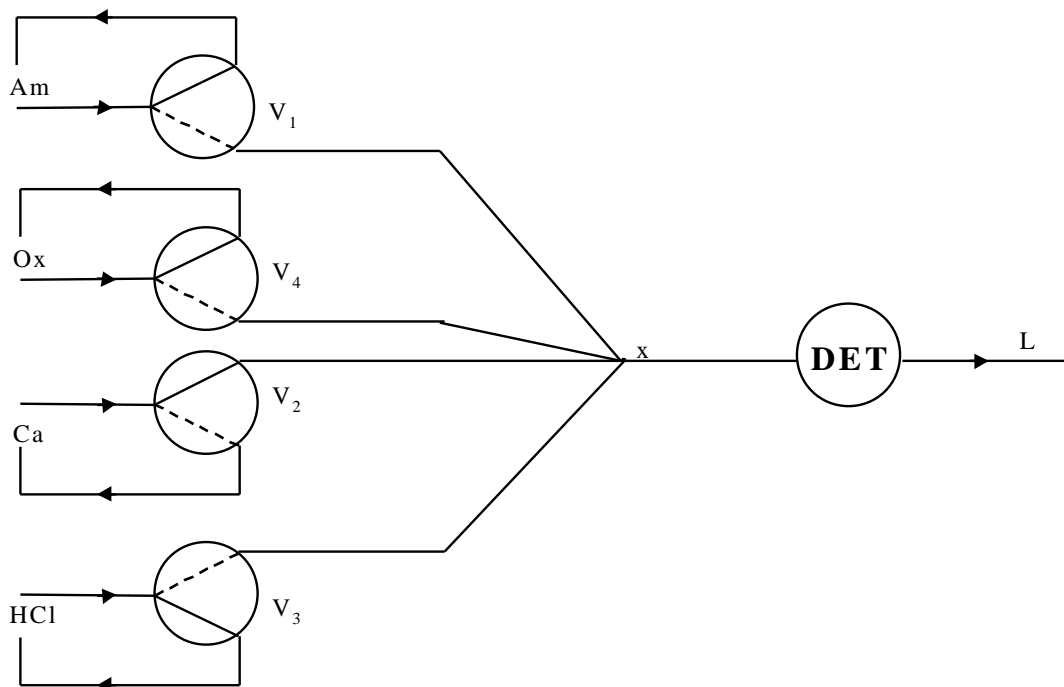
analítico. Após essa etapa, a leitura do sinal analítico é realizada, de 0,1 s em 0,1 s, por um intervalo de tempo definido.

A etapa de eluição é realizada acionando-se as válvulas  $v_2$  e  $v_3$ , simultaneamente, interrompendo o fluxo do carregador e injetando uma alíquota da solução do eluente, e após um certo intervalo de tempo, todas as válvulas são desligadas, reestabelecendo o fluxo do carregador.

Apesar do comprimento do percurso analítico entre a válvula que controla a injeção do analito ( $v_1$ ) e a confluência ( $x$ ) ser mínimo (2 cm), é necessário que esse seja preenchido com outra solução-amostra quando estas são trocadas. Esse procedimento foi realizado injetando-se um pouco da nova solução-amostra por um intervalo de tempo suficiente para preencher com essa solução o percurso entre  $x$  e  $v_1$ , lavando adequadamente esse trecho com nova solução-amostra, sendo que após essa lavagem é injetada uma alíquota da solução do eluente podendo então ser reiniciado o ciclo injeção do analito-leitura-eluição.

A Figura 5 ilustra o diagrama de fluxo utilizado para a análise da reação entre oxalato e zinco com detecção por FI-EFS.





**Figura 5.** Diagrama de fluxo do sistema FI-EFS desenvolvido para análise da reação entre zinco e oxalato empregando multicomutação, onde Am é a solução-amostra, Ca é a solução carregadora (tampão hexamina 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH=6,2) e HCl é a solução do eluente a 0,5 mol L<sup>-1</sup>, DET – espectrofotômetro equipado com cela de fluxo contendo fase sólida e Ox – é a solução de oxalato de potássio..

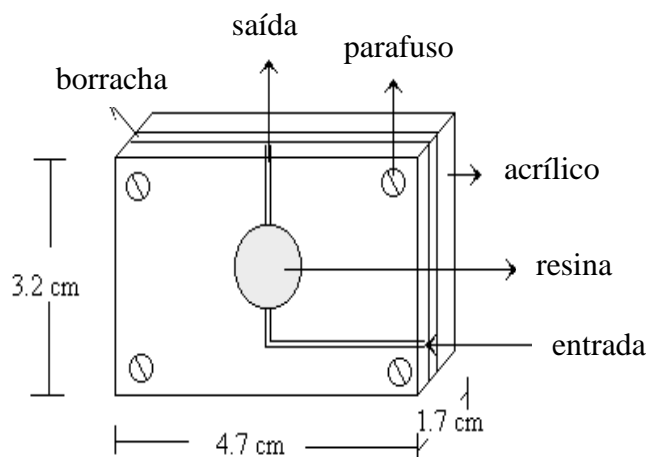
Inicialmente todas soluções são recicladas, sendo que apenas o carregador (hexamina 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH=6,2) flui pelo percurso analítico. As injeções por amostragem binária são realizadas acionando-se v<sub>1</sub> e v<sub>2</sub> por 1,5 s e em seguida v<sub>4</sub> e v<sub>2</sub> por um intervalo de tempo  $\Delta t$ . sendo esse processo repetido por mais duas vezes. Com isso três alíquotas de 40  $\mu$ L de solução de zinco e três alíquotas de solução de oxalato de volume  $V(\mu\text{L}) = \Delta t(\text{s}) \cdot 26,67$  são inseridas alternadamente no percurso analítico. Após essa etapa, todas válvulas são desligadas, restabelecendo o fluxo do carregador, e a leitura dos sinais é iniciada. Após a leitura é então realizada a eluição.

Todas injeções empregando válvulas solenóides foram realizadas de forma sincronizada com a bomba peristáltica, sendo que a descrição do sincronizador será apresentada no tópico IV.6.

#### ***IV.4 - As Celas de Fluxo para o Sistema FI-EFS***

A geometria da cela de fluxo para sistema FI-EFS propicia a distribuição não homogênea do analito na fase sólida. Isso ocorre principalmente devido ao fato que uma maior quantidade do analito é retida na região da fase sólida mais próxima a entrada do fluxo, além da ocorrência de caminhos preferenciais dos fluidos. Desta forma, a precisão das medidas pode ser comprometida caso a cela de fluxo seja posicionada no foco do feixe luminoso, devido à incidência de radiação numa região limitada da fase sólida. Este problema pode ser resolvido posicionando-se a cela de fluxo próximo à entrada do sistema detecção do espectrofotômetro [46]. Além disso, posicionando a cela de fluxo próximo à entrada do detetor minimiza-se a perda da radiação por espalhamento.

No presente trabalho, foram desenvolvidas duas celas de fluxo (Figuras 6 e 7) para as análises por FI-EFS. A cela exibida na Figura 6 foi utilizada nos estudos sobre dispersão em sistema FI-EFS e nos experimentos preliminares do desenvolvimento de curvas de calibração empregando uma única solução de referência.



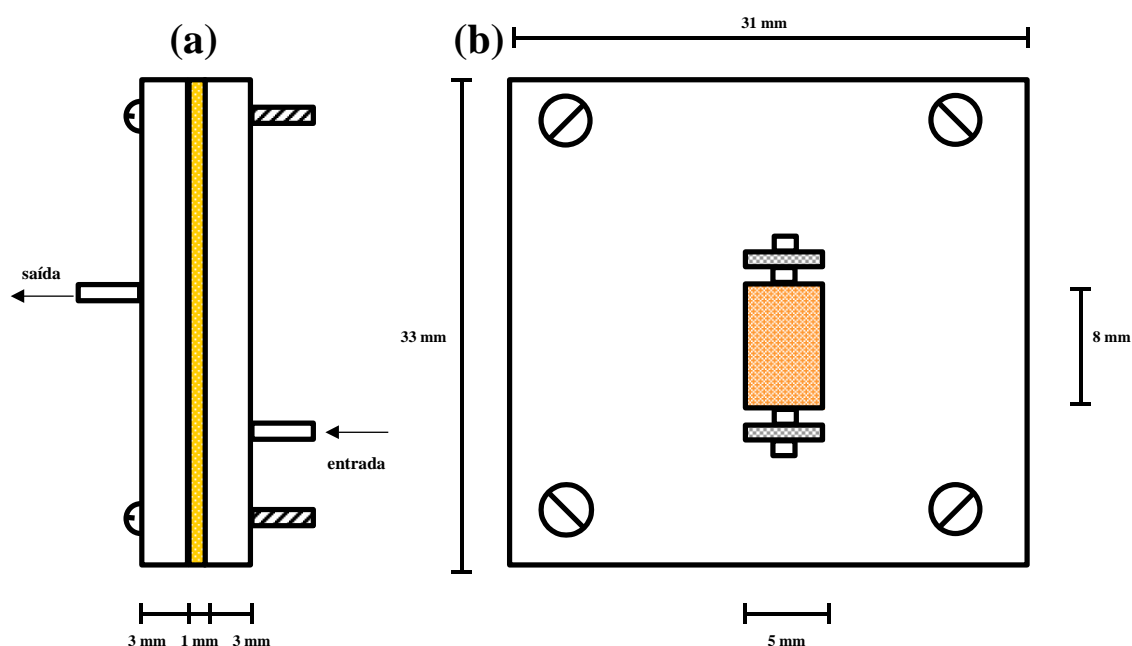
**Figura 6.** Representação esquemática da cela de fluxo para FI-EFS (vide texto).

A cela exibida na Figura 6 consiste em duas placas de acrílico, separadas por uma tira de borracha de 1 mm de espessura, parafusadas para evitar vazamentos. Na entrada e na saída da cela de fluxo foram colocadas espumas filtrantes, presentes nos cartuchos Sep-Pak (Waters), para evitar que a fase sólida seja removida pelos fluidos que atravessam a cela. Um orifício circular de 10 mm de diâmetro foi feito na tira de borracha, sendo preenchido com 35 mg de  $C_{18}$ . A área contendo fase sólida nessa cela foi de  $78 \text{ mm}^2$ .

Como a cela exibida na Figura 6 apresentou uma área contendo fase sólida muito maior que a área máxima do feixe obtido pelo espectrofotômetro Femto ( $24 \text{ mm}^2$ ) quando posicionou-se a cela próximo ao detetor, a precisão das medidas não foi satisfatória para realização de estudos quantitativos, sendo construída uma nova cela com área contendo fase sólida compatível com a área do feixe luminoso do espectrofotômetro utilizado.

A cela para FI-EFS especialmente adaptada ao espectrofotômetro Femto 432 foi construída, sendo realizado um orifício retangular ( $8 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$

e área de 40 mm<sup>2</sup>) na tira de borracha para conter a 23 mg de C<sub>18</sub>. Como o feixe proveniente do espectrofotômetro é um retângulo de 6 mm x 4 mm, sendo que praticamente toda área contendo fase sólida pode ser iluminada pelo feixe desse espectrofotômetro. A Figura 7 ilustra o diagrama esquemático da cela de fluxo para sistema FI-EFS construída para uso em espectrofotômetro Femto 432.



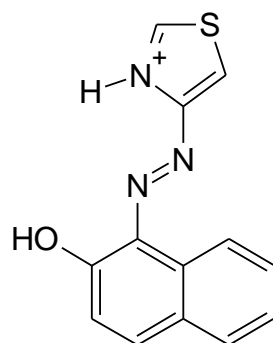
**Figura 7.** Diagrama esquemático da cela de fluxo para FI-EFS construída especialmente para o espectrofotômetro Femto 432, (a) vista lateral e (b) vista frontal.

Apesar da área contendo fase sólida da cela, ilustrada na Figura 7, ser compatível com o feixe do espectrofotômetro utilizado, uma perda considerável da radiação ocorreu por espalhamento e absorção de fundo. Isso impossibilitou o ajuste da linha de base em zero de absorbância. A solução encontrada foi fixar o valor de absorbância da linha de base em 0,500 em todas análises envolvendo essa cela.

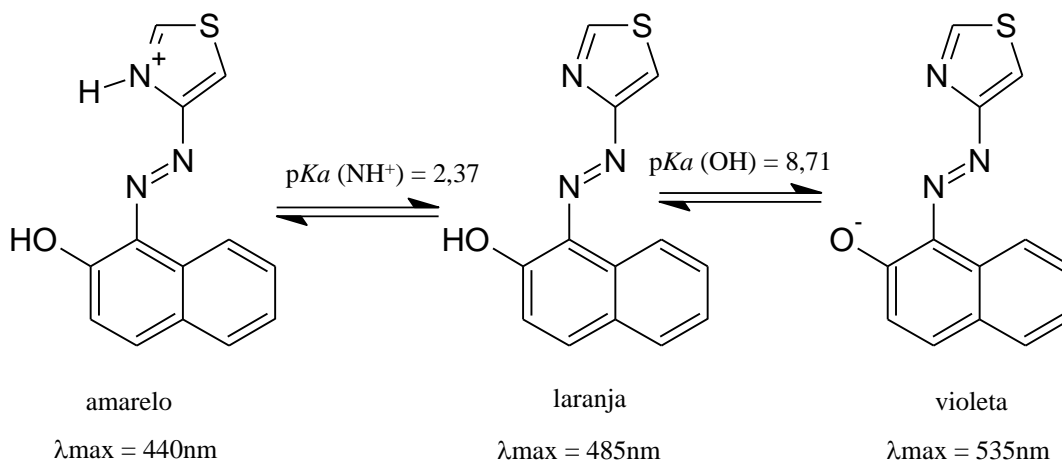
A cela ilustrada na Figura 7 foi empregada nas etapas quantitativas da análise de zinco empregando padrão único e na aplicação de regressão multivariada na determinação de zinco.

#### IV.5 - O 1-(2-Tiazolilazo)-2-naftol (TAN) imobilizado em C<sub>18</sub>

O 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) é um reagente que apresenta-se na forma de um pó laranja pouco solúvel em água e facilmente solubilizado em solventes orgânicos [47], cuja estrutura está apresentada abaixo:



As soluções de TAN são amareladas em meio ácido, alaranjadas em meio ligeiramente ácido ou neutro e violeta em meio alcalino, sendo a dissociação do reagente ilustrada abaixo [48]:



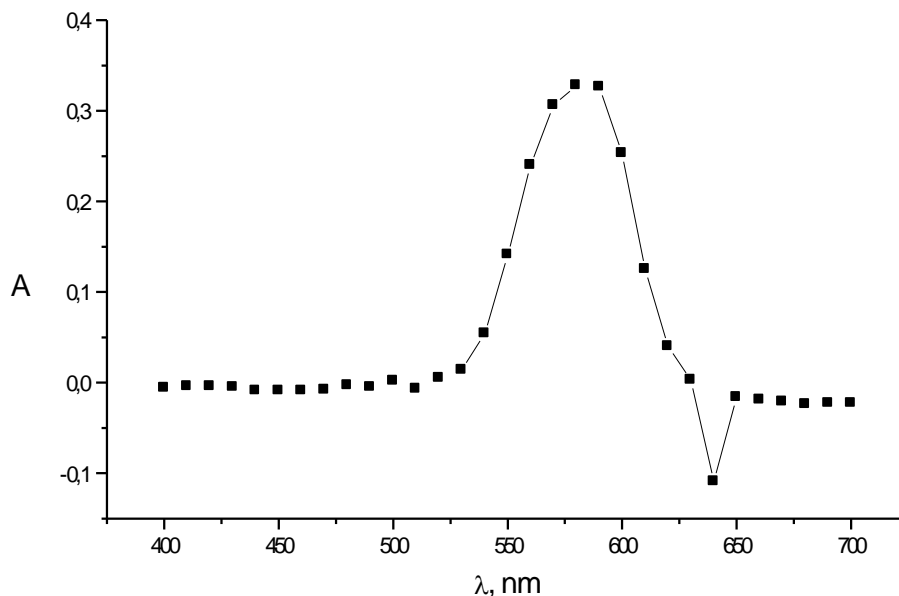
Apesar do TAN ser pouco solúvel em água, soluções aquosas do reagente podem ser obtidas empregando surfactantes como Triton X-100 [49].

O TAN é um reagente cromogênico de baixa seletividade, podendo ser empregado na determinação de ferro [50], cério (III) [51], zircônio, háfnio, zinco [49,52], entre outros íons metálicos [47,49], com alta sensibilidade.

Um dos primeiros trabalhos empregando TAN imobilizado em C18 nas determinações por FI-EFS foi realizado por Teixeira e cols [53], sendo que as condições ótimas de reação encontradas nesse trabalho, empregadas nos experimentos dessa dissertação, serão bases do presentes. O TAN imobilizado em C18 reage com uma série de metais como Co(II), Cu(II), Fe(II), Ni(II) e Zn(II) formando complexos coloridos.

No presente trabalho, foi utilizado um sistema FI-EFS utilizando TAN imobilizado em C18 para análise de zinco e níquel. Segundo Teixeira e cols [53], o zinco reage com o TAN-C<sub>18</sub> formando complexo colorido numa faixa de pH entre 5,8-6,7 e com vazões entre 0,7-2,2 mL min<sup>-1</sup>. O níquel reage com o TAN-C<sub>18</sub> em pH entre 5,8 e 7,3, sendo que o grau de retenção desse metal na fase sólida é altamente dependente da vazão.

O complexo Zn-TAN-C<sub>18</sub> tem máximo de absorção em 585 nm em pH 6,2, sendo o espectro de absorção desse complexo ilustrado na Figura 8.



**Figura 8.** Espectro de absorção do complexo Zn-TAN-C18 em pH 6,2 , usando uma solução  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Zn.

#### **IV.6 – O Sincronizador**

Quando a bomba peristáltica é empregada como dispositivo propulente em sistemas FIA deve-se ter em mente que, apesar da vazão em média ser constante, esta varia de forma senoidal com o tempo devido à pulsação.

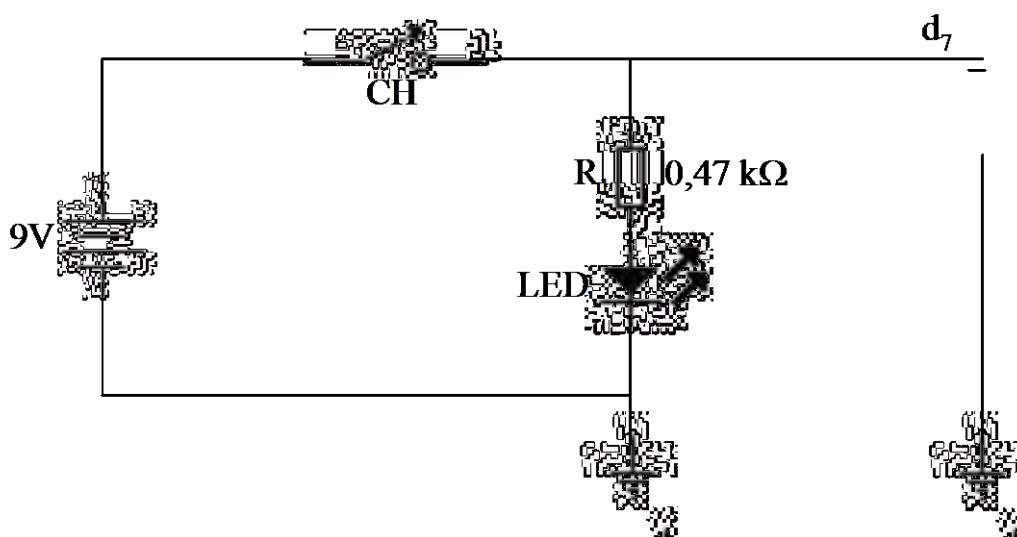
A pulsação ocasionada pela bomba peristáltica é um fator crítico nos sistemas FIA em que a amostragem é controlada pelo tempo de abertura de válvulas, afetando principalmente a precisão das medidas. Esse fator é mais crítico quando o período de abertura da válvula é baixo e a pulsação gerada pela bomba é intensa, pois com um mesmo tempo de abertura de válvula uma

alíquota tomada poderá ser diferente daquela tomada num outro intervalo de tempo.

Nos sistemas FI-EFS, a diminuição da precisão ocasionada pela pulsação da bomba é ainda mais intensa, pois trata-se de um sistema onde os fluídos movimentam-se com pressões mais elevadas que os sistemas FIA usuais, dada a impedância hidrodinâmica.

As alternativas comumente empregadas para minimizar o efeito da pulsação da bomba peristáltica em sistemas FIA são o uso de amortecedores de pulsos [54] ou de um dispositivo sincronizador.

No presente trabalho, foi desenvolvido um dispositivo que possibilitou a realização das injeções de maneira sincronizada com a bomba peristáltica, aumentando a precisão das alíquotas tomadas. A Figura 9 ilustra o diagrama esquemático do circuito do sincronizador.



**Figura 9.** Diagrama esquemático do circuito do sincronizador. CH – chave interruptora do tipo “switch”,  $R_1$  – resistor,  $d_7$  – canal 7 da entrada do conversor analógico/digital da interface PCL-711C.



O sincronizador consiste basicamente em uma bateria de 9 V conectada a uma chave interruptora posicionada de forma que esteja fechada quando pressionada por um rolete da bomba e aberta em outra situação. Dessa forma, somente quando um rolete pressiona a chave interruptora o circuito é fechado e uma ddp é detectada no canal 7 do conversor analógico/digital da placa PCL-711C. Uma subrotina (Apêndice A) escrita em QuickBasic 4.5 monitora os sinais gerados pelo sincronizador de forma que as injeções só sejam realizadas em sincronia com o movimento dos roletes da bomba.

Foram realizados estudos sobre a precisão dos volumes injetados pelo sistema FIA desenvolvido empregando o sincronizador e obteve-se boa precisão para intervalo de tempo de abertura da válvula maior ou igual a 0,1 s.

## **V – AVALIAÇÃO E MODELAMENTO DA DISPERSÃO EM SISTEMAS FI-EFS EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO**

Os sistemas FIA mais simples são caracterizados pela inserção de um certo volume de solução do analito num fluxo não segmentado, até alcançar o detetor. Quando uma alíquota do analito flui através do percurso analítico, esta sofre dispersão ao ser transportada pelo fluido carregador. A dispersão do analito em sistemas FIA deve-se principalmente à combinação dos efeitos causados pelo transporte convectivo e difusivo das espécies [55].

A descrição teórica dos perfis dos sinais transientes obtidos em sistemas de fluxo não segmentado continua em debate [55, 56]. O perfil dos sinais obtidos com o tempo está relacionado principalmente a geometria do sistema de fluxo, além de fatores hidrodinâmicos. Os modelos propostos para descrever os perfis dos picos FIA normalmente consideram condições de fluxo laminar, desprezando a influência de fluxo turbulento [57,58]. Sendo considerado preponderantemente o fluxo laminar, a equação diferencial que define o perfil de dispersão do analito ao longo do tempo (uma equação diferencial de segunda ordem com derivadas parciais) só possui soluções exatas quando assume-se que o transporte do analito é preponderantemente convectivo ou difusivo. Na maior parte dos sistemas FIA o transporte do analito em fluxo é simultaneamente convectivo e difuso, sendo que não há solução exata para equação de difusão-convecção [58]. Soluções numéricas para

equação de difusão-convecção nas condições normalmente encontradas nos sistemas FIA que descrevem o perfil dos picos FIA foram encontrados, por Vanderslice e cols [59,60], sendo que estas equações englobaram um fator empírico (fator de acomodação) para que os resultados se adaptassem aos valores obtidos experimentalmente. Os resultados encontrados por Vanderslice tiveram boas concordâncias com os dados experimentais, sendo que suas equações possibilitaram a determinação de coeficiente de difusão de diversas substâncias com resultados satisfatórios [61].

Apesar da boa concordância dos resultados obtidos pelas equações de Vanderslice com os dados experimentais, estas ainda não explicam completamente os perfis dos picos FIA, havendo algumas divergências com os dados experimentais. A divergência das equações de Vanderslice, bem como nos demais estudos teóricos de FIA, deve-se principalmente ao fato delas não levarem em consideração a existência de conectores, a pulsação devido a bomba peristáltica, a curvatura das tubulações, geometria da cela de fluxo entre outros. Dessa forma os sinais transientes obtidos nos sistemas FIA dificilmente são previstos e para as diversas geometrias e características hidrodinâmicas usuais no sistema.

Os sistemas FIA acoplados a detecção e concentração em fase sólida envolvem, além da dispersão do analito, etapas de retenção, concentração e detecção *in situ*. Os sistemas FI-EFS possuem características que os diferem dos sistemas de EFS em batelada e também dos sistemas FIA usuais. As diferenças dos sistemas FI-EFS em relação aos sistemas de EFS em batelada, além daquelas normalmente decorrentes do processo de automação por FIA (menor consumo de reagentes, aumento da produtividade analítica, menor

risco de contaminação, etc), são decorrentes da: a) distribuição não homogênea do analito na fase sólida após a injeção, visto que a maior parte do analito fica retido nas proximidades da entrada do fluxo da amostra; b) o fato da retenção do analito não ser realizada nas condições do equilíbrio em sistema em fluxo possibilita que a retenção do analito não seja completa, principalmente devido as possíveis incompatibilidades das condições hidrodinâmicas do sistema com a cinética de retenção do analito; c) a retenção do analito pode não ser realizada nas condições ideais de “agitação” que influencia bastante nos dados analíticos. As diferenças dos sistemas FI-EFS em relação aos sistemas FIA usuais relacionam-se com: a) o caráter integrativo ou cumulativo da EFS que em FIA fornece picos com formato totalmente diferente dos obtidos nos sistemas FIA usuais; b) a impedância hidrodinâmica causada pela cela contendo fase sólida, resultando na existência de caminhos preferenciais dos fluídos que percorrem esta fase.

Então, os sistemas FI-EFS contêm características hidrodinâmicas e reacionais extremamente complexas, sendo praticamente impossível propor modelos teóricos que expliquem de maneira ampla os sinais transientes obtidos. Todavia, é necessário o conhecimento de algumas características básicas dos sinais transientes desses sistemas. Essas informações servem de base para desenvolvimento de metodologias analíticas que exploram os perfis dos sinais transientes obtidos por FI-EFS, como nas metodologias descritas nos demais capítulos.

No presente trabalho foram estudados os perfis dos sinais transientes gerados por FI-EFS a partir da reação do zinco(II) com o 1- (2-tiazolilazo)- 2-naftol (TAN) imobilizado em sílica modificada C<sub>18</sub> contida na cela de fluxo. Os

estudos realizados se dividiram em duas etapas. Uma primeira na qual foi estudada a sobreposição de duas injeções seqüenciais de solução de zinco, sendo elaborados modelos semi-empíricos para prever os sinais transientes gerados. Na segunda etapa foi estudada a reação, em linha, entre zinco e oxalato inseridos no percurso analítico por amostragem binária, com detecção por FI-EFS.

## ***VI.1 – Estudo e Modelagem dos Perfis dos Sinais Transientes Gerados no Sistema FI-EFS***

Os objetivos destes estudos relacionam-se com o aumento da produtividade analítica dos sistemas FI-EFS. Para sistemas FI-EFS, este aumento da freqüência analítica pode ser obtido por injeções consecutivas de alíquotas da solução amostra, sem que se faça a eluição das espécies retidas na fase sólida após cada injeção da amostra. Para isto, as injeções devem estar suficientemente defasadas, garantindo a separação entre as alíquotas, para a obtenção dos sinais analíticos referentes à concentração da espécie química de interesse em cada pulso das soluções das amostras injetadas.

Outra vertente que elucida a importância destes estudos está relacionada com o caráter integrativo dos sistemas FI-EFS, sendo necessário o estabelecimento de modelo de dispersão da zona de amostra para o desenvolvimento de métodos de determinação empregando esta técnica de análise química. Assim, um modelo semi-empírico foi desenvolvido, visando prever os perfis dos sinais transientes obtidos experimentalmente.

### **V.1.1 – Experimental - Procedimentos**

Uma solução  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco foi preparada tomando-se uma alíquota de 1 mL da solução estoque  $1000,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  deste íon metálico, transferindo-a para balão volumétrico de 100 mL, onde adicionou-se 50 mL de solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina ( $\text{pH} = 6,2$ ) e completou o volume com água destilada e desionizada.

Foi empregado o sistema de fluxo ilustrado na Figura 4. Utilizou-se como carregador uma solução tampão  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina ( $\text{pH} = 6,2$ ). A vazão em todas as linhas foi igual a  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Os comprimentos do percurso analítico utilizados foram de 60 cm, 100 cm e 150 cm.

Foi avaliada a sobreposição de duas injeções consecutivas de solução de zinco, separadas por solução carregadora em diferentes intervalos de tempo, ou seja, por diferentes volumes de carregador.

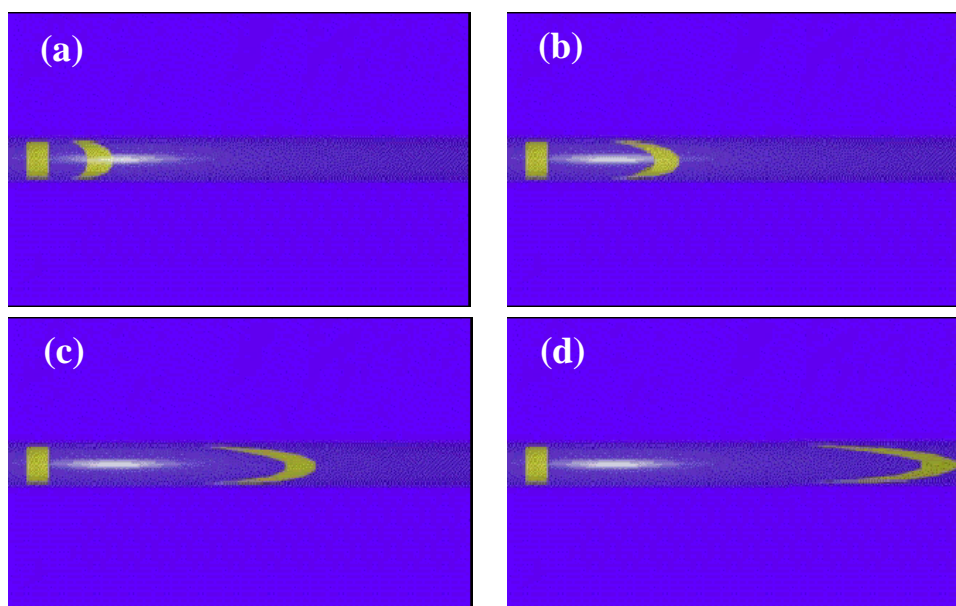
Foram realizadas duas injeções de solução de zinco, sendo que cada uma delas foi realizada com tempo de abertura da válvula correspondente de 1,5 s ( $40 \mu\text{L}$ ). As duas injeções foram separadas por solução carregadora com diferentes intervalos de tempo entre as mesmas. A Figura 10 ilustra dois pulsos do analito separados por um certo intervalo de tempo em sistema de fluxo contínuo. Segundo a Figura 10 os dois pulsos do analito (em vermelho) estão separados por um certo volume de solução carregadora (em azul), sendo o volume de solução carregadora que separa os dois pulsos determinado pelo intervalo de tempo entre as duas injeções



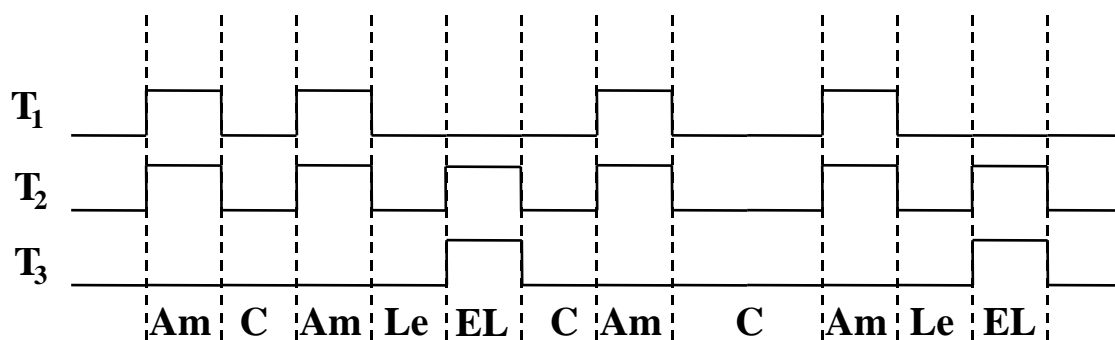
**Figura 10.** Ilustração de dois pulsos do analito separados por um certo intervalo de tempo em sistema de fluxo contínuo.

A Figura 11 ilustra a realização de duas injeções de zinco separadas por diferentes intervalos de tempo.

Como ilustrado na Figura 11, conforme aumenta-se o intervalo de tempo entre as duas injeções do analito maior será o volume de solução carregadora separando-as. A Figura 12 ilustra um diagrama temporal mostrando a seqüência de acionamento das válvulas do sistemas de fluxo quando são realizados dois pares de injeções do analito, sendo cada um desses pares separados por diferentes volumes da solução carregadora.



**Figura 11.** Ilustração de duas injeções consecutivas do analito separadas por diferentes intervalos de tempo, sendo que esse intervalo de tempo aumenta como mostrado em (a), (b), (c) e (d) respectivamente.



**Figura 12.** Diagrama temporal do acionamento das válvulas  $v_1$ ,  $v_2$  e  $v_3$ , correspondentes à solução de zinco, ao carregador e eluente, respectivamente. O traço em nível alto indica o acionamento da válvula correspondente e a largura indica a duração do acionamento. Am – etapa de injeção da uma alíquota da amostras, C – passagem da solução carregadora, Le – etapa de leitura do sinal transiente, EL – etapa de eluição.

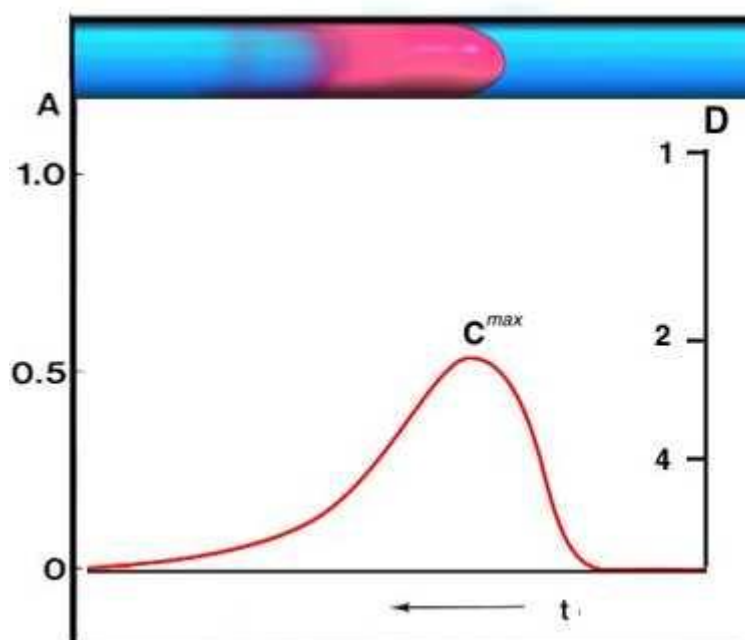
Segundo o diagrama temporal da Figura 12, inicialmente todas válvulas estão desligadas e somente a solução carregadora flui pelo percurso analítico. Em seguida são inseridas duas alíquotas de solução de zinco separadas por um certo intervalo de tempo e, sendo ao final realizada a leitura. Após a leitura é injetada uma alíquota do eluente para remover o zinco retido na fase sólida, seguido pela passagem do carregador para remover o excesso do eluente. O processo é repetido com um intervalo de tempo maior entre as injeções do analito.

Nos estudos realizados, foram realizadas injeções seqüenciais de solução de zinco separadas por intervalos de tempo entre 30 s e 2 s, com passo de 2 s.



### V.1.2 – Resultados e Discussão

Nos sistemas FIA ocorre a dispersão da solução do analito injetada na percurso analítico. O aspecto de um pico FIA usual assemelha-se a uma gaussiana distorcida. A Figura 13 ilustra o aspecto de um pico e de um pulso disperso em sistemas FIA convencionais.



**Figura 13.** Ilustração do perfil de um pico FIA em sistemas ordinários com a passagem do pulso disperso da amostra.

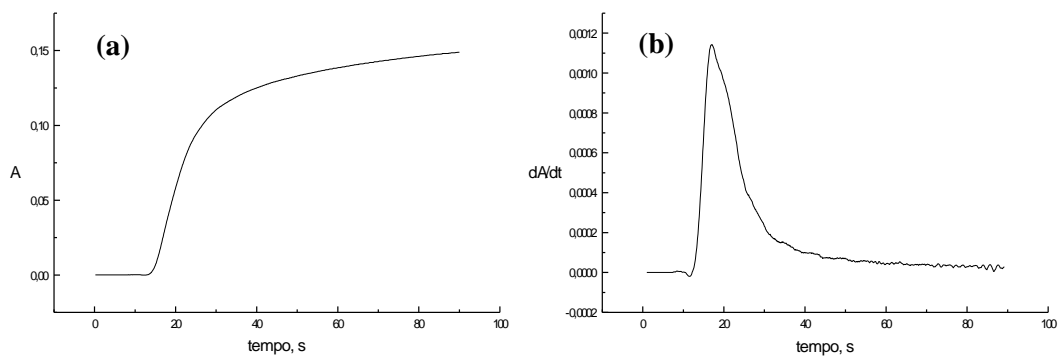
Nos sistemas FI-EFS, diferente dos sistemas FIA usuais, os sinais transientes não registram apenas a passagem das diversas “parcelas” do pulso disperso mas sim o acúmulo do analito na fase sólida com o tempo. Isto porque há a retenção do analito nas diversas “parcelas” do pulso disperso. Em FI-EFS o analito não simplesmente atravessa a cela de fluxo, sendo que ele fica retido na fase sólida e a detecção do sinal é cumulativa.

O perfil dos sinais transientes em FI-EFS obtidos após a injeção do analito (sem injeção posterior do eluente) mostram que os valores de absorvância inicialmente crescem e, após um intervalo de tempo, se estabilizam alcançando um patamar, sendo que este valor de absorvância permanece constante a menos que o analito seja eluído, haja uma outra injeção de analito ou ocorra alguma alteração na fase sólida. O formato dos picos obtidos por FI-EFS foi registrado em alguns trabalhos [40,62], todavia não foi relacionada com o caráter cumulativo ou integrativo desses sistemas em relação aos sistemas em fluxo usuais [63].

Nos sistemas FIA convencionais ocorre uma integração parcial do sinal. Isto ocorre devido ao fato do feixe luminoso não incidir numa cela com volume infinitesimal. Dessa forma, nesses sistemas o sinal registrado relaciona-se com a quantidade total do analito no volume iluminado da cela de fluxo.

A curva ilustrada na Figura 14 mostra um pico FI-EFS no sistema desenvolvido obtido pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  (intervalo de tempo de 1,5 s de abertura da válvula do analito) de solução 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco sem a realização de eluição em seqüência. Essa curva assemelha-se a uma sigmóide (Figura 14a), curva essa que sua derivada resulta numa gaussiana. A Figura 14b comprova o caráter integrativo dos sistemas FI-EFS. A derivada resulta numa curva do tipo gaussiana distorcida de formato bastante semelhante aos obtidos nos sistemas FIA convencionais.

A aplicação da derivação dos sinais transientes em sistemas FI-EFS em trabalhos anteriores apenas objetivava a aquisição de outro tipo de medida analítica para construção de curva de calibração [33], não sendo explorados os conceitos de integração de sinal.



**Figura 14.** Perfil dos sinais transientes em sistema FI-EFS obtidos pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco (a) e primeira derivada da absorbância em função do tempo (b).

Poucos são os sistemas FIA em que, intrinsecamente, ocorre integração do sinal analítico, dentre estes, a gravimetria em fluxo [64] é um sistema em fluxo em que ocorre a integração do sinal (massa), tendo vários aspectos comuns aos sistemas FI-EFS. O aspecto integrativo da retenção do analito por FI-EFS é comum a coleta de precipitado por filtros coletores em fluxo nos sistemas gravimétricos em fluxo. A detecção feita na cela de fluxo contendo fase sólida tem aspecto semelhante ao monitoramento da massa coletada no filtro coletor com o tempo em sistemas de gravimetria em fluxo. A possibilidade de eluição do analito após cada injeção ou simplesmente a avaliação da variação de sinal analítico após cada injeção também pode ser empregada, levando em consideração as restrições de cada uma das técnicas.

Uma outra característica dos sistemas FI-EFS, relacionada com a acumulação do analito na fase sólida, é a aditividade das absorbâncias após cada injeção das amostras, sendo que, dentro de uma certa faixa, não é

necessário a eluição do analito após cada injeção pois é possível obter os mesmos sinais analíticos a partir da variação do sinal de absorbância. Após as injeções consecutivas de diferentes soluções-amostra, sem eluição, o gráfico mostra uma seqüência de sigmóides que assemelha-se a uma “escada” na qual a altura de cada “degrau” está relacionada com a concentração do analito na respectiva amostra.

Quando são realizadas duas injeções consecutivas, em sistemas de fluxo contínuo, pode ocorrer a sobreposição dos dois pulsos (overlap) se a distância entre os mesmos não for suficiente. Isso ocorre pois conforme os pulsos são dispersos há um alargamento das zonas dos pulsos, ocorrendo interpenetração de injeções consecutivas que não estejam suficientemente separadas.

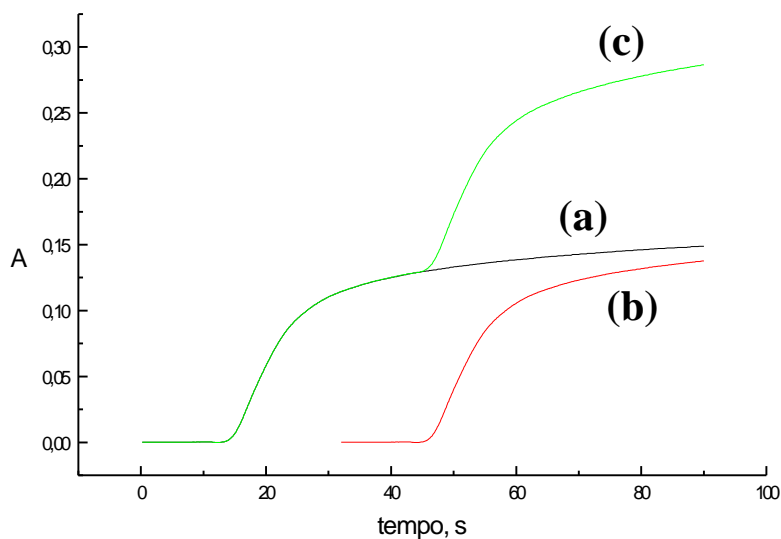
A sobreposição de duas injeções consecutivas de solução de zinco, separadas por solução carregadora em diferentes intervalos de tempo, ou seja, por diferentes volumes de carregador, foi avaliada.

Diferentes comprimentos do percurso analítico (60 cm, 100 cm, 150 cm) foram utilizados visando avaliar a sobreposição das duas injeções consecutivas de solução de zinco sendo influenciada pelo aumento da dispersão devido ao aumento do percurso analítico.

Devido à aditividade das absorbâncias nos sistemas FI-EFS após injeções consecutivas da solução do analito, realizou-se simulações objetivando obter os perfis dos sinais transientes após duas injeções consecutivas do analito, separada por diferentes intervalos de tempo, usando o perfil obtido com apenas uma injeção do analito.

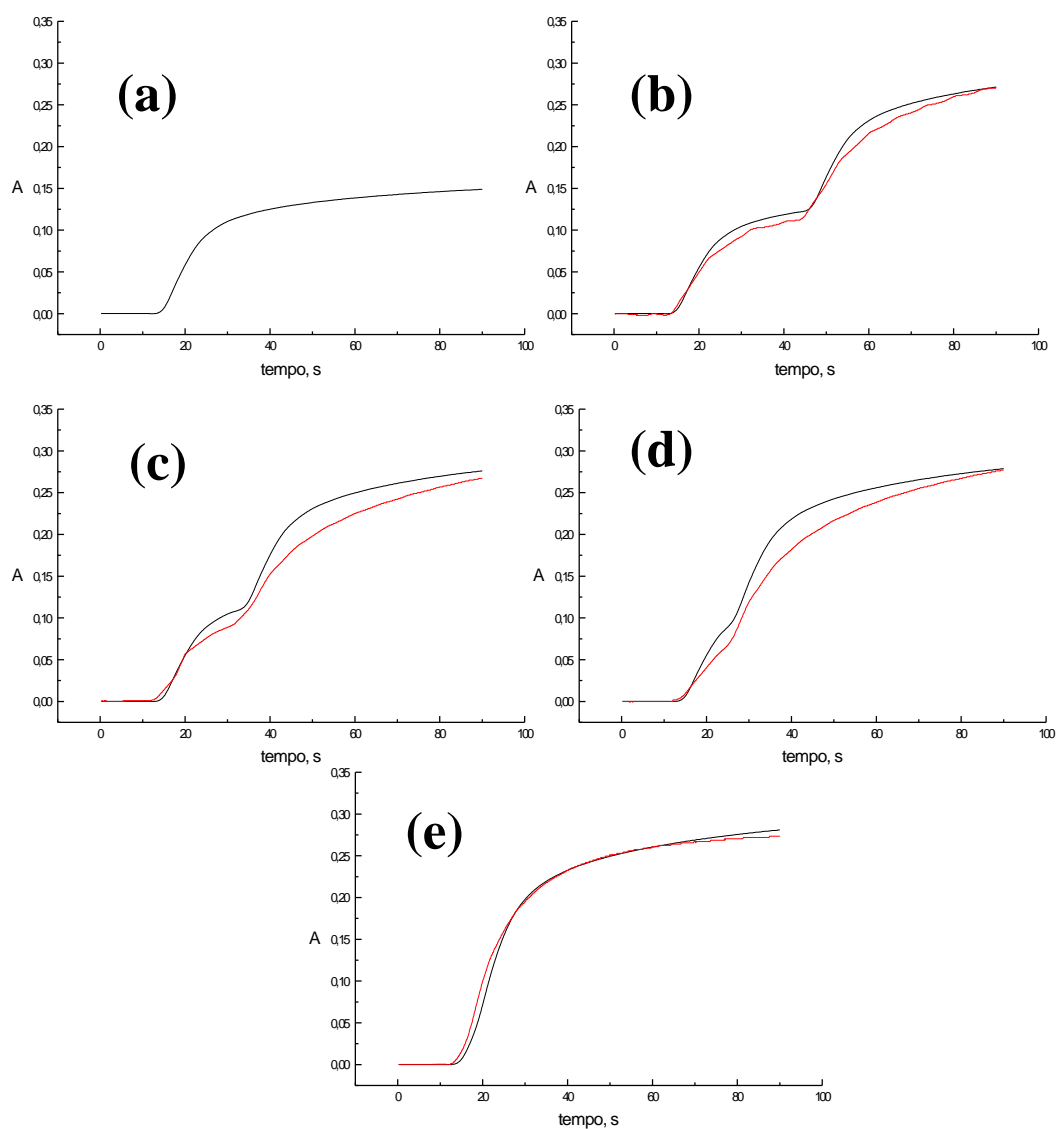
O modelo matemático desenvolvido para simulação dos perfis dos sinais transientes obtidos após duas injeções consecutivas do analito é semi-empírico, pois utiliza dados experimentais na sua construção. A metodologia utilizada no processo de simulação está ilustrada nas curvas da Figura 15. Para construção do modelo nas simulações, inicialmente é realizada uma injeção de 40  $\mu\text{L}$  da solução 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em zinco para um determinado comprimento do percurso analítico, sendo registrados os sinais transientes (Figura 15, curva a). O segundo passo da modelagem é fazer uma cópia do perfil do sinal transiente, obtido para uma injeção do analito, deslocando-o em  $\Delta t$  segundos em relação ao eixo do tempo (Figura 15, curva b), sendo  $\Delta t$  equivalente ao intervalo de tempo entre duas injeções consecutivas. Por fim essas as absorbâncias relativas às duas curvas são somadas, sendo a curva resultante (Figura 15, curva c) igual ao perfil dos sinais transientes para duas injeções seqüenciais do analito separadas por  $\Delta t$  segundos obtido pelo modelo proposto. Na Figura 15 é ilustrado o processo de obtenção, por simulação, de uma curva obtida por duas injeções de 40 $\mu\text{L}$  de solução de zinco, em fluxo contínuo, separadas por 30s em sistema FI-EFS.

As curvas exibidas nas Figuras 16, 17 e 18 mostram os perfis dos sinais transientes obtidos após uma única injeção e após duas injeções do analito separadas por 30 s, 18 s, 10 s e 2 s (800  $\mu\text{L}$ , 180  $\mu\text{L}$ , 267  $\mu\text{L}$  e 53  $\mu\text{L}$  de solução carregadora respectivamente), para comprimentos do caminho analítico iguais a 60 cm, 100 cm e 150 cm, respectivamente, para os sinais obtidos experimentalmente e por simulação. Todos experimentos foram realizados em triplicada, sendo que todos as curvas ilustradas foram obtidas por média simples.

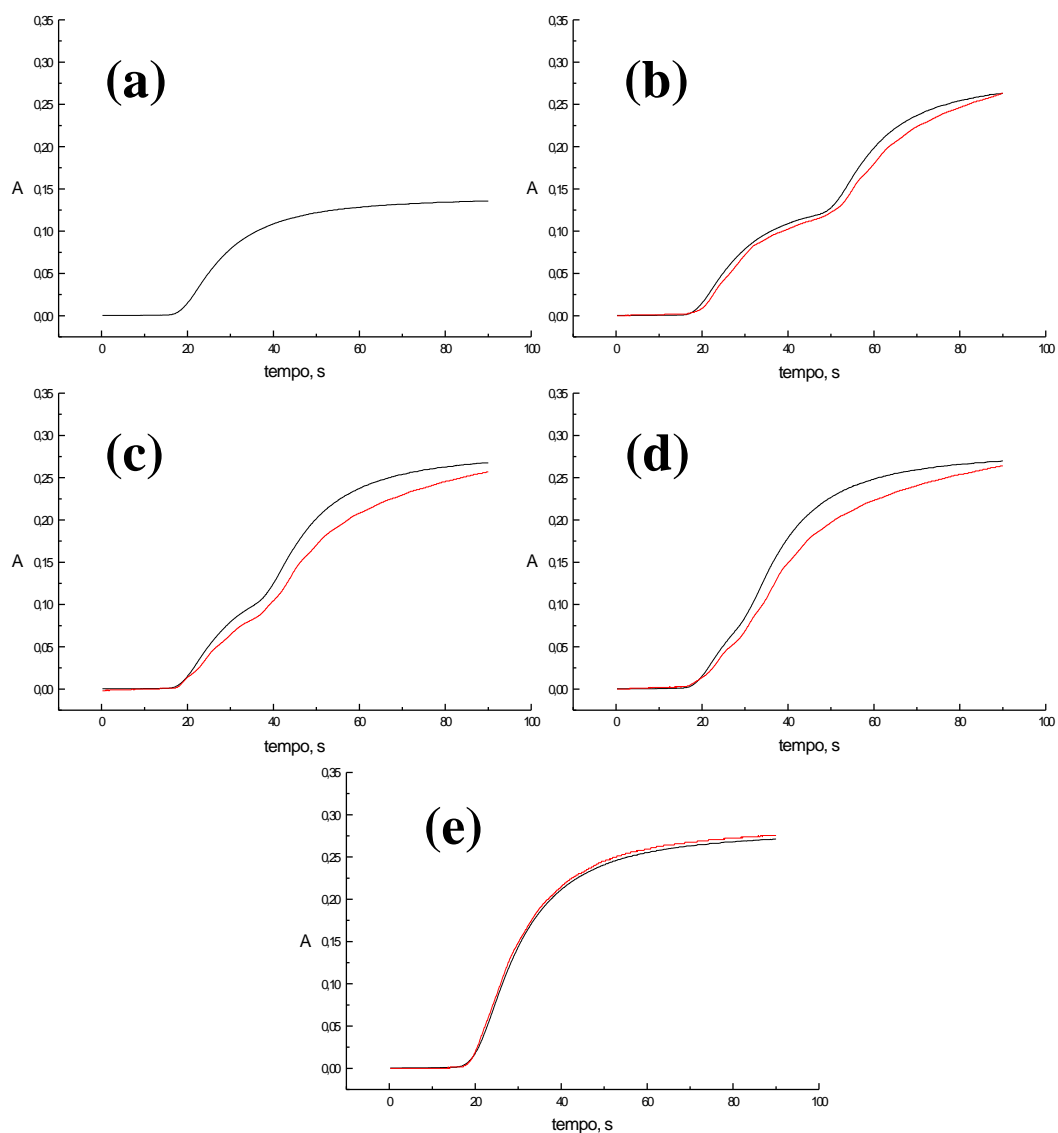


**Figura 15** Perfil do pico obtido pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco (a), gráfico obtido deslocando curva (a) em 30s e (c) soma das curvas (a) e (b).

Segundo os gráficos ilustrados nas Figuras 16, 17 e 18 pode-se verificar que conforme diminui-se o intervalo de tempo entre as duas injeções do analito os sinais correspondentes a essas injeções, os dois patamares, ficam mais sobrepostos. Quando o intervalo de tempo entre as injeções é igual a 2 s, em todos os casos estudados, os patamares apresentaram-se totalmente sobrepostos, tendo os sinais transientes um perfil equivalente ao obtido por uma única injeção com o dobro do volume em relação ao utilizado nas injeções individuais. Além disso, para intervalos de tempo entre injeções inferiores a 2 s os perfis dos sinais transientes permanecem inalterados.

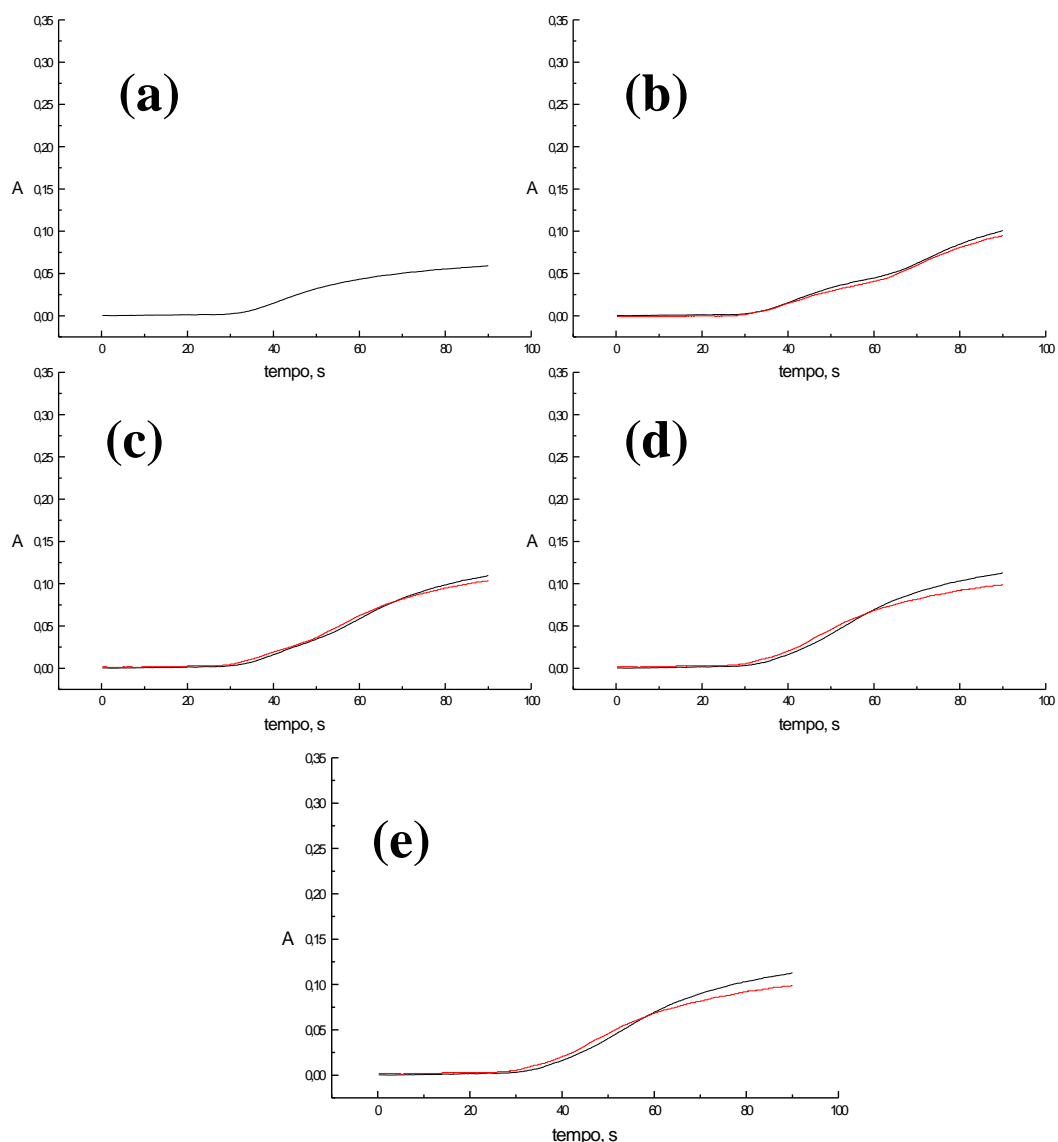


**Figura 16** Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 60 cm.



**Figura 17** Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 100 cm.





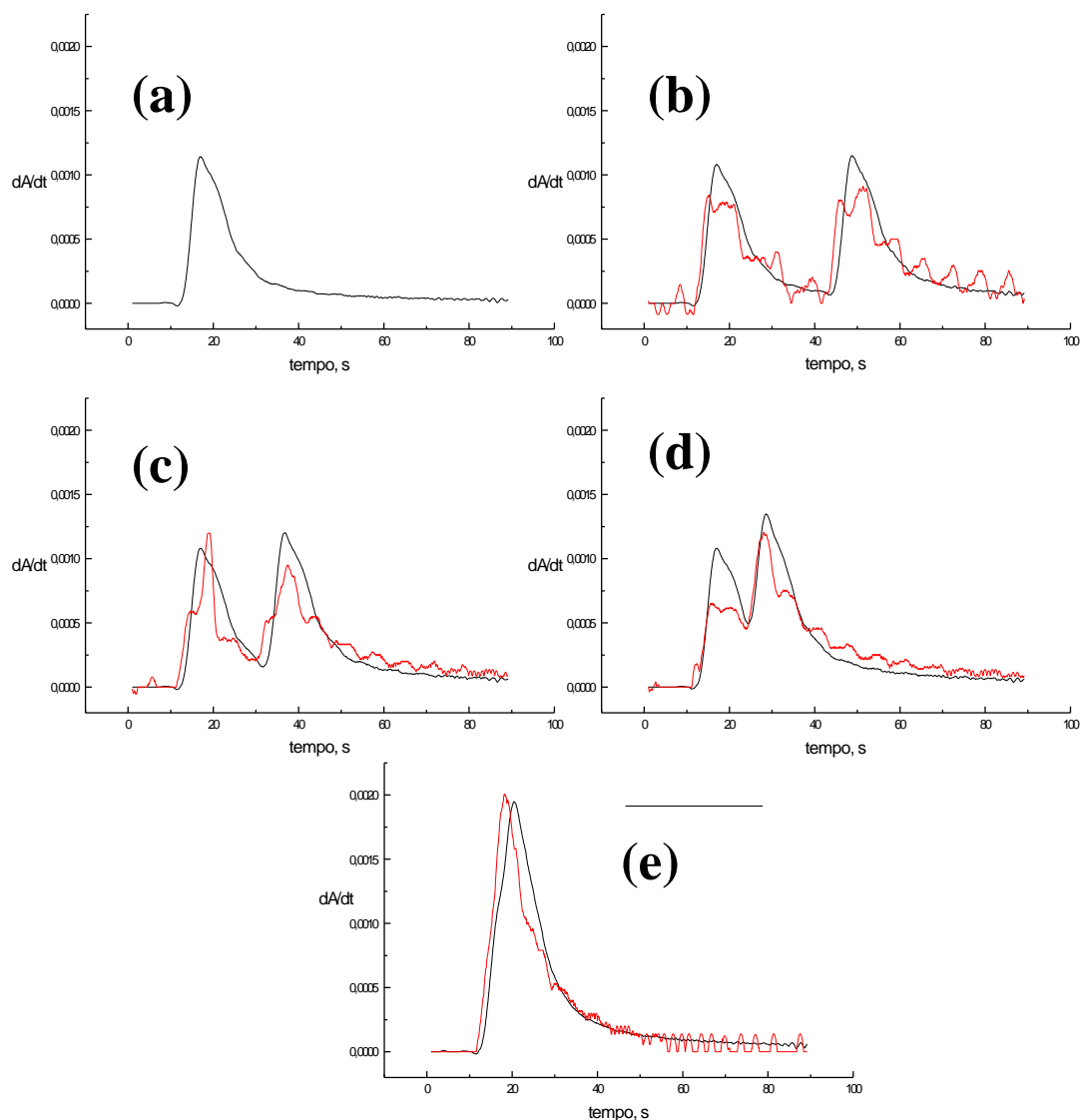
**Figura 18** Perfis dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 150 cm.

Conforme aumenta-se o comprimento do percurso analítico aumenta-se a dispersão do volume do analito injetado, sendo que devido ao regime de fluxo ocorre um alargamento do pulso de amostra e, conseqüentemente, os dois

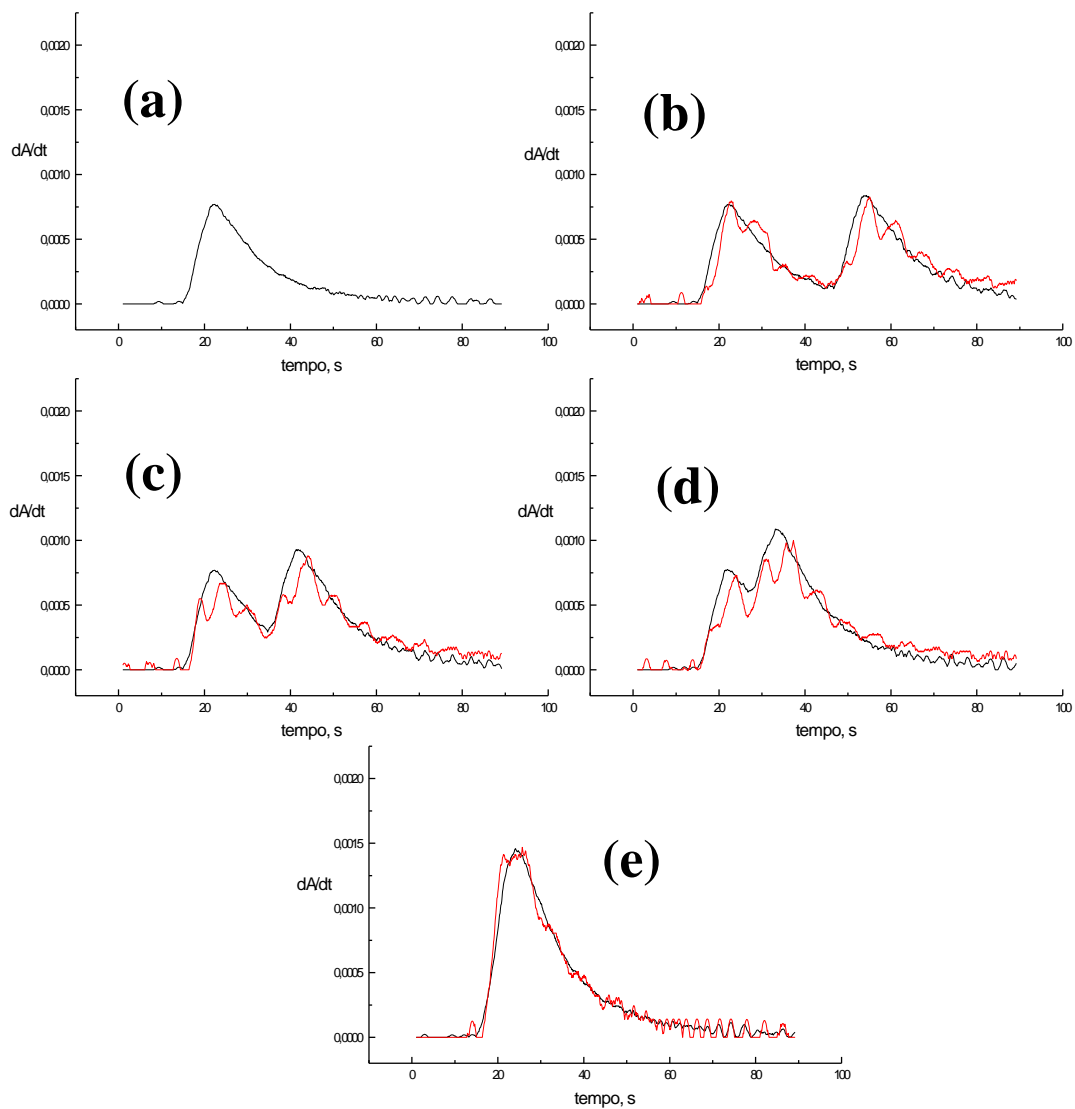
pulsos se sobrepõe mais facilmente. Segundo as curvas ilustradas nas Figuras 16, 17 e 18 a sobreposição total das injeções ocorreu para intervalos de tempo entre as injeções menores que 2 s, 3 s e 10 s para os comprimentos do percurso analítico de 60 cm, 100 cm e 150 cm, respectivamente.

Analisando-se as curvas ilustradas nas Figuras 16, 17 e 18, em relação à variação do comprimento do percurso analítico, averiguou-se que aumentando o percurso analítico, com conseqüente aumento na dispersão, o crescimento do sinal com o tempo torna-se mais lento, ou seja, a quantidade de analito por unidade de tempo diminui. Esse resultado é evidenciado pelas derivadas dos sinais transientes das curvas das Figuras 16, 17 e 18, sendo estas derivadas ilustradas nas Figuras 19, 20 e 21. A altura dos picos das derivadas, que se relaciona com a variação da absorbância por unidade de tempo, diminui conforme aumenta o comprimento do percurso analítico.

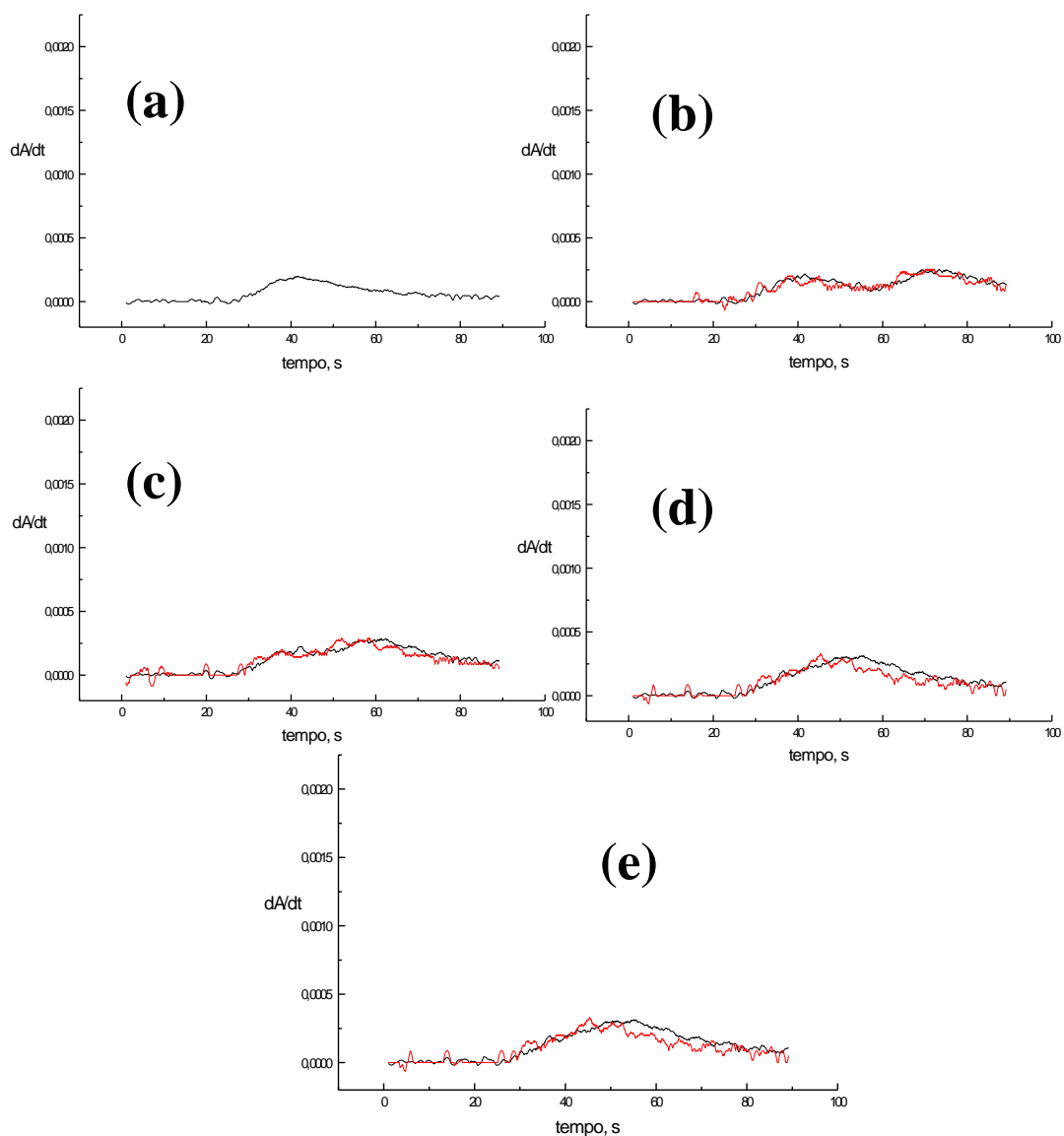
As curvas das derivadas apresentam picos que se assemelham àqueles obtidos nos sistemas FIA convencionais. Os picos das derivadas tornam-se mais sobrepostos conforme diminui-se o intervalo de tempo entre as injeções, sendo que essa sobreposição ocorre mais facilmente conforme aumenta-se o comprimento do percurso analítico. Quando aumenta-se o comprimento do percurso analítico os picos referentes as curvas das derivadas tornam-se mais largos, evidenciando um alagamento dos pulsos devido ao aumento da dispersão. Dessa forma, os resultados obtidos observando-se as curvas das derivadas concordam com aqueles obtidos na análise das curvas das Figuras 16, 17 e 18.



**Figura 19** Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 60 cm.



**Figura 20** Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 100 cm.



**Figura 21** Derivadas dos sinais transientes obtidos por injeção única (a) e por duas injeções consecutivas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  separadas por 30 s (b), 18 s (c), 10 s (d) e 2 s (e), para os dados experimentais (curvas em vermelho) e simulados (curvas em preto), com comprimento do percurso analítico de 150 cm.

Quando o percurso analítico foi igual a 150 cm, a dispersão do analito é tão grande que, dentro do intervalo de tempo de leitura (90 s), não foi

alcançada a estabilização do sinal, com formação do patamar, sendo que o sinal analítico máximo alcançado foi bem menor que aquele referente ao caminho analítico de 60 cm. Em relação às curvas das derivadas para percurso analítico de 150 cm, após o máximo dos picos os valores não chegam a zero, evidenciando que não ocorreu a estabilização do sinal dentro do intervalo de tempo de leitura.

Uma possível explicação para os sinais não se estabilizarem e serem muitos baixos para percurso analítico de 150 cm é que dentro do intervalo de tempo de leitura ainda nem todo pulso disperso havia passado pela cela de fluxo. Outra possibilidade para explicar os sinais reduzido é que devido à baixa concentração do pulso disperso a velocidade de retenção foi baixa e, dentro do intervalo de tempo de residência na cela, somente uma parcela do zinco foi retida. As baixas concentrações dos pulsos dispersos para esse percurso analítico também pode desfavorecer termodinamicamente a extensão da reação de complexação em fase sólida, sendo que a diminuição na entropia do sistema pode não ser suficientemente compensada.

Os perfis das curvas obtidas pela injeção de duas alíquotas de solução de zinco (Figuras 16, 17 e 18) , de maneira geral, apresentam boa semelhança com os obtidos pelo procedimento adotado para simulação desses sinais transientes. As curvas das derivadas obtidas por simulação também apresentam boa concordância com os dados experimentais. As pequenas divergências entre os dados simulados e experimentais podem ser atribuídas ao fato que a metodologia empregada nas simulações só leva em consideração a aditividade das absorbâncias nos sistemas FI-EFS e o espaçamento entre as duas injeções, não levando em consideração a distribuição não homogênea do

analito na fase sólida, a influência da competição do analito por sítios de reação disponíveis na fase sólida na cinética de reação, a saturação localizada da fase sólida pelo analito, o tempo mínimo necessário para que a fase sólida seja recondicionada pela solução carregadora, entre outras características. Apesar das simulações não levarem em consideração uma série de fatores, há uma concordância muito boa entre os resultados, sendo que mesmo quando os valores dos sinais analíticos não são concordantes o formato dos gráficos obtidos experimentalmente e por simulação coincidem em quase todos os aspectos tanto nos dados de absorvância como nas derivadas.

Deve-se observar que dependendo do comprimento do percurso analítico e do intervalo de tempo entre as injeções podem ocorrer casos em que, antes de ser realizada a segunda injeção, o analito presente na primeira injeção já foi retido, isso ocorre nos casos em que o intervalo de tempo entre injeções é longo e o percurso analítico é curto. Nos casos avaliados para intervalos de tempo entre injeções superiores a 10 s, 18 s e 28 s para comprimento do percurso analítico de 60 cm, 100 cm e 150 cm, respectivamente, a primeira injeção passa pela cela do fluxo antes de ser realizada a segunda injeção.

### **V.1.3 - Conclusões**

Os estudos realizados com análise pelo sistema FI-EFS proposto empregando injeções de duas alíquotas de solução  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco, com volume fixado em  $40 \mu\text{L}$ , e separados por diferentes intervalos de tempo mostra que a sobreposição total entre as injeções ocorre quando o intervalo de

tempo entre as injeções é inferior a um determinado intervalo de tempo limite, sendo que com o aumento do comprimento do percurso analítico esse intervalo de tempo limite aumenta, devido ao aumento da dispersão.

O uso das derivadas dos sinais transientes propicia a obtenção de informações adicionais em relação a sobreposição de duas alíquotas de solução amostra.

O sistema FI-EFS proposto possui característica de integração dos sinais transientes em relação ao que seria obtido nos sistemas FIA usuais. Esse fato é evidenciado pela aplicação da primeira derivada dos sinais transientes obtidos no sistema FI-EFS, uma vez que os gráficos das derivadas apresentam perfis extremamente semelhantes aos dos picos FIA tradicionais. Todavia, o sistema FI-EFS desenvolvido não apresentou-se como um integrador perfeito, visto que houveram pequenas diferenças entre os gráficos simulados e obtido experimentalmente, nos estudos da sobreposição de duas injeções seqüenciais de zinco, principalmente devido a influência de fatores como cinética de retenção do analito, recondicionamento da fase sólida e distribuição não homogênea do analito na fase sólida. Outro fato que demonstra que o sistema FI-EFS desenvolvido não se constitui num integrador perfeito é que uma completa estabilização do sinal do patamar não é obtida, sendo que os sinais continuam a crescer suavemente. Apesar disso o sistema FI-EFS proposto apresenta caráter integrativo relativamente próximo a um integrador perfeito, sendo que; de uma forma geral, a concordância entre os perfis dos sinais transientes obtidos empiricamente e por simulação foi muito boa.



## ***VI.2 – Estudo da Reação em Linha de Zinco e Oxalato Empregando Multicomutação e Detecção por FI-EFS***

Em FIA há diferentes alternativas de processar uma reação em linha de analito com um reagente [65]. A configuração mais simples é o diagrama de fluxo de linha única, onde o fluido carregador é o reagente. Neste módulo de análise a mistura do reagente com a amostra ocorre exclusivamente por dispersão, enquanto a mesma é transportada em direção ao detetor. Quando a relação entre os volumes da amostra e do percurso analítico é inadequado, o reagente pode não atingir o centro da amostra, em quantidade suficiente, para satisfazer as condições para o desenvolvimento das reações químicas envolvidas. Esta limitação foi resolvida pela adição contínua dos reagentes por confluência e empregando-se uma solução quimicamente inerte como carregadora de amostra. Nesse caso, cada fração de amostra recebe a mesma quantidade do reagente, portanto não há gradientes de concentração de reagentes no percurso analítico. Além disso pode-se utilizar volumes de amostra superior ao do percurso analítico, melhorando a sensibilidade do método e como a reação tem início a partir do ponto de confluência, pode ser utilizado percurso analítico mais curto, tendo como resultado um aumento de produtividade analítica.

Uma outra forma de reação do analito com um reagente em linha envolve o uso de conceitos de multicomutação e amostragem binária [67 , 68]. O desenvolvimento destes conceitos baseia-se no uso de válvulas solenóides

de 3 vias, sendo que cada uma delas funciona como um comutador individual [69], enquanto que os demais dispositivos de injeção possuem comutação solidária. O uso dessas propicia uma maior flexibilidade no desenvolvimento das diferentes configurações de sistema FIA. O conceito básico de multicomutação e amostragem binária é a inserção em “tandem”, no percurso analítico, de pequenas alíquotas de amostra e dos reagentes, sendo que o tempo de acionamento das válvulas solenóides e a vazão determinam o volume das frações das soluções inseridas no percurso analítico [67,68]. A inserção de várias frações da amostra e do reagente por amostragem binária propicia uma mistura mais eficiente, uma vez que o número de superfícies de contato entre as soluções aumenta. Uma das vantagens do uso do conceito da amostragem binária é que a reação inicia-se no momento da amostragem e, diferente dos demais procedimentos de injeção, com a utilização do intervalo de tempo de amostragem aumenta-se a produtividade analítica. Além disso, como apenas uma válvula é acionada por vez na injeção de soluções, não ocorre a divisão da vazão total na confluência, permitindo propulsão das soluções por aspiração sem diminuição da frequência analítica [70]. O conceito de multicomutação e amostragem binária foi empregado com sucesso na determinação de espécies químicas em diferentes amostras [67-74].

O objetivo deste investigação foi avaliar a influência da injeção de um agente complexante auxiliar em tandem com a solução de  $Zn^{2+}$  sobre o sinal analítico. Para isto realizou-se o estudo com o sistema empregando soluções de  $Zn^{2+}$  e  $K_2C_2O_4$ , as quais foram introduzidas no percurso analítico seguindo a lógica da amostragem binária e com detecção por EFS.

### **V.2.1 – Experimental - Procedimentos**

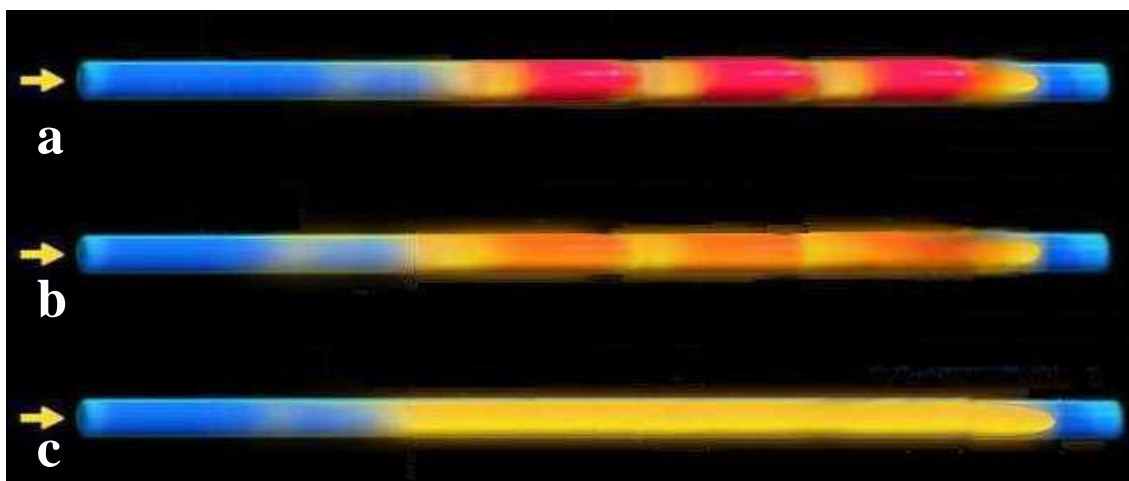
Uma solução  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco foi preparada tomando-se uma alíquota de 1 mL da solução estoque  $1000,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  deste íon metálico, transferindo-a para balão volumétrico de 100 mL, onde adicionou-se 50 mL de solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina ( $\text{pH} = 6,2$ ) e completou o volume com água destilada e desionizada.

As soluções  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  em oxalato de potássio ( $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) foram preparadas dissolvendo-se 1,8423 g e 0,1842 g, respectivamente, do sal em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada e desionizada.

Foi empregado o sistema de fluxo ilustrado na Figura 5. Utilizou-se como carregador uma solução tampão  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina ( $\text{pH} = 6,2$ ). A vazão em todas as linhas foi igual a  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ . O comprimento do percurso analítico utilizado foi fixado em 60 cm.

No procedimento proposto, 3 frações da solução de zinco de  $40 \mu\text{L}$  (tempo de cada abertura de válvulas da solução de zinco de 1,5 s) foram inseridas de maneira alternada com 3 frações de solução de oxalato de potássio cujos volumes dessas frações foram variados nas diferentes amostragens. O tempo de abertura da válvula da solução de oxalato variou entre 0 s e 1,5 s, com passo de 0,1 s. Foram realizados estudos da reação com o zinco em linha empregando soluções  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  em oxalato de potássio. A Figura 22 ilustra o processo de inserção, sob amostragem binária, de 3 frações da solução do reagente (vermelho) e 4 frações de zinco (amarelo). Inicialmente (Figura 22a) as frações da amostra e do reagente encontram-se

nitidamente separadas, e conforme os fluídos são transportadas as frações da amostra e reagente começam a se misturar por dispersão (Figura 22b), e conforme continua a migrar a mistura torna-se praticamente homogênea, (Figura 22c).



**Figura 22.** Ilustração do processo de mistura quando 3 frações do reagente (vermelho) e 4 frações da amostra (amarelo) são inseridos por amostragem binária no processo analítico. Em (a) a mistura não é eficiente em (b) inicia-se uma mistura mais eficiente entre as frações e (c) a mistura torna-se homogênea.

### **V.2.2 – Resultados e Discussão**

A mistura entre as frações inseridas por amostragem binária torna-se mais eficiente quando o número de frações de amostra e analito é grande, pois o número de faces de contato entre as frações é maior, além disso a mistura entre as frações depende da razão entre o comprimento de percurso analítico e o volume das frações do analito e reagente, de forma a garantir a

interpenetração das frações da amostra e reagente no percurso analítico. Embora normalmente deseja-se que haja a formação de uma mistura homogênea entre reagente e analito, isto não é uma condição necessária para que a reação ocorra eficientemente, bastando que uma quantidade suficiente de reagente penetre no pulso da amostra.

No sistema proposto as injeções dos 3 pulsos consecutivos de solução de zinco e oxalato por amostragem binária foram realizadas de forma que cada fração de solução de zinco é injetada inicialmente e seguida por um fração de solução de oxalato conforme ilustrado na Figura 22.

No presente estudo, na avaliação do sinal transiente gerado pela injeção, sob amostragem binária, de zinco e oxalato de potássio, o complexo formado entre o zinco e oxalato ( $\log k_1 = 4,85$  e  $\log k_2 = 2,7$ ) [77] menos estável que entre o zinco e o TAN ( $\log k_{ML} = 12,24$  e  $\log k_{ML2} = 12,29$ ) [47] todavia, deve-se levar em consideração que as constantes de formação dadas para o complexo zinco TAN foram calculadas a partir de experimentos realizados em solventes orgânicos (dioxano). No sistema EFS desenvolvido, a reação entre o zinco e o TAN ocorre em uma fase sólida, o que envolve o processo de transferência de massa para o sólido, na qual o grau de complexidade do sistema reacional é muito elevada principalmente quando leva-se em consideração a possibilidade de impedimento estérico das moléculas de TAN causado pela perda de mobilidade da molécula adsorvida em C<sub>18</sub>. Dessa forma as comparações entre as constantes dadas na literatura dos complexos Zn-oxalato e Zn-TAN indicam apenas que o complexo Zn-TAN é mais estável que o complexo Zn-oxalato, porém estas constantes não fornecem informações

suficientes para estimar quanto um complexo é mais estável em relação ao outro nas condições empregadas no sistema FI-EFS proposto.

As possibilidades de reação entre o zinco e o oxalato no sistema FI-EFS são: (a) o zinco forma um complexo, em linha, com o oxalato, sendo que este é desfeito quando entra em contato com o TAN-C<sub>18</sub>, sendo retido na fase sólida o zinco livre e o zinco que estava complexado com o oxalato; (b) o zinco forma um complexo, em linha, com o oxalato, sendo que o zinco que não reagiu com o oxalato fica retido na fase sólida; (c) o zinco forma um complexo em linha com o oxalato, o zinco livre reage com o TAN-C<sub>18</sub> sendo que parte do complexo formado na fase sólida é removido pela passagem de um pulso contendo oxalato livre.

No caso (a) o formato dos picos obtidos seria semelhante àqueles gerados substituindo a solução de oxalato por uma solução inerte, como a solução carregadora, isso porque todo zinco presente que passa para cela de fluxo é retido na mesma durante essa passagem, independente se o zinco estava livre ou complexado. Nesse caso, o oxalato funcionaria apenas como um diluente e separador das frações de solução de zinco, sendo que poderão ocorrer diferenças no formato do pico em relação ao obtido substituindo a solução de oxalato por solução carregadora devido a fatores cinéticos envolvidos na remoção de zinco complexado com o oxalato para o TAN-C<sub>18</sub>, tendo todavia, a altura final de patamar praticamente igual ao obtido substituindo o oxalato pelo carregador.

Para o caso (b) o formato dos picos seriam bastante semelhantes ao descrito para o caso (a), sendo que os valores dos sinais transientes seriam

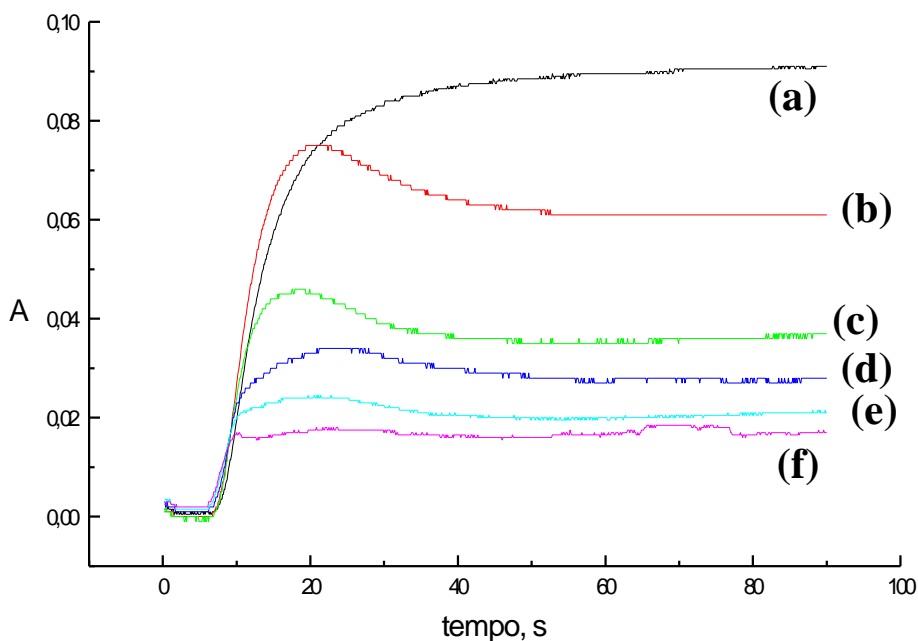
menores que no caso (a) já que a quantidade de zinco que reage com o TAN-C<sub>18</sub> seria inferior àquela do caso (a).

O formato e a altura dos patamares obtidos para o caso (c) seriam totalmente diferentes aos que seriam propiciados nos casos (a) e (b). Inicialmente o sinal analítico cresceria, devido a chegada do primeiro pulso da amostragem binária, que é de solução de zinco na qual parte deste não reagiu com o oxalato. Após um certo período o sinal cessa seu crescimento, atingindo um máximo, que é inferior ao sinal do patamar obtido pela injeção de três frações de solução de zinco sem a presença de solução de oxalato, e passa a decrescer devido a remoção de zinco retido na fase sólida pelo oxalato livre no pulso subsequente de oxalato. O sinal ao final se estabilizaria num patamar, quando inicia-se a passagem da solução carregadora, sendo este relacionado com a quantidade de zinco que não foi removida pela solução de oxalato.

Os resultados obtidos pela injeção por multicomutação de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (abrindo a válvula da amostra por 1.5 s) de solução 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco e 3 pulsos de diferentes volumes de solução de oxalato de potássio 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  são mostrados na Figura 23. O tempo de abertura da válvula da solução de oxalato em cada fração foi de 0 s a 1,5 s com variações de 0,1 s em 0,1 s.

As curvas da Figura 23 mostram que as condições de reação para solução 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de oxalato de potássio enquadram-se no caso (c) citado anteriormente. Os sinais inicialmente crescem, devido a chegada de zinco livre presente no primeiro pulso de solução de zinco, alcançando um valor máximo para então decrescer até alcançar a estabilização. Pelo formato das curvas na Figura 23, o zinco livre presente no primeiro pulso é retido pelo TAN-C<sub>18</sub>, sendo

isto registrado pelo aumento do sinal, e então esse zinco é removido pelo excesso de solução de oxalato presente na zona da amostra, acarretando no decréscimo do sinal. O sinal analítico poderia crescer um pouco com a chegada dos dois outros pulsos de solução de zinco, todavia isso não ocorre, pois, sendo estes pulsos de zinco cercados por pulsos de solução de oxalato, a mistura desse pulso com os pulsos de oxalato é mais efetiva, e a quantidade de zinco não complexado nesses dois pulsos não é suficiente para mostrar um crescimento no sinal perceptível após atingir o máximo.

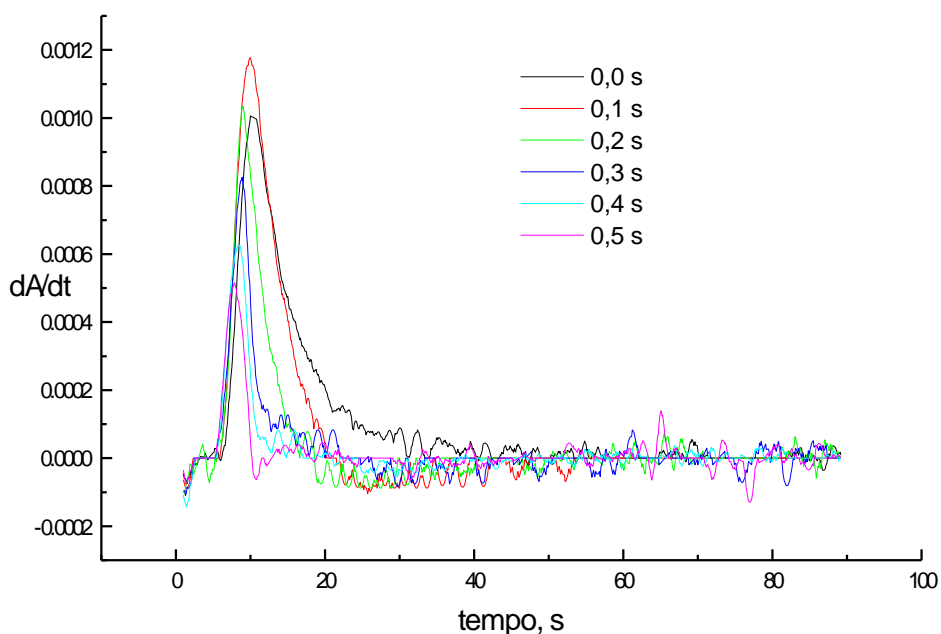


**Figura 23.** Sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 frações de  $40 \mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de  $1,5 \text{ s}$ ) de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 frações de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio com tempo de abertura da válvula do oxalato de (a)  $0 \text{ s}$ , (b)  $0,1 \text{ s}$ , (c)  $0,2 \text{ s}$ , (d)  $0,3 \text{ s}$ , (e)  $0,4 \text{ s}$  e (f)  $0,5 \text{ s}$ .



Os sinais analíticos para o experimento sem a inserção de solução de oxalato ( $0 \mu\text{L}$ ) foram obtidos introduzindo 3 pulsos de solução de zinco no percurso analítico, sendo cada uma das inserções sincronizada, de forma a reproduzir os efeitos da interrupção do fluxo e das aberturas de válvulas nos perfis dos sinais transientes adquiridos no sistema FI-EFS desenvolvido.

A Figura 24 mostra o gráfico da primeira derivada dos sinais transientes exibidos na Figura 23. Os gráficos das derivadas, além de fornecerem informações sobre a taxa de crescimento do sinal analítico com o tempo, também reproduz o formato de um pico FIA convencional nas condições estudadas.

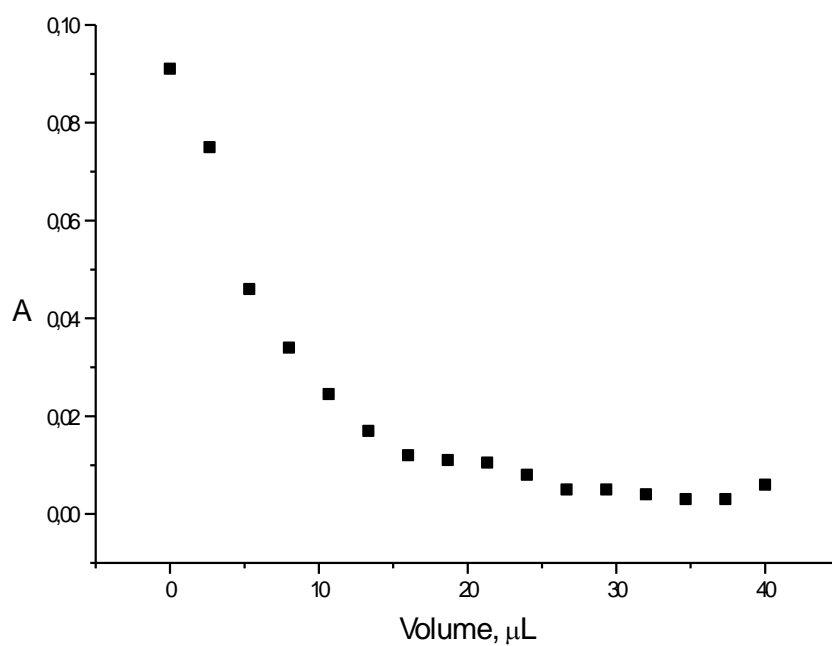


**Figura 24.** Derivadas dos sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de  $40 \mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de  $1,5 \text{ s}$ ) de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.

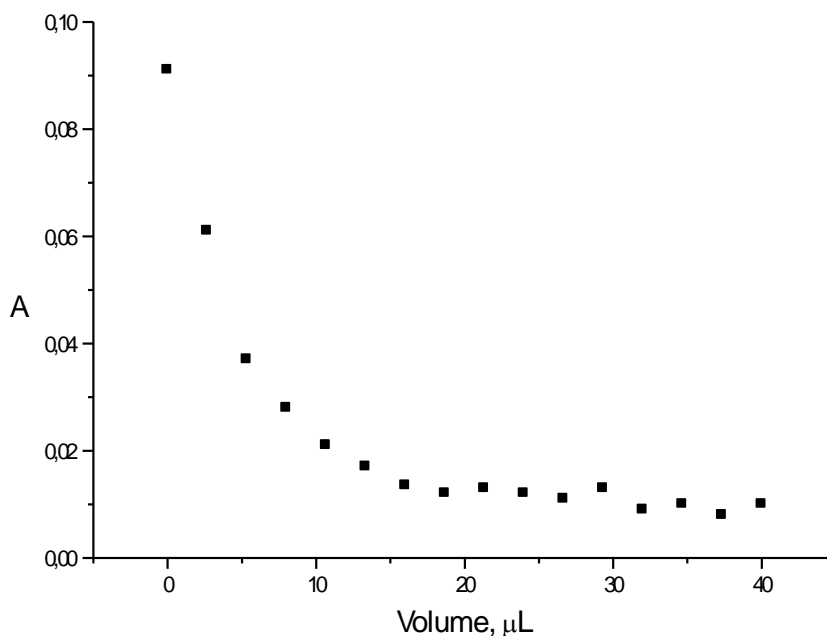
Para os pulsos de solução de oxalato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , os perfis das derivadas (Figura 24) mostram picos que, diferente do pico obtidos quando não é introduzida solução do complexante, após atingirem o máximo decrescem até que os valores da derivada tornam-se negativos, formando um vale, e então esses valores crescem até se estabilizarem em torno de zero. Isso enfatiza o que ocorre nas curvas da Figura 23, pois o fato dos valores das derivadas crescerem inicialmente evidenciam a reação de zinco livre presente no pulso inicial com o TAN-C<sub>18</sub>, sendo que ao decrescer ao ponto das derivadas tornarem-se negativas enfatizam a remoção de parte do zinco retido na fase sólida pelo oxalato livre presente nos pulsos subsequentes.

Conforme aumenta-se o volume dos pulsos de solução de oxalato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por amostragem binária, tornam-se menor a absorbância máxima e a absorbância na região de estabilização dos sinais conforme apresenta na Figura 23. As curvas das Figuras 25 e 26 mostram a variação do sinal de máximo e do sinal na região de estabilização, respectivamente, com a variação do volume dos pulsos injetados de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por amostragem binária.

A partir das Figuras 25 e 26 observa-se que o sinal diminui com o aumento do volume dos pulsos de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato até que a partir de um certo volume de solução do complexante, em torno de  $19 \mu\text{L}$ , o sinal permanece constante com o aumento do volume de solução de oxalato. Isso evidencia que a partir de um certo volume de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato, que praticamente todo zinco injetado foi complexado pelo oxalato, já que os valores dos sinais de absorbância após a estabilização aproxima-se de zero, o que indica haver zinco imobilizado na fase sólida.



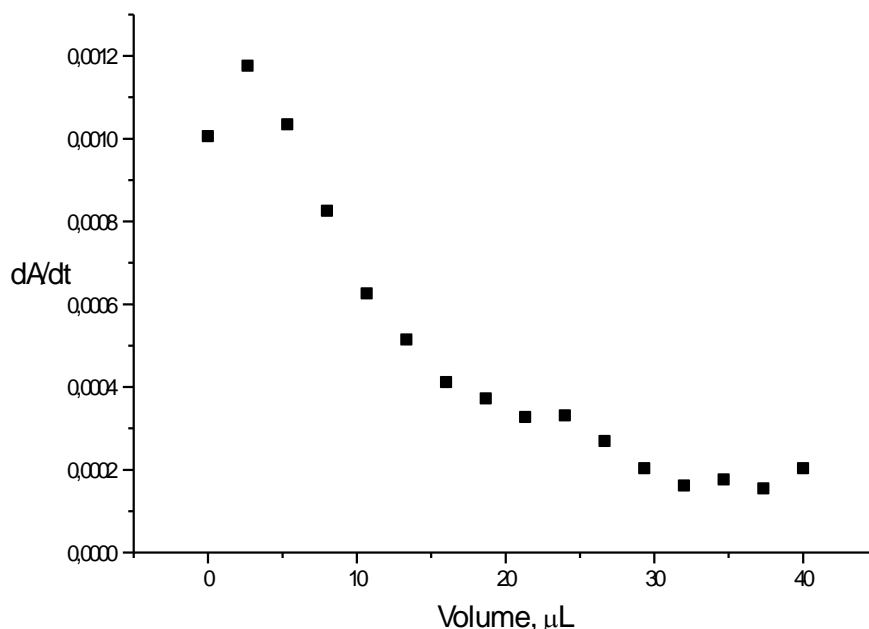
**Figura 25.** Variação do sinal máximo, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.



**Figura 26.** Variação da absorbância na região de patamar, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.

Nas derivadas ilustradas nas curvas da Figura 24, observa-se que a altura dos picos diminui com o aumento de volume dos pulsos da solução de oxalato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , sendo que a queda dos valores das derivadas após atingir o máximo ocorre de forma mais rápida e abrupta. Além disso observou-se que os máximos das derivadas ocorrem após intervalos de tempo mais curtos quando introduziu-se o complexante. Esses dados mostram que, conforme aumenta-se o volume desta solução de oxalato, diminui-se a quantidade de zinco imobilizado na fase sólida por unidade de tempo, fato evidenciado pela diminuição do máximo das derivadas. A Figura 27 ilustra a

variação do máximo das derivadas, ilustradas na Figura 24, com aumento do volume de solução de oxalato injetado.

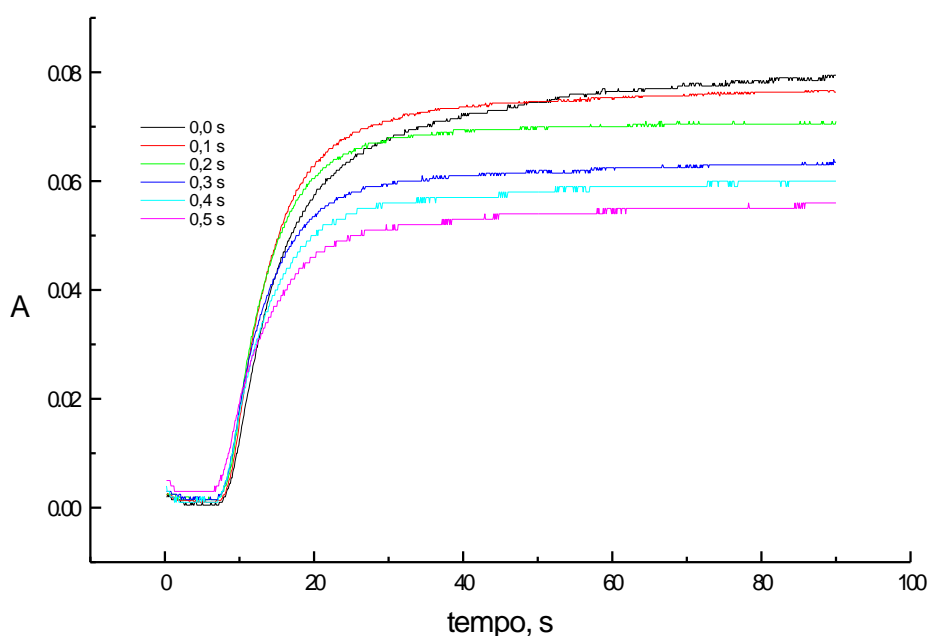


**Figura 27.** Variação do máximo da derivada do sinal obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.

A curva da Figura 27 confirma as considerações feitas anteriormente, tendo esse gráfico aspecto semelhante ao mostrado nas Figuras 25 e 26, exceto pelo primeiro ponto onde não é feita injeção de solução de oxalato onde o valor da derivada é baixo em relação aos demais pontos desse gráfico. A presença de solução de oxalato nos pulsos injetados sob amostragem binária gera uma leve mudança no formato de crescimento dos sinais até alcançar o máximo (Figura 23), justificando a disparidade do primeiro ponto da curva na Figura 27.

Outra série de experimentos foram realizados no estudo da reação com o zinco e oxalato misturados em linha por amostragem binária por FI-EFS substituindo a solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato por uma solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  do mesmo complexante.

As curvas da Figura 29 ilustram os sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de  $40 \text{ }\mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio.

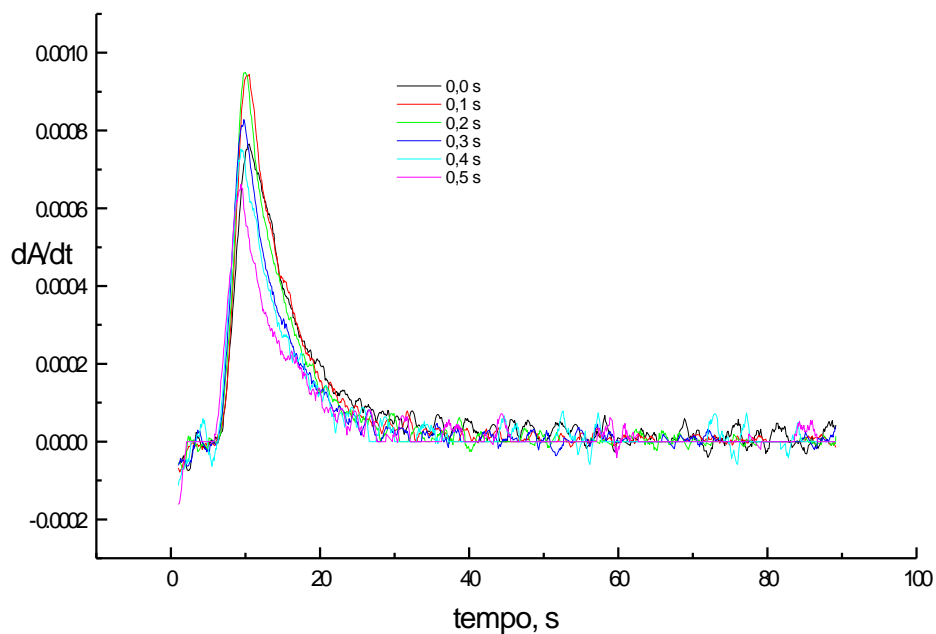


**Figura 29.** Sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de  $40 \text{ }\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de  $1,5 \text{ s}$ ) de solução de zinco  $10,00 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.

Pelo que observou-se nas curvas da Figura 29, as condições de reação para solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio enquadram-se no caso (b),

onde é formado o complexo entre o zinco e oxalato em linha, sendo que este complexo não é desfeito, em quantidade significativa, ao atravessar a fase sólida e o oxalato não remove o zinco livre, presente no primeiro pulso, imobilizado na fase sólida. O enquadramento das condições de reação para solução de oxalato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  no caso (b) baseia-se na observação dos gráficos da Figura 29 na qual não há decréscimo nos sinais transientes, evidenciando que não há remoção pelo oxalato de zinco imobilizado por TAN- $C_{18}$ , havendo todavia, a diminuição dos sinais obtidos na região de patamar ocasionada pela complexação de parte do zinco pelo oxalato.

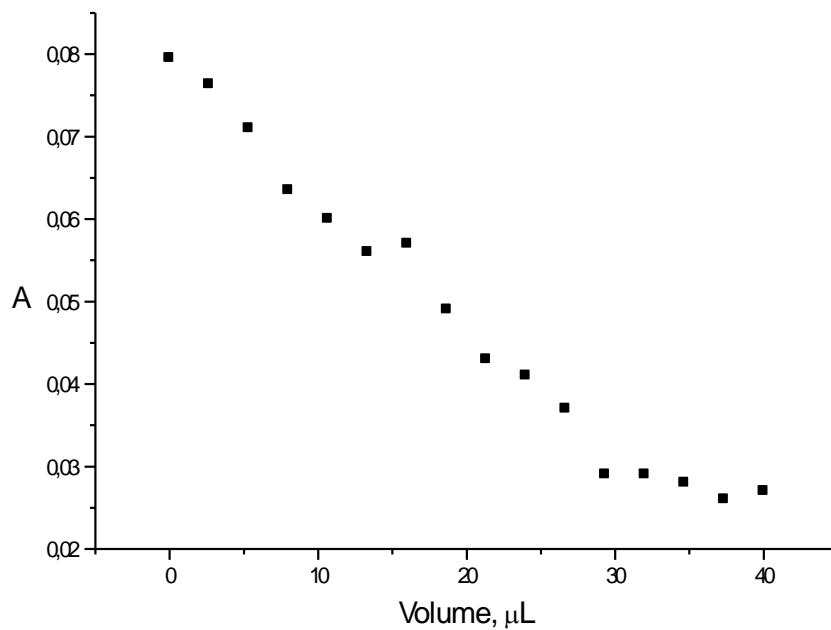
A Figura 30 mostra os gráficos das derivadas dos sinais transientes exibidos na Figura 29. Os perfis das derivadas ilustradas na Figura 30 confirmam o fato que para o uso de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato não ocorre a remoção de zinco como ocorre com a solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato.



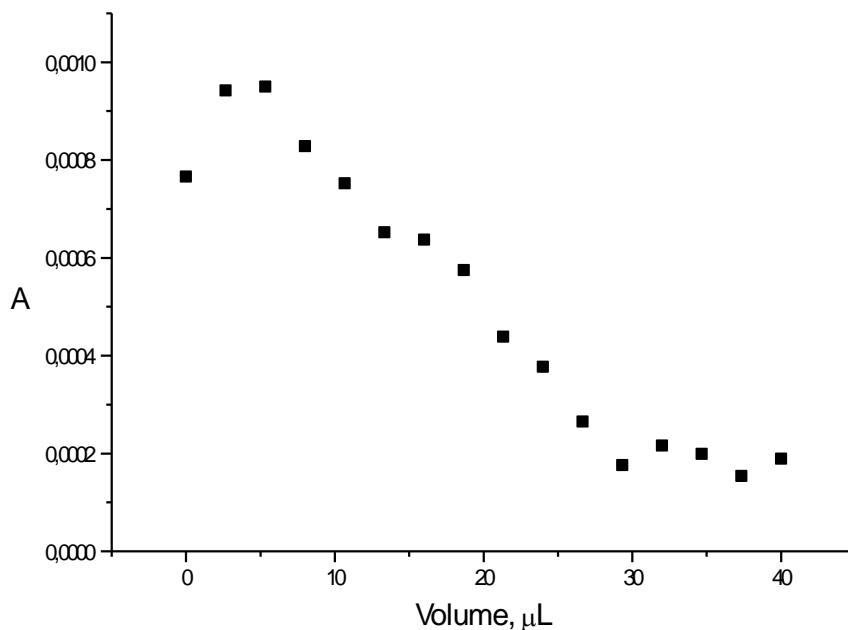
**Figura 30.** Derivadas dos sinais transientes obtidos pela injeção sob amostragem binária de 3 pulsos de  $40 \mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio. O tempo de abertura da válvula do oxalato está ilustrado na legenda.

A Figura 31 e 32 ilustram a variação dos sinais de absorbância na região de patamar e dos valores das derivadas, respectivamente, obtida pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de  $40 \mu\text{L}$  de solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio com a variação de volume dos pulsos da solução de oxalato injetados.





**Figura 31.** Variação da absorbância na região de patamar, obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40 µL (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco 10,00 µg mL<sup>-1</sup> e 3 pulsos de solução 0,01 mol L<sup>-1</sup> de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.



**Figura 32.** Variação do máximo da derivada do sinal obtido pela injeção por amostragem binária de 3 pulsos de 40  $\mu\text{L}$  (tempo de abertura da válvula de 1,5 s) da solução de zinco  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 3 pulsos de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato de potássio, com a variação do volume dos pulsos de solução de oxalato injetados.

Segundo a curva da Figura 31 os sinais de absorvância caem linearmente com o aumento do volume dos pulsos de solução de oxalato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  injetados, até que a partir de um certo volume de solução do complexante, em torno de  $29 \mu\text{L}$ , os sinais se estabilizam não variando com o aumento do volume de solução de oxalato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . A partir desse dado pode-se afirmar que após  $29 \mu\text{L}$  de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato, a quantidade máxima de oxalato que consegue penetrar nos pulsos de zinco durante o percurso analítico não é suficiente para complexar todo o zinco presente nesses pulsos, já que volumes maiores de solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de

oxalato não acarreta em significativa diminuição do sinal, que permanece constante num valor diferente de zero. Então pode-se concluir que nessas condições reacionais houve um excesso de zinco que não foi complexado pela quantidade máxima de oxalato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  que conseguiu penetrar nos pulsos de zinco durante o percurso analítico. O grau de mistura entre os pulsos de zinco e oxalato depende da relação entre o volume dos pulsos destas soluções e do comprimento do percurso analítico, sendo que existe uma quantidade máxima de oxalato da solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  que consegue penetrar nos pulsos de zinco e a partir desse limite o aumento de volume de solução do complexante não acarreta em variações no sinal analítico. A curva da Figura 32 possui aspectos semelhante ao da Figura 31, levando em conta a discrepância do primeiro ponto da curva da Figura 32 ocasionada pela diferença entre o crescimento dos sinais transientes na presença e na ausência de injeção da solução de oxalato.

### **V.2.3 - Conclusão**

Na avaliação da reação entre oxalato de potássio e zinco inseridos sob amostragem binária, com detecção por EFS, pôde-se observar que para concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de oxalato, este reagente além de complexar parte de zinco ,em linha, remove parte do zinco que fica retido na fase sólida.

Para concentração de oxalato de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  os resultados demonstraram que houve a complexação de parte de zinco pelo oxalato, em linha, não ocorrendo remoção do zinco retido na fase sólida pelo oxalato. Nos estudos realizados com essas duas concentrações de soluções de oxalato, o

sinal analítico diminui ao aumentar-se o volume dos pulsos de solução de oxalato inserido até que a partir de um certo volume os sinais permanecem constantes com o aumento do volume de solução complexante.

A partir dos dados obtidos no estudo da reação do oxalato com zinco inseridos sob multicomutação observou-se indícios da possibilidade de realização de titulação, em linha, de zinco com um complexante com detecção pelo sistema FI-EFS, sendo que o ponto final da titulação relaciona-se com o volume de titulação necessária para iniciar a estabilização do sinal analítico em valor próximo a zero, evidenciando que todo analito foi totalmente mascarado pelo complexante. Para isso, seria necessária a otimização das condições da mistura analito-reagente e a concentração do complexante deveria ser suficiente para que ao final da titulação todo zinco ficasse mascarado sem que o complexante removesse o zinco retido na fase sólida, com a reação do complexante ocorrendo somente em linha. Essa possibilidade será objeto para investigações futuras.

## VI – APLICAÇÕES DE MÉTODOS MATEMÁTICOS EM SISTEMAS FIA

A aplicação de métodos matemáticos em sistemas FIA com detecção espectrofotométrica inicia-se com o simples procedimento de subtração do sinal do branco ou aquele referente à linha de base. Por outro lado, uma série de artifícios matemáticos sofisticados têm sido aplicados na determinação de várias espécies em diferentes matrizes empregando sistemas FIA.

Entre as aplicações de modelos matemáticos explorando o gradiente de concentração em sistemas FIA destacam-se os modelos aplicados às pseudo-titulações em fluxo [78,79].

Análises titrimétricas em fluxo também foram desenvolvidas empregando lógica formal matemática para encontrar o ponto estequiométrico, como o método da procura binária [80].

Foram também desenvolvidos modelos matemáticos empregando o método da adição padrão na análise de espécies químicas em sistemas FIA, minimizando os efeitos de matriz [81,82].

A espectrofotometria derivativa foi outra técnica matemática aplicada na análise por injeção em fluxo para determinação simultânea de várias espécies ou objetivando aumentar a sensibilidade e seletividade [83, 84].

As técnicas de calibração multivariada também estão sendo usadas cada vez mais nas análises por injeção em fluxo, principalmente na análise de

amostras extremamente complexas como as de origem biológica e alimentos [85,86].

Na espectrofotometria em fase sólida acoplada à sistema FIA ainda não foram desenvolvidos modelos matemáticos que explorem os gradientes de concentração e o caráter cumulativo desses sistemas, sendo esta a base dos trabalhos que serão apresentados nos próximos capítulos.

## **VII. DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EMPREGANDO PADRÃO ÚNICO EM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA**

A automação se desenvolveu em química analítica como uma forma de facilitar os procedimentos analíticos. Dentre os principais objetivos da automação analítica vale destacar:

- Processamento de um grande número de amostra e aumento da velocidade analítica;
- Redução da participação humana, o que diminui os riscos, erros e custos da análise;
- Minimização do consumo e descarte de amostras, padrões e reagentes.

Nos sistemas automáticos com detecção espectrofotométrica deseja-se que a automação abranja o máximo de etapas da análise que envolve: a amostragem, abertura da amostra, tratamentos prévios, preparação de soluções padrão, mistura dos padrões e amostras com os reagentes adequados, aquisição dos sinais analíticos, construção de curva de calibração e cálculos das concentrações dos analitos nas amostras.

Os sistemas FIA mais comumente empregados permitem a automação da tomada de alíquotas das soluções padrão, e amostras e, misturas das mesmas com alíquotas dos reagentes apropriados e aquisição dos sinais analíticos relativos aos padrões e amostras, cálculo dos parâmetros da curva de calibração e cálculo da concentração do analito nas amostras [10,55,65].

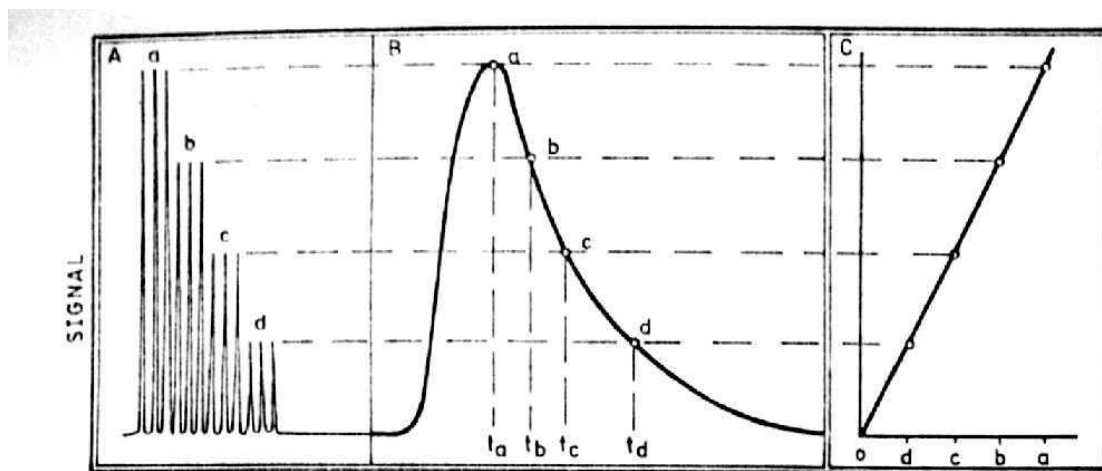
Uma série de trabalhos foram desenvolvidos envolvendo a dissolução e pré- tratamento de amostras em sistemas FIA, principalmente envolvendo uso de fornos de microondas, sendo que em alguns casos a amostra dissolvida é recolhida e então levada para o sistema FIA (dissolução off-line) [87,87] e em outros a amostra é dissolvida em linha (dissolução on-line) [88-91]. Todavia, na maioria das análises empregando sistemas FIA, a etapa da abertura da amostra é feita em batelada, necessitando de longos intervalos de tempo para ser realizado. Com isso a velocidade da análise, como um todo, torna-se relativamente baixa.

A preparação automática das soluções padrões em linha nos sistemas de análise por injeção em fluxo utilizando uma única solução de referência ainda não é o amplamente utilizada. Normalmente uma série de soluções padrões do analito são preparadas manualmente para construção das curvas analíticas, sendo que o sistema FIA automatiza apenas a tarefa de introdução das alíquotas das soluções padrão e dos reagentes, transportando-as para o detetor, onde ocorre a aquisição dos sinais analíticos.

A grande maioria dos trabalhos envolvendo a construção de curva de calibração utilizando um padrão único nos sistemas FIA envolvem a exploração do gradiente de concentração formado devido a dispersão da solução do analito injetado no percurso analítico [55,65].



Uma das primeiras tentativas de construção de curva de calibração em FIA empregando um padrão único, foi realizada por Ruzicka e cols [92,93]. Nesse trabalho estabeleceu-se empiricamente a relação entre o sinal analítico em um determinado tempo, na segunda porção do pico FIA, com a concentração do analito. A Figura 33 ilustra o procedimento da construção de curva de calibração empregando uma única solução de referência, explorando a técnica de gradiente de concentração em FIA.



**Figura 33.** Técnica de calibração por gradiente (A) calibração com quatro soluções padrão de concentrações decrescentes (a-d) injetadas em triplicata, (B) perfil do pico FIA para a solução padrão de concentração mais elevada, (C) curva de calibração preparada a partir de (B) e relacionada com os sinais nos intervalos de tempo  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ , e  $t_d$ . [92].

Nesse procedimento, ilustrado na Figura 33, inicialmente são injetadas, em triplicata quatro soluções padrões com concentrações decrescentes (a-d) e então relaciona-se as alturas dos picos relativa as diferentes soluções padrão, com os intervalos de tempo onde as alturas dos sinais no segundo ramo do pico FIA, obtido pela injeção do padrão mais concentrado são iguais àquele dos picos dos diferentes padrões. Dessa forma identifica-se os tempos  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ ,

e  $t_d$  (Figura 33 ) no pico FIA de soluções mais concentradas onde os sinais são correspondentes as concentrações dos diferentes padrões (a-d). Então, após um grande número de determinações uma única injeção da solução padrão mais concentrada basta para obter uma nova curva de calibração com diversos pontos, sendo necessário um pequeno intervalo de tempo para construção dessa nova curva (20s-30s).

Os princípios dos trabalhos de Ruzicka e cols [92,93] para construção de curva de calibração em FIA com apenas uma injeção da solução do padrão único também podem ser aplicados para construção de curvas de calibração empregando a técnica da amostragem de frações da zona da amostra (sampling zone) ou reamostragem, empregando uma única solução de referência. Essa possibilidade existe uma vez que a técnica de reamostragem [94], que é amplamente empregada na diluição controlada das soluções amostra para que as concentrações das mesmas se enquadrem na faixa analítica e os efeitos de matriz sejam minimizados [94-97], pode produzir em diversas injeções de frações da zona da amostra uma série de picos cujas alturas relacionam-se com a concentração dessas frações de zona de amostra. Dessa forma o processo de calibração empregado por Ruzicka e cols [92,93] seria o mesmo, só que ao invés de relacionar as alturas dos picos das soluções padrões com os intervalos de tempo de uma única injeção do padrão mais concentrado, relaciona-se as altura dos picos referentes as diferentes soluções padrões com os picos das frações da zona da solução padrão mais concentrada [98]. Todavia, o emprego da técnica de reamostragem ter sido restrito ao processo de diluição controlada.

Outro trabalho de construção de curva de calibração em FIA empregando uma única solução de referência foi realizado por Araújo e cols [99] empregando a técnica de adição padrão.

Esse sistema baseia-se no aumento do grau de dispersão da solução de padrão único injetada conforme diminui-se o volume desta solução injetada, realizada pela diminuição do comprimento da alça de amostragem do padrão único. Conforme diminui-se o comprimento da alça de amostragem menor a altura dos picos FIA correspondente, sendo então construída uma curva de calibração a partir da inserção de diferentes alíquotas do padrão único. O outro passo do processo é a inserção das mesmas alíquotas do padrão único com a solução-amostra sendo adicionada continuamente por confluência. Então a partir desses dados a concentração da amostra é calculada, submetidas ao processo de adição padrão em linha empregando uma única solução de referência, são calculadas.

Alternativas diferentes para construção da curva de calibração em sistema FIA empregando uma única solução de referência basearam-se na exploração dos gradientes de concentração, propiciados no sistema FIA, a utilização dos sinais transientes dos picos FIA. Um trabalho realizado por Zagatto e cols [100] envolve a exploração dos gradientes de concentração para construção da curva de adição padrão empregando uma única solução de referência. Trabalho explorando os gradientes de concentração de maneira semelhante ao realizado por Zagatto e cols [100] foi realizado por Araújo e cols [101] empregando o Método Generalizado de Adição Padrão para determinação simultânea de K, Ca e Na por espectrofotometria de absorção atômica em chama.

Vale ainda destacar o trabalho realizado por Honorato e cols [102], no qual foi desenvolvido um sistema FIA que explora os gradientes de concentração com metodologia que os propicie o cálculo da concentração do analito nas amostras empregando uma única solução de referência. Nesse trabalho não foi utilizada a adição de padrão às amostras por confluência, sendo realizada a calibração dos gradientes de concentração por metodologia de calibração não linear dos sinais transientes obtidos pela injeção de uma solução padrão em função dos sinais obtidos pela injeção de um corante ( $\text{KMnO}_4$ ). Após a calibração dos gradientes de concentração da solução padrão pode-se calcular a concentração do analito nas amostras empregando apenas sinais obtidos a partir da injeção da solução do corante. A escolha de uma solução de corante para calibração foi conveniente pois a coloração da mistura entre o reagente e solução padrão é relativamente instável o que dificultaria o processo de recalibração, que é facilmente realizado empregando a solução do corante.

Todos os trabalhos citados de construção de curva de calibração em sistemas de análise por injeção em fluxo empregando uma única solução de referência tem como base a diluição controlada, em linha, da solução do padrão único devido a fenômeno de dispersão.

O presente trabalho objetiva a construção de curvas de calibração, em sistema FIA, empregando uma única solução de referência tendo como base a concentração controlada da solução de referência existente no sistema de análise em fluxo acoplado a detecção por espectrofotometria em Fase Sólida.

O trabalho divide-se em duas etapas distintas:

- (1) Desenvolvimento de sistema FI-EFS e metodologias analíticas para construção de curvas de calibração obtidas pelo emprego de injeções seqüenciais de solução do padrão único para determinação de zinco;
- (2) Desenvolvimento de sistema FI-EFS e metodologias analíticas para construção de curva de calibração utilizando os sinais transientes obtidos por uma injeção da solução do padrão único.

### **VII.1 – Estudos Preliminares**

Em espectrofotometria em fase sólida (EFS) o valor de absorbância registrado depende da absorvidade do complexo do analito com o reagente em fase sólida, do caminho ótico, da concentração do analito na solução amostra, do volume da solução do analito posta em contato com a fase sólida.

Em EFS a absorbância, registrada pela medida de atenuação da radiação quando a fase sólida contendo o complexo do analito imobilizado com o reagente cromogênico é posicionado no caminho ótico, depende de uma série de parâmetros, sendo que a Equação 17 descrita no capítulo II descreve a dependência da absorbância com uma série de parâmetros.

$$A_{fs} = a_{fs} b_{fs} \frac{C_o V_{aq}}{\frac{D}{d_{fs}} + \frac{m_{fs}}{d_{fs}}} \quad (17)$$

Quando o valor da razão de distribuição é muito maior que o volume da solução de analito posto em contato com a fase sólida o valor da absorbância da fase sólida é dada pela Equação 18 descrita anteriormente:

$$A_{fs} = a_{fs} b_{fs} C_o V_{aq} \frac{m_{fs}}{d_{fs}} \quad (18)$$

Mantendo-se o caminho óptico e a massa da fase sólida constantes pode-se representar a Equação 18 da seguinte forma:

$$A_{fs} = K_{fs} \cdot C_o V_{aq} \quad (19)$$

onde  $K_{fs}$  é uma constante que engloba a absorvidade do complexo do analito imobilizado na fase sólida, de caminho ótico da fase sólida, a massa e a densidade da fase sólida.

A Equação 19 evidencia que há uma relação linear entre a absorbância e o volume de solução do analito que entra em contato com a fase sólida, dentro da faixa onde o volume de solução de analito é muito menor que a razão de distribuição, para uma mesma concentração da solução do analito.

Nesses estudos preliminares foi averiguada a dependência linear entre o volume total de solução de zinco e o sinal analítico obtido no sistema FI-EFS.

### ***VII.1.1 - Procedimentos - Experimental***

Todas as soluções foram preparadas empregando reagentes de grau analítico, usando água destilada e desionizada. Uma solução de referência de zinco  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada pela diluição de uma solução estoque de concentração  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo o pH desta solução fixado em 6,2 pela adição de solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de hexamina. O pH das soluções tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina foi ajustado para 6,2 com ácido clorídrico. A solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição apropriada da solução concentrada.

Empregou-se o sistema FI-EFS descrito anteriormente (Figura 4) utilizando um percurso analítico de 60 cm de comprimento. Todas as injeções das soluções de zinco foram realizadas em sincronia com a bomba peristáltica.

Utilizou-se como carregador solução tampão  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina ( $\text{pH} = 6,2$ ) e água destilada e desionizada nos estudos realizados.

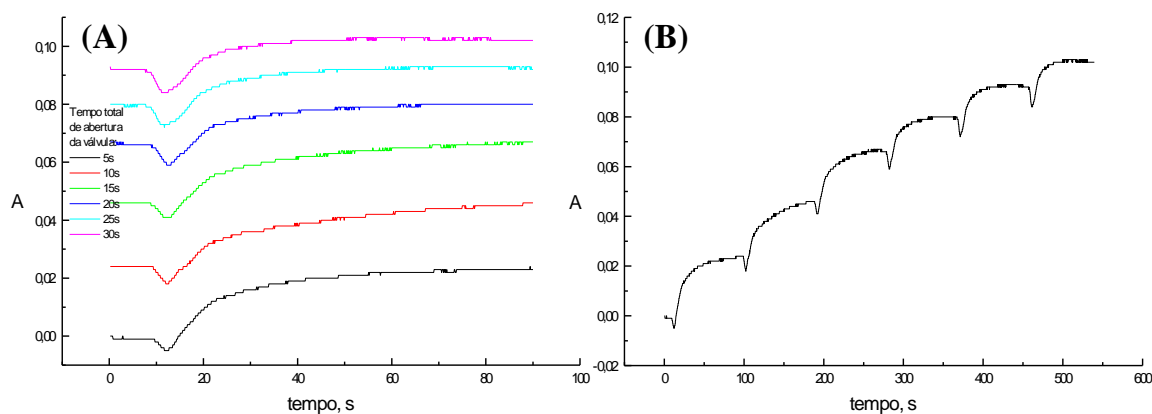
### **VII.1.2 - Resultados e Discussão**

Foram realizados estudos preliminares para constatar a relação entre a absorvância e o volume de amostra injetado. Inicialmente utilizou-se cela de fluxo para o sistema FI-EFS com  $78,5 \text{ mm}^2$  de área contendo fase sólida (orifício circular de 10mm de diâmetro), vazão de  $1,6 \text{ ml min}^{-1}$  (com rotação da bomba peristáltica ajustada em 9 RPM) e empregou-se solução tampão  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de hexamina ajustada em  $\text{pH} 6,2$ .

A partir do pressuposto que após  $n$  injeções sem a realização de eluição de alíquotas da solução-amostra de volume  $V$ , o sinal obtido corresponde ao sinal que seria obtido por uma única injeção da solução-amostra com volume  $n \cdot V$ , realizou-se os experimentos efetuando uma série de injeções seqüenciais das soluções de zinco relacionando-se o sinal obtido após cada injeção com volume total de solução amostra injetada.

Uma vez que a, uma dada vazão, o volume de solução de zinco é proporcional ao intervalo de tempo de abertura da válvula responsável pela injeção da solução-amostra relacionou-se os sinais analíticos obtidos após cada uma das injeções realizadas seqüencialmente, sem eluição, com o tempo total de abertura da válvula da amostra.

A Figura 33 mostra os perfis dos sinais transientes após 6 injeções de uma solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com tempo de cada abertura da válvula da amostra fixado em 5 s ( $133 \mu\text{L}$ ) com vazão ajustada em  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ .



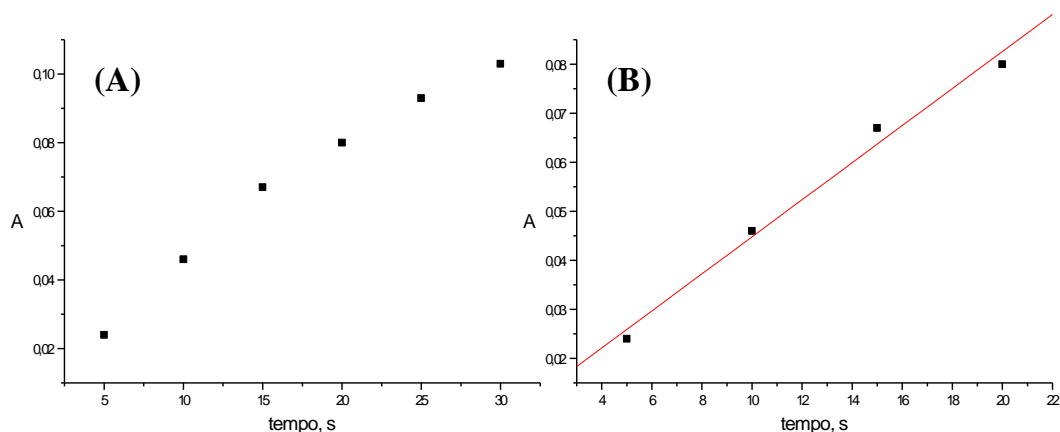
**Figura 33.** Perfis dos sinais transientes obtidos a partir de 6 injeções sequenciais de 5 s de abertura de válvula ( $133 \mu\text{L}$ ) de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco relacionado com o tempo total de abertura da válvula da solução-amostra (A) e o FI Agrama obtido nas mesmas condições (B).

A curva ilustrada na Figura 33b mostra uma seqüência de patamares tendo em conjunto um aspecto semelhante a uma “escada” onde cada patamar representa um “degrau”. Essa curva mostra uma série de patamares com o mesmo formato e alturas semelhantes, sendo que a relação entre o valor de absorbância máxima de cada patamar e o tempo total de abertura da válvula da amostra está ilustrado na Figura 34.

A queda inicial do sinal ilustrado nas curvas da Figura 33a provavelmente está relacionada com os gradientes de concentração do pulso da solução de zinco, sendo o analito retido na fase sólida, levando a ocorrência do efeito Schlieren, que ocorre devido as alterações no índice de refração



causadas pela formação de gradiente de concentração [103]. Todavia, esse efeito não afeta significativamente os resultados.



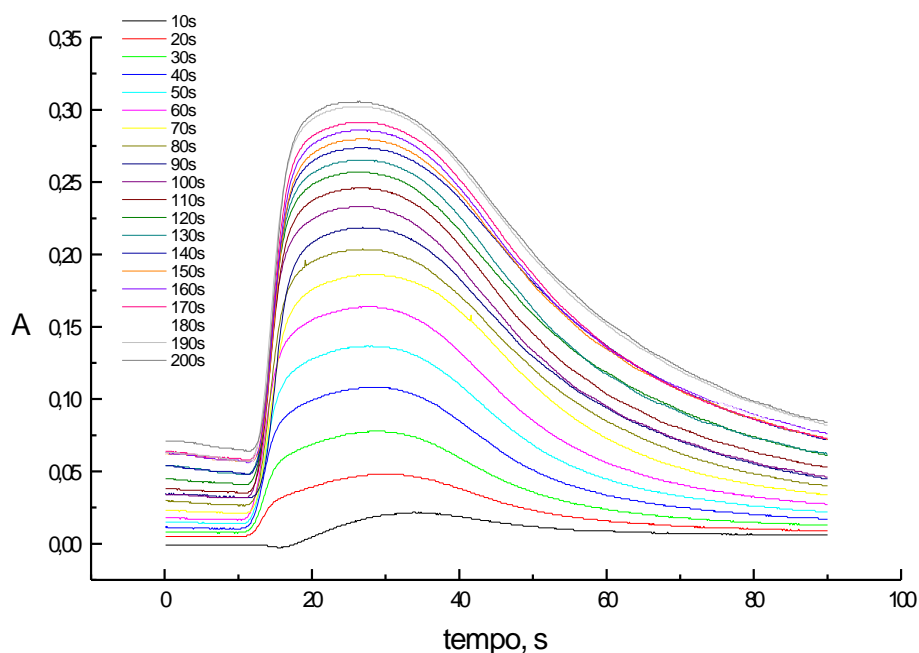
**Figura 34.** Valores de absorbância, obtidos após injeções seqüenciais de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo de abertura das válvulas de 5 s ( $133 \mu\text{L}$ ), versus tempo total de abertura de válvula da amostra (A) plotando-se todos os pontos obtidos e (B) plotando-se os pontos relativos a região linear do gráfico.

A curva na Figura 34A mostra que dentro de uma certa faixa há uma relação linear entre a absorbância e o tempo total de abertura da válvula da solução amostra, sendo que a curva na Figura 34B ilustra a região linear obtendo uma equação do tipo  $A = (0,00378 \pm 0,0003) \cdot t + (0,01398 \pm 0,00473)$  com coeficiente de correlação linear elevado ( $R = 0,99871$ ).

Apesar dos resultados obtidos utilizando solução tampão  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina com pH 6,2 concordarem satisfatoriamente com os pressupostos de relação linear entre a absorbância e o tempo total de abertura da válvula contendo solução de zinco, o uso desta solução como carregador pode não ser a melhor alternativa. Isso se deve ao fato que, além da utilização de

grandes quantidades desse reagente (cerca de 500 mL por dia de análise), esta solução apresentou a formação de pequenas partículas sólidas que poderiam penetrar na cela de fluxo causando alterações nos resultados além do aumento na impedância hidrodinâmica do sistema em fluxo. Uma alternativa para o uso desta solução tampão como carregador é a preparação diária desta solução, sendo outra possibilidade a filtração da solução estoque de tampão antes da utilização e conservação sob refrigeração. Então conclui-se que as alternativas para uso desta solução tampão como carregadora, aumentam o tempo de análise e a possibilidade de erros experimentais e contaminações, sendo isto o que deseja-se minimizar no sistema FI-EFS automatizado desenvolvido no presente trabalho. Decidiu-se então pelo emprego de água destilada e desionizada como solução carregadora em todos os experimentos subsequentes desta dissertação.

Realizou-se experimentos de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco empregado em cada injeção e o número total de injeções seqüenciais. A Figura 35 mostra o perfil dos sinais transientes obtidos com a realização de 20 injeções seqüenciais de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com tempo de abertura da válvula da amostra a cada injeção fixado em 10 s ( $267 \mu\text{L}$ ). Deve-se destacar que as injeções seqüenciais não foram realizadas com a eluição do zinco pela passagem de solução ácida.



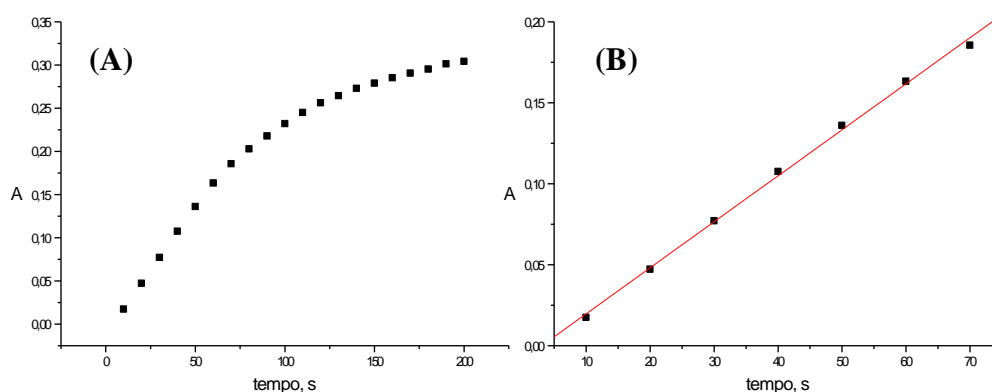
**Figura 35.** Perfis dos sinais transientes obtidos a partir de 20 injeções seqüenciais de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco, com 10 s de cada abertura da válvula da amostra ( $267 \mu\text{L}$ ) relacionados com o tempo total de abertura da válvula da amostra utilizando-se água destilada e desionizada como carregadora.

As curvas da Figura 35 apresenta uma série de gráficos com perfis diferentes daqueles obtidos de maneira semelhante empregando solução carregadora de hexamina com pH ajustado em 6,2. Nos perfis dos patamares obtidos por injeção de solução de zinco, utilizando solução tampão como carregador, o sinal inicialmente cresce e, depois de um certo intervalo de tempo, os valores de absorvância permanecem constantes com a variação do tempo. Os perfis dos gráficos mostrados na Figura 35 mostram que o sinal inicialmente cresce, se estabilizando por um certo intervalo de tempo e depois passam a decrescer com o tempo. Esse efeito é explicado pela variação de pH

causada pela passagem da solução carregadora ( $H_2O$ ) que se encontrava com pH em torno de 5,0 enquanto o pH das soluções de zinco foi tamponado em 6,2. Com essa variação de pH provocados pela passagem de carregador ocorre uma variação na coloração do complexo formado entre o zinco e o TAN- $C_{18}$ , já que experimentos realizados em condições semelhantes demonstraram que não ocorreu variação significativa da absorção do complexo Zn-TAN retido em  $C_{18}$  medido por FI-EFS numa faixa de pH entre 5,8 até 6,7 [53].

Os resultados exibidos na Figura 35 mostram que apesar da passagem do carregador pela cela, após a injeção de alíquota de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco, acarretar na diminuição da absorção do complexo, o zinco não é removido da fase sólida pelo carregador sendo isso evidenciado pelo fato que após outras injeções, sem realização de eluição em ácido de zinco imobilizado anteriormente, o sinal máximo aumenta linearmente com o volume total injetado pelo condicionamento do pH reacional que ocorre com a passagem de nova alíquota de solução de zinco com pH ajustado em 6,2.

A Figura 36 mostra a variação do valor máximo de absorbância obtido pela injeção seqüencial de solução de zinco  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com intervalo de tempo de cada abertura de válvula da amostra de 10s ( $267 \mu\text{L}$ ) em função do tempo total da abertura da válvula da amostra.

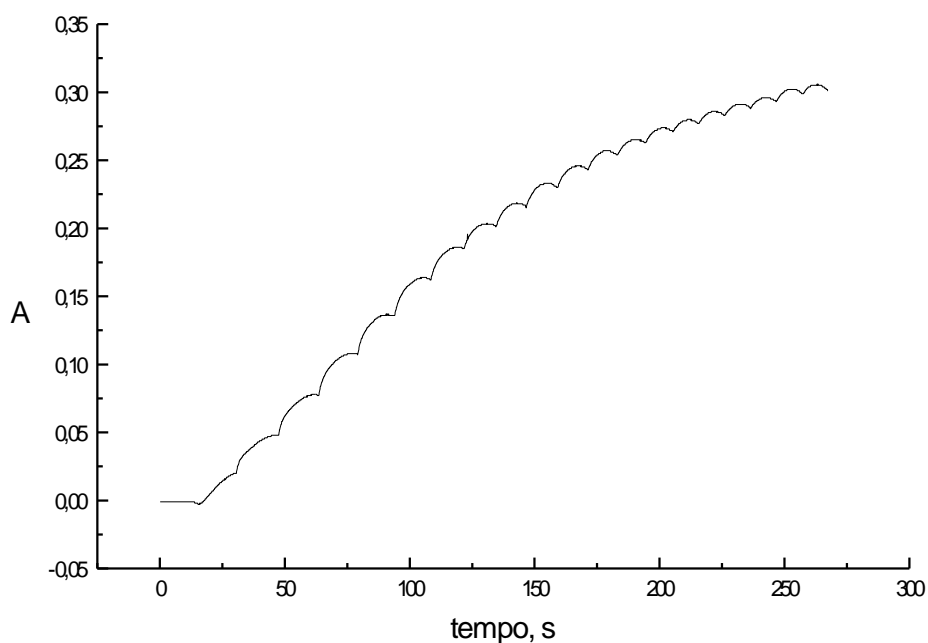


**Figura 36.** Valores máximos de absorvância obtido, após injeções seqüenciais de solução  $1,00\mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo de abertura da válvula da amostra para cada injeção de 10 s ( $267\mu\text{L}$ ), versus o tempo total de abertura da válvula da amostra (A) plotando-se todos os pontos obtidos e (B) plotando-se os pontos referentes a região linear do gráfico.

As curvas da Figura 36 demonstram que mesmo empregando-se água destilada e desionizada com pH em torno de 5,0 como carregador existe uma região onde a absorvância varia linearmente em função do volume total de solução de zinco injetada, sendo que ocorre a perda da linearidade para intervalos de tempo de abertura da válvula superiores a 70 s ( $18671\ \mu\text{L}$ ). A Equação da reta obtida na curva da Figura 36B é do tipo  $A=(0,00284\pm 0,0006)\cdot t-(0,0087\pm 0,00251)$  com coeficiente de correlação linear dada por  $R=0,99903$ .

A curva da Figura 37 mostra um FIograma obtido com os mesmos experimentos realizados para obtenção da Figura 38, sendo que a cada injeção foi feito o registro dos sinais transientes até ser alcançado o intervalo de tempo necessário para chegar ao sinal máximo do patamar e então interrompe-se o registro dos sinais e aguarda-se 60 s para que a próxima injeção seja realizada e o registro dos sinais transientes seja reiniciado. Com esse procedimento

exclui-se os sinais transientes correspondentes aos trechos onde ocorre a queda do sinal.



**Figura 37.** FIagrama obtido pelo registro dos sinais transientes da região de patamar obtido após injeções sequenciais de solução  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zinco com intervalo de tempo da abertura da válvula de 10 s ( $267 \mu\text{L}$ ).

A curva da Figura 37 tem aspecto semelhante ao de uma “escada” sendo os “degraus” os diferentes patamares obtidos e o sinal na região do patamar varia linearmente conforme são realizadas as injeções sequenciais de solução de zinco.

### **VII.1.3 - Conclusões**

Há uma região onde o sinal analítico obtido no sistema FI-EFS varia linearmente em função do tempo total de abertura da válvula da solução de zinco.

O uso de água destilada e desionizada como carregador modifica o perfil dos sinais transientes, porém ainda são preservadas as propriedades cumulativas do sistema FI-EFS e a linearidade do sinal analítico com o volume total de solução do analito injetada, podendo ser empregada nas metodologias analíticas para construção de curva de calibração por padrão único a serem apresentadas.

## **VII.2 – Desenvolvimento de Sistema FI-EFS para Construção de Curvas Analíticas Obtidas pelo Emprego de Injeções Seqüenciais do Padrão Único para Determinação de Zinco**

Em espectrofotometria em fase sólida, quando mantém-se constante o caminho ótico, a massa de fase sólida empregada e o volume de solução do analito é suficientemente pequeno, a absorbância da fase sólida é dada pela equação 19:

$$A_{fs} = K_{fs} C_0 V_{aq} \quad (19)$$

onde  $A_{fs}$  é a absorvância do complexo com o analito retido na fase sólida,  $K_{fs}$  é uma constante de proporcionalidade relacionada com a absorvância do complexo em fase sólida, com a massa de fase sólida e com a razão de distribuição do analito na fase sólida,  $C_0$  é a concentração do analito em solução antes de ser posta em contato com a fase sólida e  $V_{aq}$  é o volume dessa solução do analito.

No sistema FI-EFS proposto o volume de solução do analito injetada depende da vazão e do tempo de abertura da válvula adequada, tendo:

$$A_{fs} = K'_{fs} C_0 \phi t \quad (20)$$

e englobando a vazão na constante:

$$A_{fs} = K''_{fs} C_0 t \quad (21)$$

Caso sejam realizadas injeções consecutivas, sem realizar eluições entre elas, de uma solução padrão do analito de uma concentração qualquer, absorvância será diretamente proporcional ao tempo total (ou cumulativo) de abertura da válvula do analito:

$$A_p = \beta_p t \quad (22)$$

onde  $A_p$  é a absorção do padrão e  $\beta_p$  é uma constante de proporcionalidade para esse padrão que pode ser obtida por regressão linear de  $A_p$  x  $t$ . Realizando o mesmo processo para uma solução-amostra tem-se:

$$A_a = \beta_a t \quad (23)$$

onde  $A_a$  é a absorção da amostra e  $\beta_a$  é uma constante de proporcionalidade para essa amostra obtida por regressão linear assim como realizado para o padrão. Sabendo-se que  $\beta_a = K''_{fs} C_a$  e  $\beta_p = K''_{fs} C_p$ , onde  $C_p$  e  $C_a$  são as



concentrações do padrão e da solução amostra, respectivamente, pode-se calcular a concentração da amostra empregando um único padrão através de:

$$C_a = \frac{\beta_a}{\beta_p} C_p \quad (24)$$

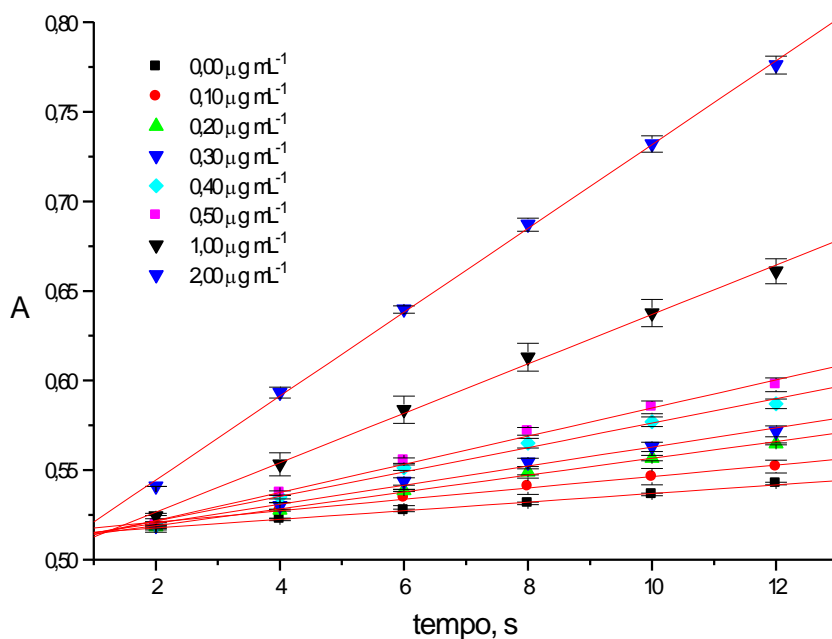
### ***VII.2.1 – Procedimento - Experimental***

Foram preparadas soluções de amostras sintéticas de zinco com concentração entre 0,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Uma solução do padrão único de zinco com concentração 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada. O pH de todas soluções do analito foi ajustado para 6,2 com solução tampão hexamina 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . Foi utilizada água destilada e desionizada como carregador. Empregou-se um sistema FI-EFS descrito no capítulo IV (Figura 4), sendo um software escrito em QuickBasic 4.5 foi desenvolvido para o controle do sistema FI-EFS, aquisição dos dados do espectrofotômetro e realização dos cálculos.

Inicialmente foi construída uma curva de absorbância versus tempo total de abertura da válvula do padrão e do branco, sendo os coeficientes angulares dessas curvas utilizado para os cálculos da concentração de zinco nas amostras sintéticas. O segundo passo é a construção de curva de absorbância versus tempo total de abertura da válvula da amostra, sendo que o coeficiente angular dessa reta empregado no cálculo da concentração de zinco na mesma. Na construção das curvas foram realizadas 6 injeções seqüenciais com tempo de abertura de cada igual a 2 s a uma vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  (33  $\mu\text{L}$ ). Foi utilizada a cela de fluxo descrita no capítulo IV (Figura 7).

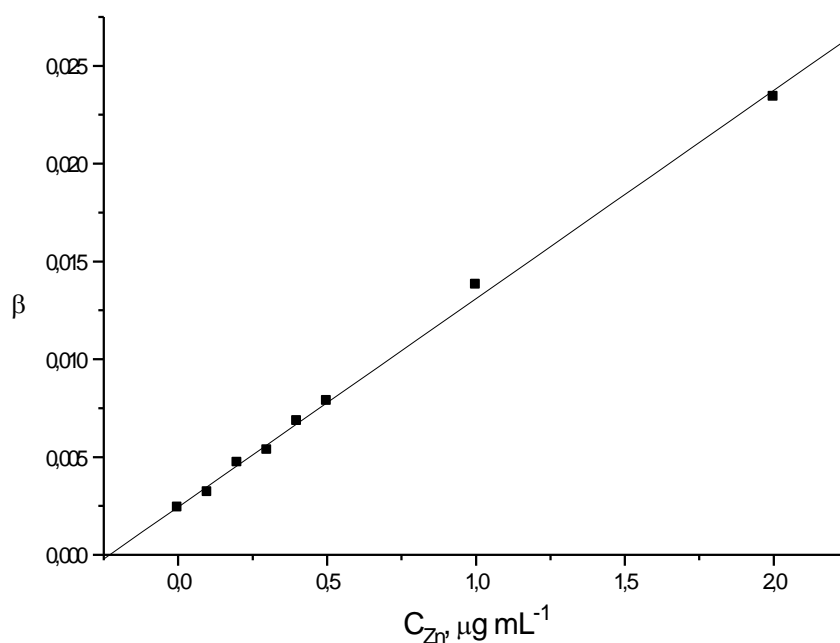
## VII.2.2 - Resultados e Discussão

Objetivando testar a metodologia desenvolvida para construção de curvas analíticas pelo emprego de injeções seqüenciais da solução do padrão único para determinação de zinco, foram construídas curvas relacionando o valor de absorvância obtido após cada injeção versus o tempo total de abertura da válvula do analito para a solução do padrão único e para as soluções das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, como mostra a Figura 38.



**Figura 38.** Curvas de absorvância versus tempo total de abertura da válvula do analito, para a solução do padrão único ( $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, sendo todos experimentos realizados em triplicata.

Antes de analisar os dados da Figura 38, deve-se salientar que o valor de absorvância da linha de base nesse sistema foi fixado em 0,500. Segundo as curvas da Figura 38, todas retas obtidas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação linear com valores superiores a 0,996. As curvas da Figura 38 mostram que a inclinação das retas aumenta conforme aumenta-se a concentração de zinco, sendo isso evidenciado mais claramente na Figura 39, onde plotou-se o valor da inclinação obtida na Figura 38 versus a concentração de zinco.

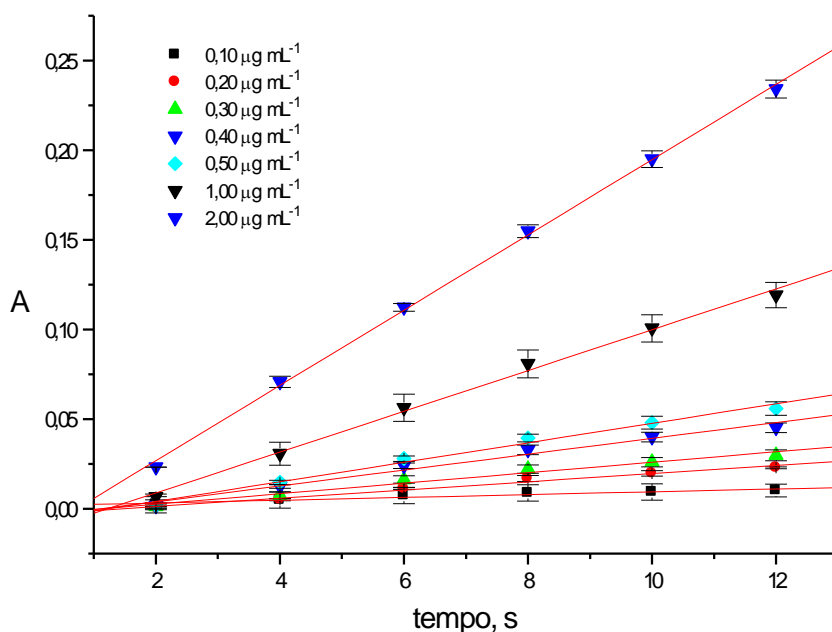


**Figura 39.** Valores das inclinações das retas ilustradas na Figura 38 versus concentração de zinco.

A boa linearidade da curva ilustrada na Figura 39 [ $\beta = (0,01065 \pm 0,00022)C_{Zn} + (0,00245 \pm 0,00018)$ ,  $R=0.998$ ] confirma os

pressupostos que serviram de base para a construção dessa metodologia de análise.

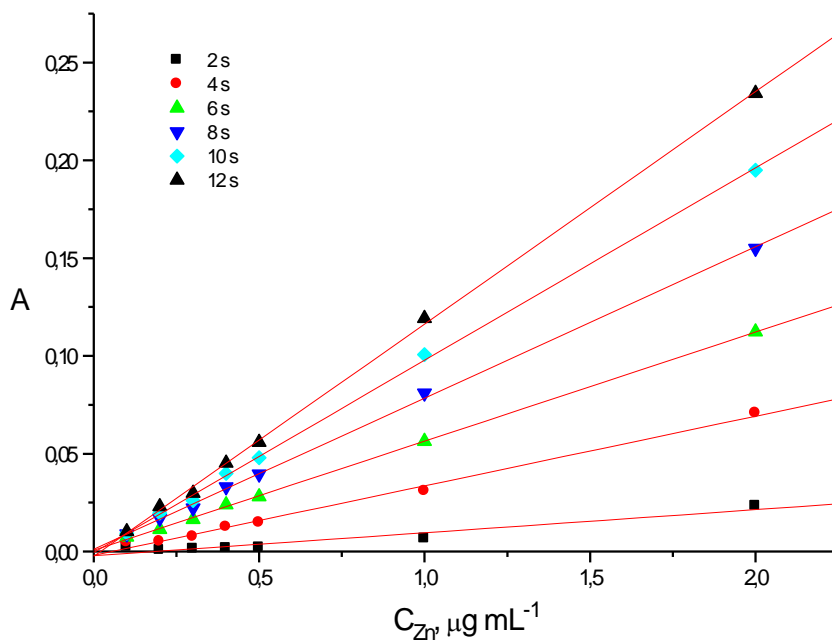
A partir das curvas da Figura 38, observou-se que conforme são realizadas injeções seqüenciais da solução do branco o sinal de absorvância cresce linearmente. Objetivando corrigir os sinais devido ao branco os sinais do branco foram subtraídos dos sinais para as curvas do padrão único e das soluções-amostras sintéticas, conforme ilustrado na Figura 40.



**Figura 40.** Curvas de absorvância , corrigindo o branco, versus tempo total de abertura da válvula do analito, para a solução do padrão único ( $2,00\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e das amostras sintéticas de zinco em diferentes concentrações, sendo todos experimentos realizados em triplicata.

As curvas da Figura 41 mostra as curvas de calibração ordinárias para cada um dos intervalos de tempo de abertura da válvula do analito, sendo que

todas curvas apresentam linearidade satisfatória, com coeficientes de correlação linear superiores a 0,999.



**Figura 41.** Curvas de absorvância, corrigido o branco, versus concentração de zinco para diferentes intervalos de tempo de abertura da válvula do analito, sendo todos experimentos realizados em triplicata.

Segundo as curvas da Figura 41, conforme aumenta-se o volume injetado de solução do analito aumenta-se a sensibilidade das curvas de calibração, sem que a linearidade das mesmas seja afetada.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos empregando a metodologia de construção de curvas de calibração empregando uma única solução de referência (2,00 µg mL<sup>-1</sup>) para a determinação de zinco em amostras sintéticas.

**TABELA 1.** Resultados obtidos empregando a metodologia das injeções seqüências com uso de padrão único ( $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na determinação de zinco em amostras sintéticas ( $n=3$ ).

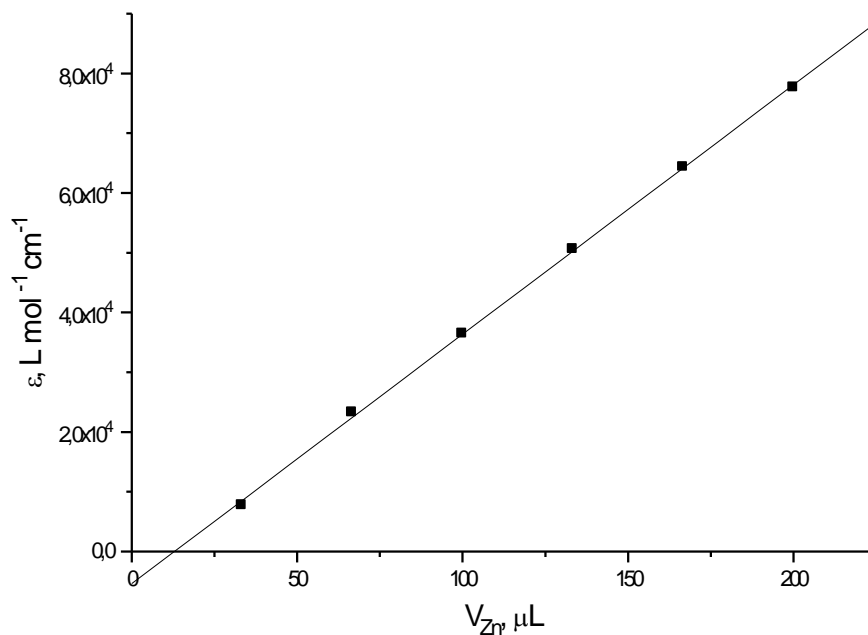
<b>Zn, <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	
<b>Real</b>	<b>Previsto</b>
0,10	$0,07 \pm 0,01$
0,20	$0,22 \pm 0,01$
0,30	$0,28 \pm 0,02$
0,40	$0,42 \pm 0,03$
0,50	$0,51 \pm 0,04$
1,00	$1,08 \pm 0,05$
2,00	$2,00 \pm 0,04$

A partir dos dados exibidos na Tabela 1 pôde-se constatar que as concentrações de zinco calculadas pela metodologia proposta empregando solução de padrão único de zinco ( $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) concordam com as concentrações reais, apresentando boa exatidão e precisão para um nível de 95% de confiabilidade.

Empregando-se a metodologia descrita no sistema FI-EFS desenvolvido é possível realizar a determinação de até 12 amostras de zinco em uma hora.

A sensibilidade obtida no sistema FI-EFS desenvolvido, empregando uma cela adaptada ao espectrofotômetro utilizado, a partir da Figura 41, é cerca de 26% maior que a alcançada por Teixeira e cols [53], em sistema FI-EFS idêntico ao aqui apresentado,

A curva da Figura 42 mostra a relação linear entre a absorvidade molar aparente e o volume de soluções de zinco empregada, sendo analisadas pelo sistema FI-EFS desenvolvido. A partir da curva da Figura 42 obteve-se uma equação do tipo  $\varepsilon = (417 \pm 4)V - (5,4 \pm 0,6) \cdot 10^3$  com  $R=0,99976$ .



**Figura 42.** Absorvidade molar aparente do complexo Zn-TAN - C<sub>18</sub> versus volume de solução de zinco injetado.

O consumo máximo das soluções-amosta de zinco, nas análises realizadas em triplicata, foi inferior a 3  $\mu g$  de zinco (1,4 mL) por análise.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados como sendo 15  $\mu g L^{-1}$  e 50  $\mu g L^{-1}$  respectivamente [104].

O sistema proposto possibilitou a determinação de até 12 amostras por hora, sendo possível a realização de até 120 injeções sem a necessidade de uma nova imobilização de TAN em C<sub>18</sub> [53].

### **VII.2.3 - Conclusões**

O método proposto mostrou-se simples e eficiente na determinação de zinco em amostras sintéticas, empregando uma única solução de referência, apresentando boa precisão e exatidão. Os resultados indicaram que essa metodologia pode ser aplicada na determinação de zinco em diferentes amostras reais, desde que seja realizado o pré-tratamento adequado.

O sistema FI-EFS associado a metodologia de construção de curvas de calibração empregando uma única solução de referência apresentou boa sensibilidade, devido aos elevados fatores de enriquecimento obtidos empregando volumes elevados de soluções contendo o analito.

A metodologia de cálculo desenvolvida pode ser aplicada a qualquer sistema FI-EFS, envolvendo o uso de outros reagentes cromogênicos, suportes sólidos e analito.

O sistema apresentou grau de automação relativamente elevado, sendo que a manipulação das válvulas solenóides, a aquisição dos dados e os cálculos foram realizados por microcomputador equipado com interface eletrônica, a partir de um software escrito em QuickBasic.



### ***VII.3 – Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Construção de Curvas Analíticas pelo Emprego de uma Única Injeção de Solução de Padrão Único para Determinação de Zinco em Sistema FI-EFS***

Na metodologia desenvolvida para construção de curvas de calibração empregando uma única solução de referência, descrita no capítulo VII.2 , foi empregado apenas o máximo dos sinais transientes obtidos após injeções seqüências de soluções de zinco, não sendo aproveitado o perfil dos sinais transientes para desenvolvimento da metodologia.

O trabalho apresentado nessa etapa visa o desenvolvimento de metodologia para construção de curvas analíticas, pelo emprego de uma única injeção de solução do padrão único de zinco, explorando os perfis dos sinais transientes obtidos no sistema FI-EFS desenvolvido.

O sinal transiente de absorvância após determinado intervalo de tempo  $t$  ao ser injetado uma alíquota da solução do padrão único é dado por:

$$A_{p(t)} = K_{(t)} C_p \quad (25)$$

Onde  $K_{(t)}$  é uma constante de proporcionalidade relacionada com a absorvância após  $t$  segundos,  $A_{p(t)}$  é a absorvância do padrão após  $t$  segundos. A absorvância da amostra após o mesmo intervalo de tempo  $t$  e com volume injetado igual ao do padrão é dada por:

$$A_{a(t)} = K_{(t)} C_a \quad (26)$$

A relação entre a  $A_{a(t)}$  e  $A_{p(t)}$  é dada por

$$A_{a(t)} = \frac{C_a}{C_p} A_{p(t)} \quad (27)$$

Plotando-se  $A_{a(t)}$  versus  $A_{p(t)}$ , a inclinação da reta obtida é dada por:

$$\Phi = \frac{C_a}{C_p} \quad (28)$$

sendo possível a obtenção de  $\Phi$  por regressão linear.

A concentração da amostra é calculada por:

$$C_a = \Phi C_p \quad (29)$$

### ***VII.3.1 – Procedimento - Experimental***

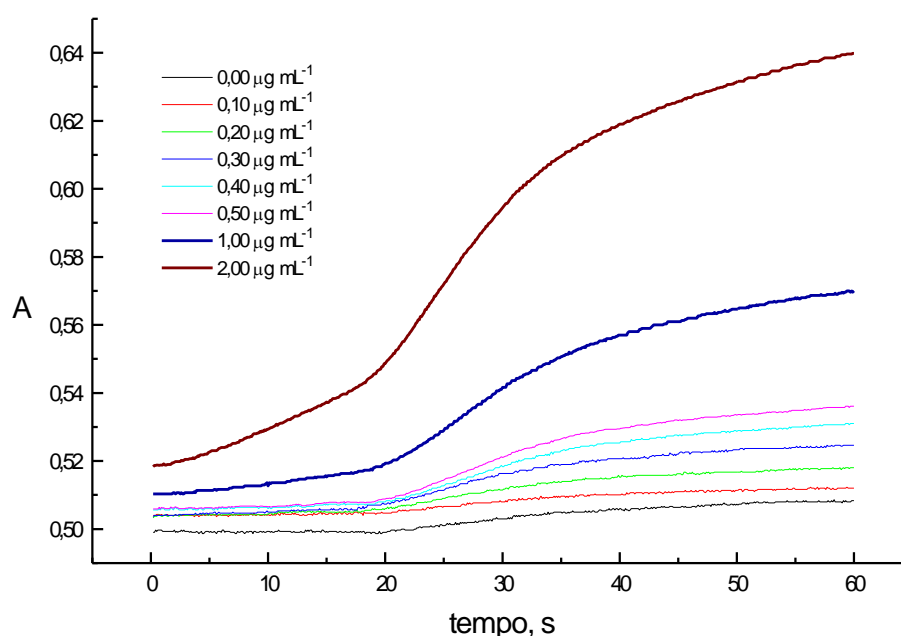
A solução única de zinco com concentração igual a  $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada pela diluição apropriada da solução estoque  $1000,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo seu pH ajustado para 6,2 com solução tampão hexamina  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . As soluções das amostras sintéticas de zinco foram preparadas de maneira análoga a do padrão único, sendo a faixa de concentração das amostras sintéticas de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  –  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todos experimentos foram realizados em triplicata.

Foram realizadas injeções de  $83 \mu\text{L}$  das soluções do padrão único e das amostras sintéticas, sendo registrado o perfil dos sinais a cada injeção. Após cada injeção foi realizada a eluição pela injeção de  $40 \mu\text{L}$  de ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Foi utilizada a cela de fluxo descrita no capítulo IV (Figura 7). O valor da linha de base foi fixado em 0,500 em absorbância e todas as injeções foram sincronizadas com a bomba peristáltica. A vazão foi fixada em  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

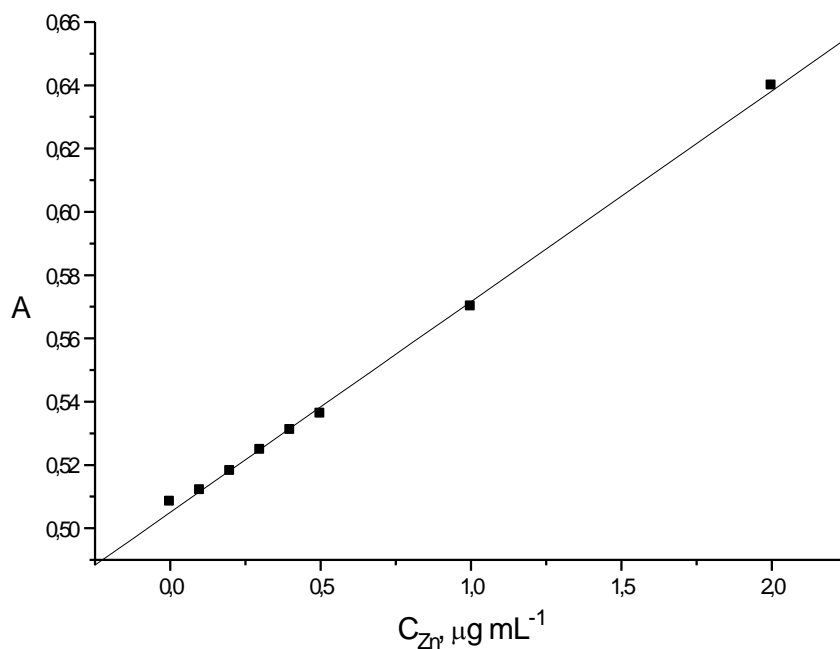
### VII.3.2 - Resultados e Discussão

As curvas da Figura 43 ilustram os perfis dos sinais transientes obtidos após a injeção de 83  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras sintéticas com concentrações na faixa de 0,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  – 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e do padrão único com concentração de 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em zinco.



**Figura 43.** Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 83  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras sintéticas e do padrão único de zinco.

Observando-se as curvas da Figura 43, constata-se que os valores máximos de absorbância aumentam conforme aumenta-se as concentrações de zinco, sendo isso evidenciado mais claramente na curva da Figura 44.

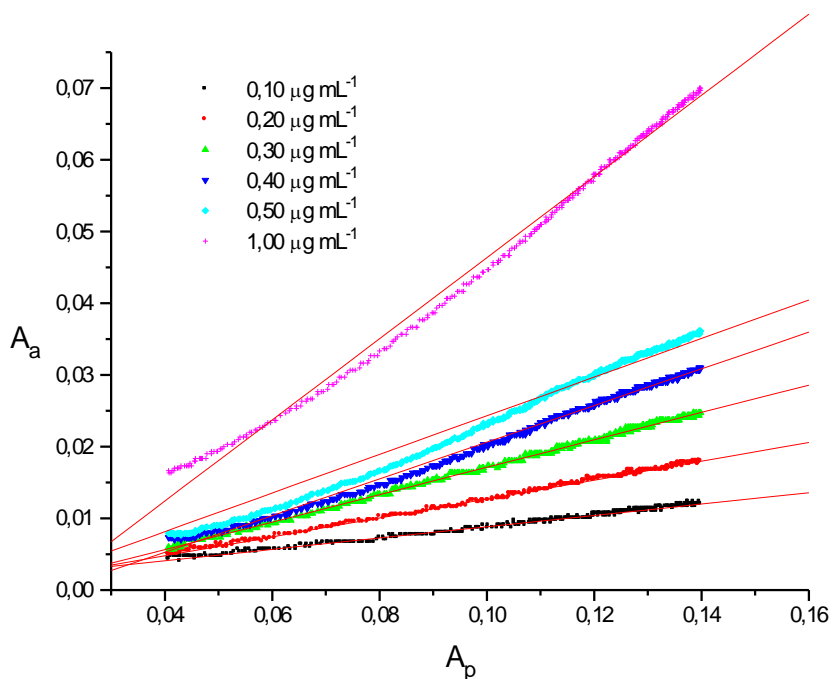


**Figura 44.** Absorbância versus concentração de zinco.

A Figura 44 nada mais é que uma curva analítica usual, obtida pela injeção de 83  $\mu\text{L}$  de soluções de zinco em diferentes concentrações, sendo as leituras realizadas pelo sistema FI-EFS desenvolvido. A equação obtida a partir da curva da Figura 44 é do tipo  $A = (0,067 \pm 0,001)C_{Zn} + (0,5050 \pm 0,0009)$  com coeficiente de correlação linear igual a 0,9991.

Para que seja empregada a metodologia do padrão único e injeção única é necessário que o valor de absorvância seja igual a zero quando a concentração de zinco for igual a zero. Como o valor da linha de base foi fixado em 0,500 em absorvância, foi necessário subtrair esse valor das curvas apresentadas nas curvas da Figura 43 para que sejam efetuados os cálculos.

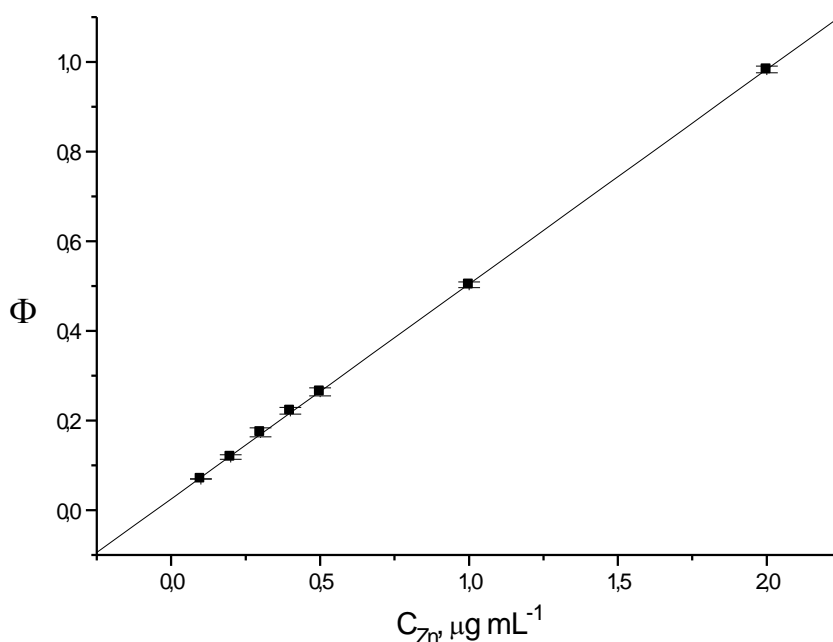
As curvas da Figura 45 mostram os valores de absorvância das amostras sintéticas versus os valores de absorvância do padrão único, para intervalos de tempo de leitura equivalentes, obtidos a partir dos perfis dos sinais transientes exibidos na Figura 43 após removido o sinal relativo a linha de base. Obteve-se boa linearidade nas curvas ilustradas na Figura 45, quando empregados os sinais transientes obtidos 17 s após cada injeção, tempo necessário para as soluções chegarem à cela de fluxo. As estimativas dos coeficientes angulares das retas exibidas na Figura 45 tendem a apresentar altos níveis de exatidão e precisão, uma vez que 430 pontos foram utilizados no cálculos por regressão linear, sendo que o passo entre leituras de 0,1s possibilitou a aquisição de tal quantidade de pontos.



**Figura 45.** Absorvância das amostras sintéticas versus absorvância do padrão único de zinco, em intervalos de tempo de leitura equivalentes.

Todas retas exibidas na Figura 45, obtidas por regressão linear, mostraram linearidade satisfatória, apresentando coeficientes de correlação linear com valores superiores a 0,990.

A curva da Figura 46 ilustra a dependência das inclinações das retas da Figura 45, obtidas por regressão linear, com a variação da concentração de zinco nas amostras sintéticas.



**Figura 46.** Inclinação das retas, obtidas empregando metodologia do padrão único e injeção única, versus concentração de zinco em amostras sintéticas.

A curva ilustrada na Figura 46 apresentou boa linearidade, sendo a equação da reta dada por  $\Phi = (0,478 \pm 0,002)C_a + (0,025 \pm 0,002)$  com coeficiente de correlação linear igual a 0,99995.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos no cálculo das concentrações de zinco em amostras sintéticas empregando a metodologia apresentada.

**TABELA 2.** Resultados obtidos empregando a metodologia do padrão único (2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e injeção única no cálculo da concentrações de zinco em amostras sintéticas ( $n=3$ ).

<b>Zn, <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	
<b>Real</b>	<b>Previsto</b>
0,10	0,13 $\pm$ 0,02
0,20	0,24 $\pm$ 0,02
0,30	0,35 $\pm$ 0,05
0,40	0,44 $\pm$ 0,04
0,50	0,53 $\pm$ 0,05
1,00	1,00 $\pm$ 0,03
2,00	1,97 $\pm$ 0,04

Segundo a Tabela 2, pôde-se constatar que os valores de concentração calculados, empregando a metodologia desenvolvida, concordam com as concentrações reais de zinco nas amostras sintéticas com 95% de confiabilidade.

A sensibilidade das medidas realizadas injetando-se 83  $\mu\text{L}$  das soluções contendo zinco foi elevada, sendo a absorvidade molar aparente estimada em  $(4,35 \pm 0,07) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

O consumo máximo das soluções das amostras sintéticas de zinco foi inferior a 1  $\mu\text{g}$  de zinco (1,0 mL) por análise.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados em  $18 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $62 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

O sistema proposto possibilitou a determinação de até 30 amostras por hora, sendo possível a realização de até 50 injeções sem a necessidade de repor o reagente cromogênico na fase sólida.

### **VII.3.3 - Conclusões**

O método proposto mostrou-se eficiente na determinação de zinco em amostras sintéticas, empregando uma única injeção da solução do padrão único, apresentando boa precisão e exatidão.

O sistema mostrou-se simples e sensível, tendo potencial para realizar a determinação de zinco em amostras reais, após a realização dos tratamentos prévios necessários.

O grau de automação relativamente elevado do sistema possibilitou a realização das determinações com o mínimo de manipulação humana, uma vez que a aquisição de dados, a manipulação do sistema FI-EFS, foram controlados por microcomputador equipado com interface eletrônica a partir de programa desenvolvido em QuickBasic 4.5.

A metodologia de cálculo descrita pode ser aplicada a qualquer sistema FI-EFS, empregando outros reagentes, suportes sólidos e analitos, havendo também a possibilidade de ser aplicado em sistemas FIA usuais.



## **VIII. APLICAÇÃO DO MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS NAS DETERMINAÇÕES POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA ASSOCIADA À SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO**

A determinação de mais de analito por amostra utilizando a análise por injeção em fluxo foi avaliada desde os seus primeiros trabalhos [105], sendo que este tornou-se tema de revisão bibliográfica [106].

Em espectrofotometria em fase sólida a determinação multicomponente também é objeto de estudo, sendo que vários trabalhos foram realizado nessa vertente. Entre esses trabalhos, uma grande parte destes empregam reações químicas ou estratégias instrumentais para determinação multicomponentes por EFS [107-110].

Com o advento do desenvolvimento e divulgação de métodos quimiométricos, houve um crescimento significativo no número de trabalhos envolvendo análise multicomponentes em todos ramos da química analítica. A quimiometria é o ramo da química que utiliza e desenvolve técnicas matemáticas, estatísticas e outros métodos empregando a lógica formal para planejar ou seleccionar as condições ótimas para realização de experimentos e permitir a obtenção do máximo de informações a partir de dados químicos [111,112].

O uso intensivo de técnicas quimiométricas na análise multicomponentes deve-se principalmente ao fato que com estas não é necessário um tratamento químico intensivo para separação das espécies químicas a serem quantificadas ou o uso de métodos de análise seletivos, sendo necessário apenas o uso de técnicas instrumentais adequadas para a aquisição dos dados necessários para o tratamento quimiométrico.

Dentre as aplicações de técnicas quimiométricas à EFS destacam-se os métodos derivativos [113-115] e a calibração multivariada [116,117]. Outras técnicas quimiométricas empregadas em EFS, que não se relacionam diretamente com a análise multielementar, também foram empregadas com sucesso no planejamento e otimização de experimentos [118,119] e em testes de robustez, para validação de métodos analíticos e detecção de amostras anômalas (outliers) [120].

A calibração multivariada também foi aplicada em conjunto com o sistemas FIA na análise multicomponentes [101,121,122], principalmente nas análises em misturas complexas e emprego do método generalizado da adição padrão.

Na maior parte dos trabalhos empregando espectrofotometria em fase sólida, em sistemas em batelada ou em fluxo, e dos sistemas FIA usuais que empregaram técnicas de calibração multivariadas foram utilizados espectrofotômetros que possibilitaram a aquisição de espectros em intervalos de tempo reduzidos, sendo necessários para o processo de calibração e previsão das concentrações dos analitos.

Nos sistemas FIA, o uso de espectrofotômetros que permitam uma varredura rápida dos comprimentos de onda para registrar os espectros dos

sinais transientes, é mais indispensável para o uso de espectros para construção de modelos multivariados. A maior parte desses métodos utiliza o espectro na região do máximo dos picos FIA ou se emprega todos espectros, coletados a cada intervalo de tempo, e utiliza-se de técnicas de calibração *three-way* [123].

Em sistemas FIA, os sinais transientes que são registrados fornecem um número enorme de dados. Normalmente, apenas o sinal relativo ao máximo dos picos FIA é utilizado no processo de construção de curvas analíticas pelo método univariado, sendo descartado o restante dos dados.

Esses dados contêm informações relativas a cinéticas das possíveis reações, viscosidade das soluções, variações do índice de refração, coeficiente de difusão, entre outras [55]. As informações contidas nos picos FIA podem possibilitar a caracterização dos analitos por métodos multivariados de forma tão satisfatória quanto utilizando dados espectrais. Todavia, o uso dos perfis dos picos FIA, obtidos em um único comprimento de onda, ainda é pouco difundido, sendo poucas as tentativas realizadas nessa vertente [124-126].

Nos procedimentos de análise por FI-EFS empregando técnicas de calibração multivariada, ainda não foram realizados trabalhos suficientemente divulgados na qual emprega-se os sinais transientes, obtidos em um comprimento de onda fixo, para construção de modelos multivariados.

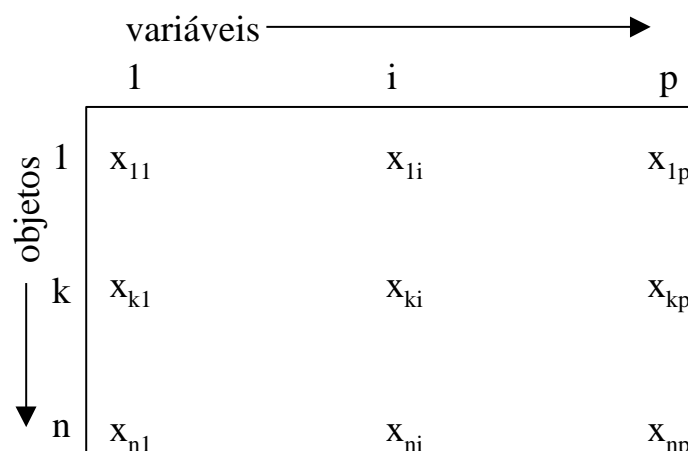
Esse capítulo são apresentados dois trabalhos: (1) aplicação do método dos mínimos quadrados parciais na determinação de zinco por espectrofotometria em fase sólida acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo e (2) aplicação do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) na determinação simultânea de zinco e níquel em misturas por espectrofotometria

em fase sólida acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo. Porém, antes da apresentação dos métodos desenvolvidos aplicando o PLS aos dados gerados por FI-EFS, serão brevemente introduzidos os conceitos básicos da modelagem de dados pelo método dos mínimos quadrados parciais.

## VIII.1 – O Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os dados químicos multivariados podem ser arranjados na forma de uma tabela de dados, onde os *objetos* são dispostos em linhas e as *variáveis* em colunas. Os *objetos*, freqüentemente são os padrões ou as amostras, e as *variáveis*, os diferentes comprimentos de onda, intervalos de tempo de leitura e elementos presentes na amostra.

A tabela de dados pode ser representada na forma de uma matriz, como ilustrado na Figura 47, da matriz  $x_{ki}$ , indicando o valor do  $k$ -ésimo *objeto* e da  $i$ -ésima *variável*.



**Figura 47.** Uma matriz de dados químicos com  $n$  linhas e  $p$  colunas, da matriz  $x_{ki}$ , indicando o valor do  $k$ -ésimo objeto e da  $i$ -ésima variável.

A notação normalmente empregada em álgebra linear e utilizada pelos principais autores de textos sobre quimiometria [127] será aqui utilizada. Letras maiúsculas em negrito representarão matrizes, e letras minúsculas também em negrito vetores (linhas ou colunas das matrizes). As letras minúsculas em

itálico representarão escalares, que podem ser elementos das matrizes  $(a_{ij})$ , de vetores  $(a_j)$  ou constantes  $(a)$ . A transposta de uma matriz ou vetor será representada por um sobrescrito “T”, como por exemplos  $\mathbf{x}^T$ . A operação de transposição é dada pela troca das linhas pelas colunas.

É possível estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{C}$ , quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. A forma de se estabelecer essa relação é a base da *Calibração Multivariada* [127].

A calibração multivariada consiste basicamente em duas fases: a calibração e a previsão.

A fase de calibração, tomando como exemplo as determinações por FI-EFS a serem apresentadas neste trabalho,  $n$  soluções de referência e os sinais analíticos são medidos em  $p$  intervalos de tempo diferentes. É obtida uma matriz  $\mathbf{A}$ , com  $p$  colunas e  $n$  linhas, dos perfis dos sinais transientes correspondentes às soluções de referência, e uma matriz  $\mathbf{C}$  das concentrações com  $m$  colunas e  $n$  linhas, das concentrações das  $m$  diferentes espécies analisadas. Essas matrizes constituem o *Conjunto de Calibração*.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado que melhor possa reproduzir  $\mathbf{C}$  a partir dos dados da matriz  $\mathbf{A}$  obtida para amostras de concentrações desconhecida. Esse modelo é usado na *Fase de Previsão* para estimar as concentrações dos analitos em amostras, a partir dos seus sinais transientes obtidos por FI-EFS. Os dados utilizados nessa fase constituem o *Conjunto de Previsão*.

Muitas vezes, antes que o modelo seja desenvolvido, é conveniente tratar os dados de modo a tornar os cálculos computacionais melhor

condicionados. Normalmente, o primeiro passo envolve a *normalização* [128], que consiste em fazer com que cada variável tenha a mesma influência no estágio inicial dos cálculos. Esta operação é realizada pela subtração de todos os termos de uma certa variável pela sua média, dividindo esse resultado pelo desvio padrão dessa variável, de forma que todos os termos de uma certa variável tenham média igual a zero (centralizados na média) e variância unitária (escalados). A centralização na média remove os termos constantes presentes nos dados, fazendo com que estes só possuam termos que variam conforme variam-se os *objetos*, removendo dados espúrios. O escalonamento serve para que todas as variáveis estejam na mesma unidade, unidade de desvio padrão. Quando as variáveis estão na mesma escala o processo de escalagem pode degradar os resultados pela amplificação do ruído, a que se pode dar a mesma importância que o sinal útil. Durante toda discussão a seguir, assume-se que as variáveis estão centralizadas na média.

Os métodos de calibração multivariada tem sido utilizado cada vez mais em química analítica [129], principalmente quando componentes de uma mistura precisam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade. Dentre esses métodos, há um enorme destaque ao Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) [127, 130-132], que vem ganhando importância devido principalmente à simplicidade do algoritmo e excelente poder de previsão.

O PLS está relacionado com outros métodos de calibração multivariada como o método dos mínimos quadrados clássico (CLS, do inglês *Classical Least Squares*) [133], com o método dos mínimos quadrados inverso (ILS, do

inglês *Inverse Least Squares*) [133,134] e com a regressão dos componentes principais (PCR, do inglês *Principal Components Regression*) [130,132].

O CLS assume que a matriz das respostas instrumentais (absorbância em diferentes comprimentos de onda, absorbância em diferentes intervalos de tempo, etc) varia em função da variação da matriz das concentrações dos constituintes das amostras. Numa notação matricial isso pode ser escrito como:

$$\mathbf{A} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{E}_A \quad (30)$$

onde  $\mathbf{B}$  é uma matriz  $m \times p$  das constantes de proporcionalidade e  $\mathbf{E}_A$  é uma matriz  $n \times p$  dos erros na previsão de  $\mathbf{A}$ . A resolução desse problema de calibração envolve o cálculo de  $\mathbf{B}$  pela equação:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{A} \quad (31)$$

E as concentrações, dos elementos nas amostras, previstas é dada por:

$$\hat{\mathbf{C}} = (\mathbf{B} \mathbf{B}^T) \mathbf{B} \mathbf{A} \quad (32)$$

Este método tem como vantagem o uso de um número elevado de diferentes respostas instrumentais por amostra na etapa de calibração. O fato de utilizar um grande número de variáveis nos cálculos gera um “efeito de média” que torna o modelo menos suscetível aos ruídos instrumentais. De fato, para que esse efeito seja eficiente, o número de variáveis em  $\mathbf{A}$  deve ser muito maior que o número de soluções de referência empregadas na etapa de calibração.

Por outro lado, a maior desvantagem é o fato que a concentração de todos constituintes das amostras do conjunto de calibração devem ser conhecidas e incluídas na etapa de calibração, de outra forma os outros constituintes irão interferir nas respostas instrumentais, gerando resultados incorretos.



Um grande problema com o uso do CLS é que é muito incomum, e as vezes inteiramente impossível, conhecer a composição completa das amostras. Uma solução para esse problema é realizada tirando vantagem da álgebra e rearranjar a equação 30.

$$\mathbf{C} = \mathbf{A}\mathbf{P} + \mathbf{E}_c \quad (33)$$

Onde  $\mathbf{P}$  é uma matriz  $p \times m$  dos coeficientes da calibração dos  $m$  analitos e  $\mathbf{E}_c$  é uma matriz  $n \times m$  dos erros na estimativa de  $\mathbf{C}$ . A solução da equação 33 é dada por:

$$\mathbf{P} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{C} \quad (34)$$

A etapa de previsão é semelhante a equação 33, onde  $\mathbf{A}$  é substituída pela matriz das resposta instrumentais das amostras de concentrações desconhecidas.

Essa modificação matemática do CLS tem sérias implicações nos experimentos. Este método é conhecido como método dos mínimos quadrados inverso (ILS). A relação ilustrada na equação 33 implica que a matriz das concentrações ( $\mathbf{C}$ ) varia em função das variações na matriz das repostas instrumentais ( $\mathbf{A}$ ). Dessa forma, para o cálculo das concentrações das espécies de interesse nas amostras é necessário a construção de um modelo que emprega a matriz das respostas instrumentais e uma matriz das concentrações contendo a concentração das espécies de interesse apenas, sendo desnecessário a inclusão das concentrações dos demais componentes da amostras.

Dessa forma, o ILS pode ser utilizado na análise de algumas espécies químicas presentes em misturas complexas.

Uma das desvantagens do ILS é que, devido a dimensionalidade das equações matriciais, o número de respostas instrumentais não pode exceder o número de soluções de referência utilizadas na etapa de calibração ou haverá mais coeficiente de calibração desconhecidos que *objetos* no conjunto de calibração. Dessa maneira o ILS está sujeito a empregar um número de variáveis em **A** restrito ao número de soluções de referência, o que faz com que o “efeito de média” seja desprezível.

Seria possível aumentar o número de variáveis em **A** aumentando o número de soluções de referência do conjunto de calibração. Todavia, quanto mais respostas instrumentais são adicionadas, pode ocorrer que entre as variáveis haja uma relação aproximadamente linear. Esse efeito, conhecido como colinearidade, faz com que a solução da equação (5) seja numericamente instável (singularidade).

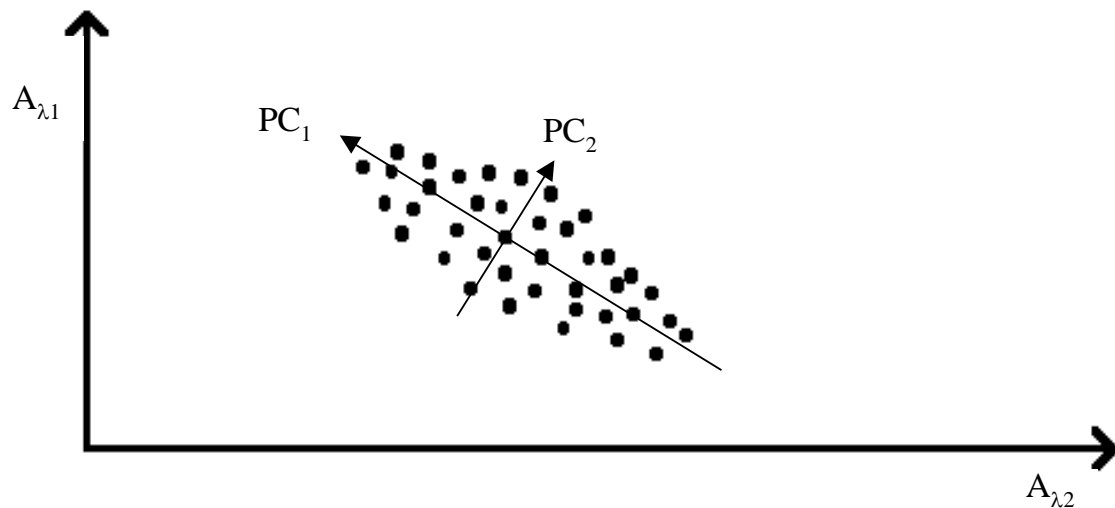
Outro problema do ILS é conhecido como *overfitting*, ocorre quando o número de resposta instrumentais é excessivo e o modelo começa a incluir ruído instrumental e outras variações extremamente peculiares ao conjunto de calibração, sendo que quando esse modelo é utilizado na previsão da concentrações dos analitos em amostras os erros nas estimativas são relativamente elevados.

No ILS, as vantagens do CLS ao incluir um número elevado de variáveis nas respostas instrumentais são definitivamente perdidas. Então deve-se empregar um sistema adequado de seleção das variáveis na matriz **A** para evitar esse problema. Esta tarefa, para um grande número de possibilidade, pode ser impraticável devido ao número absurdamente grande de possíveis

combinações a serem testadas no modelo, para encontrar-se o subconjunto de variáveis ótimo.

Um método melhor seria aquele que permitisse o uso de um elevado número de diferentes respostas instrumentais, usando o efeito de média do CLS, e , ao mesmo tempo, propiciasse a construção de modelo conhecendo-se apenas as concentrações da espécies de interesse nas soluções de referência do conjunto de calibração, vantagem do ILS.

Felizmente, as variações nas concentrações são explicadas por um conjunto reduzido de fatores abstratos, e não relacionadas diretamente com as respostas instrumentais. Esse conjunto de fatores abstratos pode ser encontrado projetando a matriz **A** num espaço, com um número de dimensões inferior ao número de variáveis em **A**, que maximize a variância de **A**. Um método largamente empregado para esse propósito é a análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal Component Analysis) [135]. Esse método usa toda informação contida em **A** e reconstrói uma nova matriz (*scores*), com um número menor de variáveis que a matriz original, isenta de problemas de colinearidade, podendo ser usada para calibração por ILS. Essa técnica projetiva preserva as vantagens do CLS, uma vez que usa todas possíveis respostas instrumentais contidas em **A** para o cálculo da nova matriz, e do ILS pois o número de variáveis da nova matriz é menor que o número *objetos* do conjunto de calibração. A Figura 48 ilustra a projeção dos dados referentes a absorvância em dois comprimentos de onda diferentes nos componentes principais.



**Figura 48.** Ilustração da projeção dos dados nos componentes principais.

Pela Figura 48 observa-se que o primeiro componente (PC1) consegue explicar a maior parte da variação dos dados, enquanto que o segundo componente principal (PC2) é ortogonal ao primeiro e explica a variação dos dados não explicada pelo primeiro componente. Nesse exemplo, basta um componente principal para explicar todo conjunto de dados.

As duas técnicas de calibração multivariada que empregam princípios do PCA são a regressão dos componentes principais (PCR) e o método dos mínimos quadrados parciais (PLS).

O PCR começa os cálculos decompondo a matriz  $\mathbf{A}$  numa soma do produto de dois vetores que constituem os componentes principais:

$$\mathbf{A} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_a\mathbf{p}_a^T + \mathbf{E}_A \quad (35)$$

que pode ser escrita numa forma matricial como:

$$\mathbf{A} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_A \quad (36)$$

onde  $\mathbf{T}$  é uma matriz  $n \times a$  contendo os vetores dos *scores*,  $\mathbf{P}$  é uma matriz  $p \times a$  contendo os vetores dos *loadings* e  $a$  é o número de componentes principais, ou variáveis latentes, que explicam  $\mathbf{A}$ . O número de componentes principais

deve ser menor ou igual ao número de *objetos* utilizados na etapa de calibração.

O segundo passo do PCR é realizar a regressão empregando **T** por ILS:

$$\mathbf{C} = \mathbf{T}\mathbf{B} + \mathbf{E}_c \quad (37)$$

onde a solução dessa equação é dada por:

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}^T\mathbf{A} \quad (38)$$

onde **B** é uma matriz  $a \times m$  dos coeficientes da regressão por PCR. A resolução da equação 38 é possível pois a matriz de *scores* é ortogonal, não apresentando problemas de colinearidade.

A principal desvantagem do PCR é que o cálculo dos *scores* é realizado por PCA nenhum conhecimento sobre a capacidade desses *scores* em explicar as concentrações das espécies de interesse.

O PLS é uma técnica de calibração multivariada no qual as matrizes **C** e **A** são decompostas por PCA, de tal forma que os *scores* e *loadings* são calculados buscando explicar ao máximo as concentrações dos analitos, mantendo a ortogonalidade dos *scores* e *loadings*. A decomposição de **A** e **C** consiste em:

$$\mathbf{A} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}_A \quad (39)$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_C \quad (40)$$

e a relação entre os *scores* (inner relation), que é calculada objetivando explicar ao máximo **C**, é dada por

$$\mathbf{U} = \mathbf{T}\mathbf{B} \quad (41)$$

onde **B** são os coeficientes da regressão entre as matrizes dos *scores* de **A** e **C**.

Maiores detalhes sobre os passos do algoritmo para calibração e previsão por PLS são dados na literatura [130-132]. As Tabelas 3 e 4 mostram os algoritmos PLS para calibração e previsão, respectivamente.

**TABELA 3.** Algoritmo PLS para calibração

---

Passo 1.	Centralize na média $\mathbf{A}$ e $\mathbf{C}$
Passo 2.	Faça $\mathbf{u}$ igual a qualquer coluna de $\mathbf{C}$ pré-processada
Passo 3.	$\mathbf{w} = \mathbf{A}^T \mathbf{u} / \mathbf{u}^T \mathbf{u}$
Step 4.	$\mathbf{w} = \mathbf{w} / \ \mathbf{w}\ $
Passo 5.	Se o bloco $\mathbf{C}$ tiver apenas uma coluna faça $\mathbf{q}=1$ e vá para o passo 11, senão continue
Passo 6.	$\mathbf{t} = \mathbf{A} \mathbf{w}$
Passo 7.	$\mathbf{q} = \mathbf{C}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
Passo 8.	$\mathbf{q} = \mathbf{q} / \ \mathbf{q}\ $
Passo 9.	$\mathbf{u} = \mathbf{C} \mathbf{q}$
Passo 10.	Cheque a convergência de $\mathbf{t}$ comparando-o com $\mathbf{t}$ na iteração precedente, se convergir continue senão vá para o passo 3
Passo 11.	$\mathbf{p} = \mathbf{A}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
Passo 12.	$\mathbf{t} = \mathbf{t} \ \mathbf{p}\ $
Passo 13.	$\mathbf{w} = \mathbf{w} \ \mathbf{p}\ $
Passo 14.	$\mathbf{p} = \mathbf{p} / \ \mathbf{p}\ $
Passo 15.	$b = \mathbf{u}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
Passo 16.	Calcule os resíduos
	$\mathbf{E}_{A_h} = \mathbf{E}_{A_{h-1}} - \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h^T$ ; $\mathbf{E}_{A_0} = \mathbf{A}$
	$\mathbf{E}_{C_h} = \mathbf{E}_{C_{h-1}} - b_h \mathbf{t}_h \mathbf{q}_h^T$ ; $\mathbf{E}_{C_0} = \mathbf{C}$
Passo 17.	Retorne ao passo 2 e troque $\mathbf{A}$ e $\mathbf{C}$ por $\mathbf{E}_{A_h}$ e $\mathbf{E}_{C_h}$ para o próximo $h$ componente principal. Isso é repetido até alcançar-se o número de componentes principais desejado.

---

**TABELA 4.** Algoritmo PLS para previsão

---

Passo 1. Centralize **A** com as médias obtidas na calibração

Passo 2.  $\mathbf{t}_h = \mathbf{E}_{A_{h-1}} \mathbf{w}_h$ ;  $\mathbf{E}_{A_0} = \mathbf{A}$

Passo 3.  $\mathbf{E}_{A_h} = \mathbf{E}_{A_{h-1}} - \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h^T$

Passo 4. Se  $h$  = número de variáveis latentes desejadas, continue, senão vá para o passo 2

Passo 5.  $\mathbf{C} = \sum_{h=1}^a b_h \mathbf{t}_h \mathbf{q}_h^T$  onde  $a$  é o número de componentes principais desejado

Passo 6. Some a cada coluna de **C** prevista à média da respectiva coluna da matriz **C** da calibração

---



## **VIII.2 – Aplicação do Método dos Mínimos Quadrados Parciais na Determinação de Zinco por Espectrofotometria em Fase Sólida Acoplada a Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo**

Em sistemas FIA associado com a detecção por espectrofotometria em fase sólida ainda não foram realizados trabalhos aplicando técnicas de calibração multivariada empregando o perfil dos sinais transientes para determinação de espécies químicas com as leituras realizadas em um único comprimento de onda.

O perfil dos sinais transientes nos sistemas FI-EFS contem informações sobre a velocidade de reação, coeficiente de difusão, distribuição do analito na fase sólida, concentração do analito, absorvidade entre outros. Os perfis dos sinais transientes em sistemas FI-EFS podem ser utilizados para construção de modelos multivariados de calibração assim como o máximo desses sinais é comumente empregado na construção de curvas analíticas em modelos univariados.

Dentre os métodos de calibração multivariada destaca-se o método dos mínimos quadrados parciais (PLS). O PLS é um método quimiométrico que pode ser aplicado tanto na determinação multicomponente quanto na determinação de apenas um componente, tendo uma série de vantagens em relação as técnicas univariadas de calibração.

Com a aplicação do PLS a determinação de uma ou mais espécies químicas é possível de ser realizada, com obtenção de resultados aceitáveis,

mesmo que nos sinais instrumentais haja a presença de até 99% de ruído aleatório [136]. O PLS também permite a detecção de amostras anômalas (outliers), indicando a possibilidade do modelo falhar na previsão dessas amostras [137,138], sendo que mesmo nesses casos os erros nos resultados são muito mais aceitáveis que aqueles gerados a partir da calibração univariada.

No presente trabalho foi desenvolvido um algoritmo para construção de modelos PLS para calibração e previsão [130,132], escrito em Quick Basic 4.5, que emprega os sinais transientes obtidos no sistema FI-EFS desenvolvido para determinação de zinco empregando um único comprimento de onda.

### ***VIII.2.1 - Experimental - Procedimento***

Soluções de referência de zinco com concentrações na faixa de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas a partir da diluição de solução estoque de zinco com concentração  $1000,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o pH destas foi ajustado para 6,2 com solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de hexamina.

Através de um sistema FI-EFS desenvolvido foram realizadas injeções de  $40 \mu\text{L}$  das soluções contendo zinco. A vazão foi mantida em  $1 \text{ mL min}^{-1}$  sendo que todas as injeções foram realizadas sincronizada com a bomba peristáltica.

A leitura dos sinais transientes foi realizada por um intervalo de tempo de 60 s, sendo os sinais adquiridos de 0,1 s em 0,1 s.

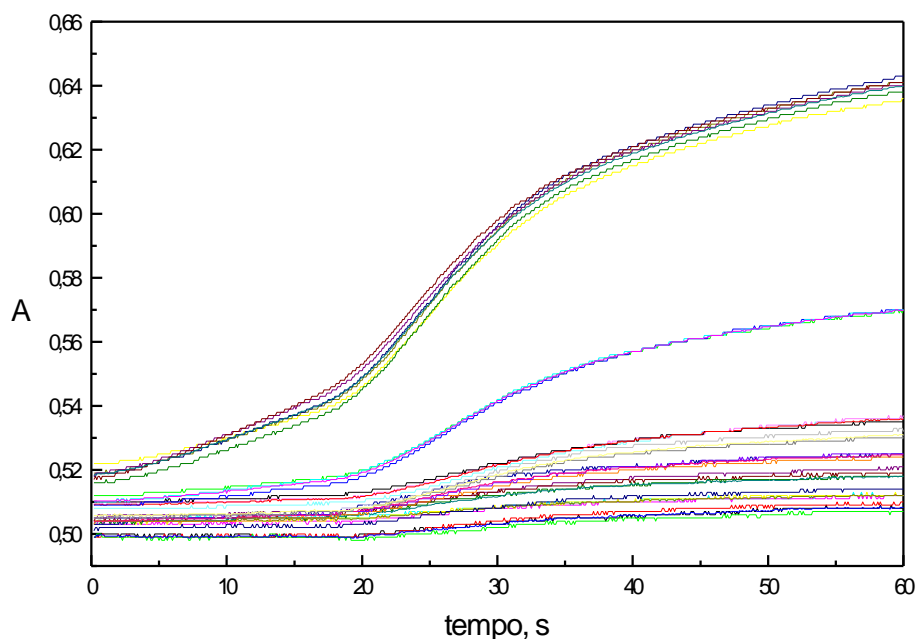
A eluição de zinco imobilizado foi realizada pela injeção de  $40 \mu\text{L}$  de solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl.

Todas as análises foram feitas em quadruplicata, sendo que as medidas realizadas em ordem aleatória, num total de 32 medidas.

### ***VIII.2.2 - Resultados e discussão***

As soluções de referência de zinco foram analisadas pelo sistema FI-EFS e os perfis dos sinais transientes foram adquiridos logo após cada injeção da solução do analito. A Figura 49 mostra os perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de solução de zinco com concentração de 0,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , realizadas em quadruplicata com leitura realizada em 585 nm.

O algoritmo PLS foi aplicado para a construção de modelo para previsão de zinco com leitura realizada em um único comprimento de onda empregando os perfis dos sinais transientes mostrados na Figura 49.



**Figura 49.** Perfis dos sinais transientes obtidos pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  da solução de zinco com concentrações de 0,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

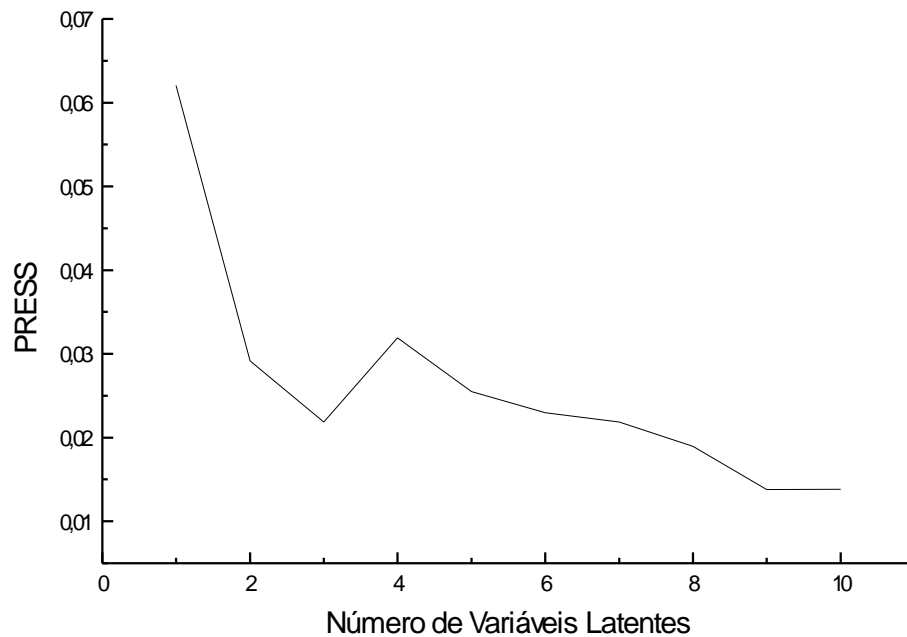
O número de componentes, ou variáveis latentes, foi encontrado empregando-se o método da validação cruzada completa (complete cross validation). Nesse método, remove-se um dos padrões do conjunto de calibração e constrói-se um modelo PLS usando esse novo conjunto de calibração, sendo a concentração do padrão removido prevista por esse novo modelo. Esse processo é repetido para todos os padrões do conjunto de calibração, e a soma quadrática residual dos erros da previsão (PRESS, do inglês Prediction Residual Sum of Squares) é calculado. O valor de PRESS é

calculado para diferentes números de componentes e o número de componentes que propicia o menor valor de PRESS é escolhido para ser usado nas previsões [130,131].

Todavia, deve-se evitar ao máximo o uso de um número de componentes maior que o necessário, pois a inclusão de outros componentes principais e relevantes inclui no modelo erros e variações que são exclusivos aos padrões usados na calibração, tornando o modelo pouco apropriado para previsão em amostras com concentrações desconhecidas. Para isso, o algoritmo desenvolvido procura o menor número de componentes cujo valor de PRESS não é significativamente maior que o menor valor de PRESS encontrado, sendo essa comparação realizada empregando o teste- $F$  [132].

A curva da Figura 50 mostra o valor de PRESS versus o número de variáveis latentes empregadas, no modelo PLS para determinação de zinco por FI-EFS.

O número de componentes necessário para os cálculos encontrados pelo software desenvolvido foi igual a 9. Todavia, esse resultado foi comparado com os obtidos por PLS empregando o programa *The Unscrambler 6.0* e, este programa, sugeriu o uso de apenas um componente. A partir desse resultado optou-se por utilizar apenas um componente nos cálculos, sendo este número mais coerente, uma vez que apenas um íon metálico estava presente em solução, sendo que este componente explica 99,64% da variação total dos dados.



**Figura 50.** PRESS versus número de variáveis latentes empregadas no PLS.

O intervalo de tempo que o algoritmo desenvolvido leva para realizar os cálculos na etapa de calibração para encontrar o número de componentes principais empregando o processo de validação cruzada completa em um microcomputador 486 é de cerca de 15 minutos, sendo que após essa etapa o programa leva 10 ms para prever a concentração de zinco por amostra. Dessa forma, o software desenvolvido pôde ser aplicado na previsão da concentração de zinco em tempo real. Deve-se levar em consideração que o algoritmo realiza os cálculos numa matriz **A** do tipo 36 x 600, com um total de 96000 dados, sendo justificável o intervalo de tempo necessário para o processo de calibração e validação do modelo.

A Tabela 5 mostra os resultados da validação de modelo pelo cálculo das concentrações dos padrões empregando o método de validação cruzada completa, evitando resultados tendenciosos.

**TABELA 5.** Resultados obtidos para as concentrações de zinco calculadas por PLS ( $n=4$ ).

<b>Zn, <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	
<b><i>Real</i></b>	<b><i>Previsto</i></b>
0,10	0,12 $\pm$ 0,02
0,20	0,21 $\pm$ 0,02
0,30	0,30 $\pm$ 0,01
0,40	0,38 $\pm$ 0,02
0,50	0,46 $\pm$ 0,01
1,00	0,93 $\pm$ 0,04
2,00	2,02 $\pm$ 0,05

Os resultados obtidos mostram que o método desenvolvido apresentou, de maneira geral, boa precisão e exatidão, sendo que as concentrações de zinco calculadas concordam com as concentrações reais com 95% de confiabilidade (*teste t- pareado*).

Como o programa para modelagem por PLS foi associado aos programas de controle de válvulas do sistema FI-EFS desenvolvido e aquisições dos sinais transientes, as determinações de zinco podem ser realizadas em tempo real.

O consumo máximo das soluções das amostras sintéticas de zinco foi inferior a 1  $\mu\text{g}$  de zinco (1,00 mL) por análise.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados como sendo 18  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 62  $\mu\text{g L}^{-1}$  de zinco, respectivamente.

O sistema proposto possibilitou a análise de até 30 amostras por hora, sendo possível realizar até 50 injeções sem a necessidade de repor o TAN pela imobilização do reagente cromogênico em  $\text{C}_{18}$ .

O algoritmo desenvolvido para construção de modelos por PLS para calibração e previsão de concentrações de zinco empregando os perfis dos sinais transientes obteve resultados concordantes com os obtidos empregando programas comerciais como o The Unscrambler 6.0 (Camo) e o PLS Toolbox para Matlab (Eigenvector) versão 1.5.1 [139].

### ***VIII.2.3 - Conclusões***

O método proposto mostrou-se eficiente na determinação de zinco, empregando algoritmo para calibração multivariada por PLS desenvolvida, em amostras sintéticas empregando os sinais transientes obtidos pelo sistemas FI-EFS com leitura realizadas em um comprimento de fixo (585 nm).

A simplicidade, sensibilidade e robustez do método desenvolvido mostrou-se adequadas, demonstrando o potencial desta para determinações de zinco em amostras reais.

O acoplamento do algoritmo PLS com os programas de aquisição de dados e controle das válvulas solenóides do sistema FI-EFS possibilitou que a previsão das concentrações de zinco nas amostras fosse realizada em tempo



real, sem a necessidade de transferência de dados para tratamento após a análise para um outro programa.

O algoritmo PLS desenvolvido não foi construído para ser dedicada apenas aos sistemas FI-EFS do presente trabalho, podendo ser aplicado para calibração e previsão de qualquer conjunto de dados multivariados.

### **VIII.3 – Aplicação do Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) na Determinação Simultânea de Zinco e Níquel em Misturas por FI-EFS**

Os perfis dos sinais transientes obtidos pelo sistema FI-EFS com leitura em um único comprimento de onda podem ser utilizados para construção de modelos multivariados empregando o PLS para calibração e previsão da concentração de espécies químicas conforme os resultados do trabalho apresentado anteriormente nessa dissertação.

A partir do conhecimento que o uso de técnicas de calibração multivariada possibilitam o cálculo da concentração de uma única espécie ou de mais espécie, simultaneamente, mesmo na presença de interferências químicas ou sinais sobrepostos, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de metodologia analítica aplicada na determinação simultânea de zinco e níquel, com leituras realizadas em um único comprimento de onda utilizando os perfis dos sinais transientes, obtidos em

sistemas FI-EFS desenvolvido, para construção de modelos para calibração e previsão das concentrações dessas espécies químicas.

O zinco e o níquel reagem com o TAN imobilizado em C18, formando complexo vermelho em pH 6,0. Uma rotina para os cálculos por PLS escrita em Quickbasic 4.5 foi utilizada nas etapas de calibração e previsão das concentrações dos analitos. Este trabalho foi recentemente publicado em periódico de circulação internacional [140].

### ***VIII.3.1 - Reagentes e Soluções***

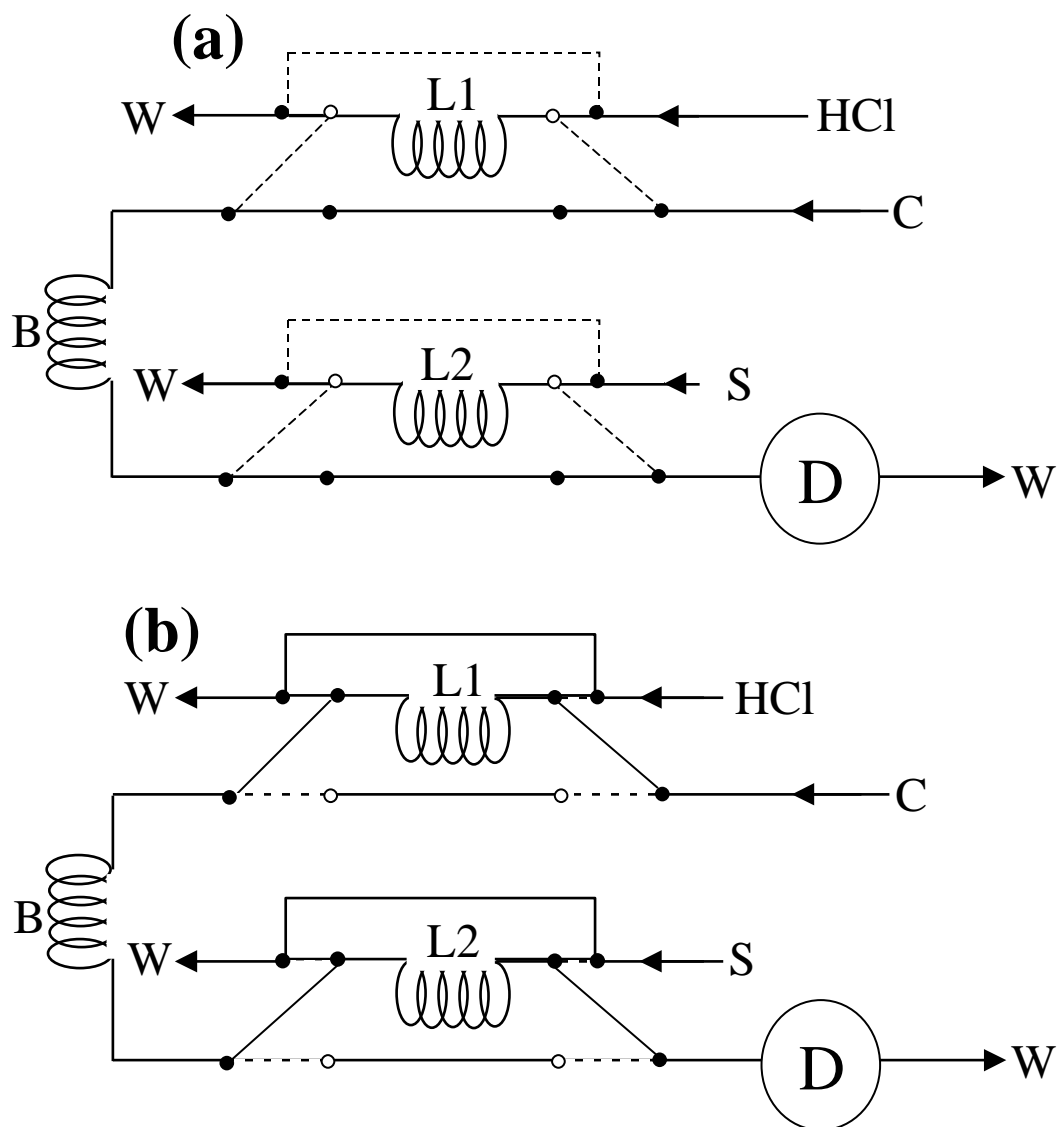
Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico. As soluções de referência das misturas de zinco e níquel com concentrações entre  $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$  –  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas pela diluição apropriada de soluções estoques de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Uma solução tampão  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  em hexamina foi preparada, sendo seu pH ajustado para 6,0 com ácido clorídrico. Uma solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi utilizada como eluente.

### ***VIII.3.2 - Diagrama de Fluxo***

O sistema de fluxo utilizado emprega um injetor comutador [141], sendo as linhas de fluxo constituídas por tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno.

Um diagrama esquemático do sistema de fluxo está apresentado na Figura 51.



**Figura 51.** Diagrama de fluxo do sistema empregado na análise por espectrofotometria em fase sólida. Na posição (a) de amostragem e (b) de injeção; W-amostra; C-fluxo carregador (H<sub>2</sub>O); L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>-loops da amostra e do solvente (400 $\mu$ L e 625 $\mu$ L, respectivamente); B-bobina de delay-80cm; W-descarte; DET-Espectrofotômetro equipado com uma cela contendo a fase sólida.

Na posição (a), os loops L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> são preenchidos com soluções de HCl e da amostra, respectivamente, numa vazão de 0,9 mL min<sup>-1</sup>. Comutando o

injetor (Figura 51b), as alíquotas de solução de HCl e da amostra são simultaneamente inseridas no caminho analítico, e transportadas pelo carregador até o detetor. O zinco e o níquel, presentes nas amostras, reagem com o TAN, imobilizado em C<sub>18</sub> e o complexo é retido na fase sólida, sendo a absorbância medida continuamente a 595 nm. Quando a solução de HCl chega na cela de fluxo os íons são eluídos sem remover o reagente cromogênico em quantidade significativa. A bobina B propicia um intervalo de tempo entre a injeção dos analitos e do ácido, evitando a sobreposição das alíquotas das mesmas. O caminho analítico foi fixado em 50 cm.

As soluções de referência das misturas de zinco e níquel foram preparadas empregando um planejamento fatorial 4<sup>2</sup> em duplicata [142,143], sendo as medidas realizadas em ordem aleatória.

### ***VIII.3.3 - Resultados e Discussão***

O TAN imobilizado em C<sub>18</sub> reage instantaneamente com Co (II), Cu (II), Fe (II) e Zn (II) formando complexos vermelhos em pH 6,2 [53]. Nas mesmas condições, a retenção de níquel (II) em TAN-C<sub>18</sub> é extremamente dependente da vazão [144].

As constantes de estabilidade e a absorvidade dos complexos do TAN-C<sub>18</sub> com o zinco e níquel são semelhantes e independentes da velocidade do fluxo. A partir desse dado presume-se que a cinética de retenção do níquel é significativamente mais lenta que para o zinco.

Para que seja possível a análise de níquel pelo sistema FI-EFS, apresentado, a velocidade do fluxo deve ser suficientemente baixa de forma a

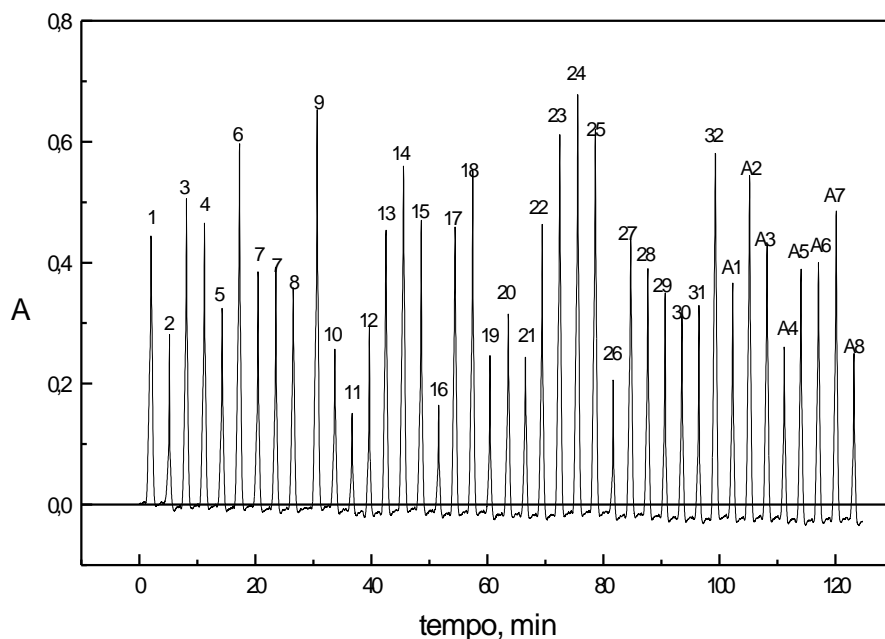
maximizar a retenção de níquel na fase sólida, sem comprometer a frequência analítica.

A concentração de ácido deve ser suficientemente elevada para promover uma eluição rápida dos íons metálicos, aumentando a velocidade analítica, sem que o reagente seja removido da fase sólida. O comprimento da bobina B deve ter o comprimento mínimo necessário para separar as alíquotas da amostra do ácido, permitindo que o tempo de residência da amostra na cela seja suficiente para que a reação ocorra apreciavelmente, antes de ser realizada a eluição.

A determinação de zinco e níquel em misturas foi realizada em outro trabalho empregando sistema FI-EFS, idêntico ao empregado no presente trabalho, explorando as diferentes velocidades de reação dos íons com o TAN-C18 mantendo fixo o comprimento de ondas de leitura em 595 nm. Todavia, para que fosse diferenciado o sinal proveniente do zinco e do níquel, já que esses íons absorvem na mesma faixa de comprimento de onda, foi necessário realizar as medidas em diferentes vazões, o que tornou seqüencial a determinação dos analitos [144].

No método proposto no presente trabalho a determinação de zinco e níquel é realizada simultaneamente, mantendo fixados a vazão, o comprimento de onda de leitura (595 nm), as concentrações dos reagentes e configuração do sistema de fluxo, sem a realização de separação ou mascaramento dos analitos. Para isso, foram empregados os perfis dos sinais transientes e aplicou-se o PLS para calibração e previsão das concentrações de zinco e níquel.

Os picos FIA obtidos para as soluções de referência e amostras sintéticas estão ilustradas na Figura 52 e a Tabela 6 mostra as concentrações de zinco e níquel referentes aos picos da Figura 52.



**Figura 52.** Picos FIA das soluções de referências e amostras sintéticas de zinco e níquel, analisadas em duplicata.

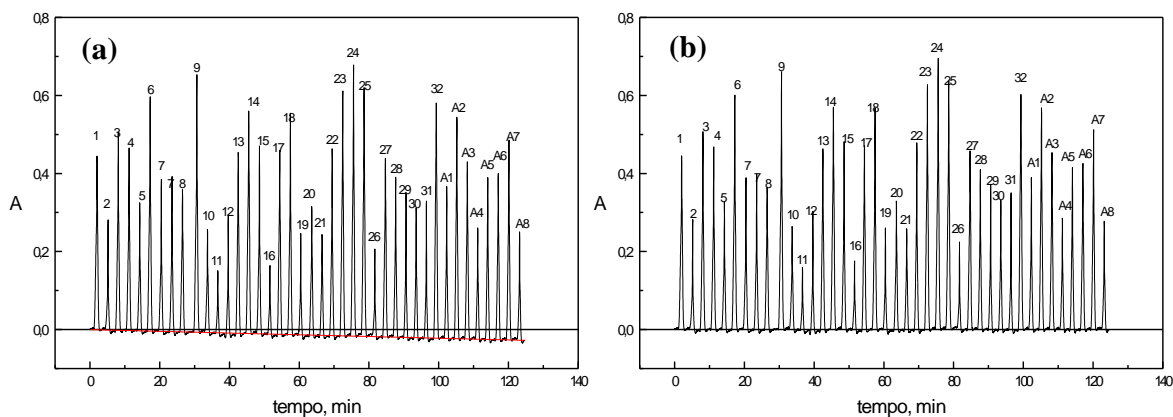
Uma pequena queda na linha de base, com o tempo, pode ser observada na Figura 52. Isso ocorre principalmente devido a remoção de pequenas quantidades do reagente cromogênico pelo ácido, conforme são realizadas várias eluições, podendo alterar os resultados.

Para que o efeito da queda da linha de base fosse corrigido o valor médio da linha de base (BL) foi calculado, após cada injeção, sendo esse valor assumido como a nova linha de base, sendo este valor subtraído dos sinais analíticos da injeção subsequente. A Figura 53 mostra os picos FIA e os

valores da linha de base calculados após cada injeção (a) e da linha de base (b).

**TABELA 6.** *Concentrações das soluções mistas, contendo zinco e níquel, de referência e das amostras sintéticas.*

Soluções de Referência	Concentração, $\mu\text{g mL}^{-1}$		Soluções de Referência	Concentração, $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Zn	Ni		Zn	Ni
(1) e (27)	0,30	1,00	(2) e (12)	0,75	0,30
(3) e (4)	0,75	0,75	(5) e (30)	0,55	0,55
(6) e (18)	1,00	0,75	(7) e (28)	0,75	0,55
(8) e (20)	0,30	0,75	(9) e (24)	1,00	1,00
(10) e (21)	0,30	0,55	(11) e (16)	0,30	0,30
(13) e (17)	0,55	0,75	(14) e (32)	0,55	1,00
(15) e (22)	1,00	0,55	(19) e (26)	0,55	0,30
(23) e (25)	0,75	1,00	(29) e (31)	1,00	0,30
Soluções Amostras			Soluções Amostras		
(A1) e (A5)	0,80	0,50	(A2) e (A7)	0,80	0,80
(A3) e (A6)	0,50	0,80	(A4) e (A8)	0,50	0,50



**Figura 53.** FIAGRAMA das soluções de referência e amostras sintéticas (a) antes e (b) após a correção da linha de base. A linha vermelha liga os valores da linha de base calculadas após cada injeção.

Nos cálculos por PLS, o número de pontos de cada pico FIA a ser empregado nos cálculos deve ser o mesmo. Como as leituras dos sinais transientes foram realizadas continuamente, o intervalo de tempo onde cada injeção foi iniciada não foi registrado, desenvolveu-se uma metodologia para definir os intervalos de tempo onde cada pico inicia e termina.

O primeiro passo dessa rotina foi o cálculo do sinal médio referente a linha de base (BL), após o processo de correção da linha de base, e o desvio padrão dessas medidas (S). Quando o sinal analítico é maior que  $BL+3S$  ou menor que  $BL-3S$  uma variável lógica (FLAG) passa a ser verdadeira, indicando o início do pico. A partir daí quando o sinal analítico estiver dentro do intervalo  $BL\pm 3S$  a variável FLAG torna-se falsa novamente, indicando o fim do pico FIA. Esse processo é repetido para os três primeiros picos usados como teste, sendo contados os números de pontos antes e após o máximo de cada



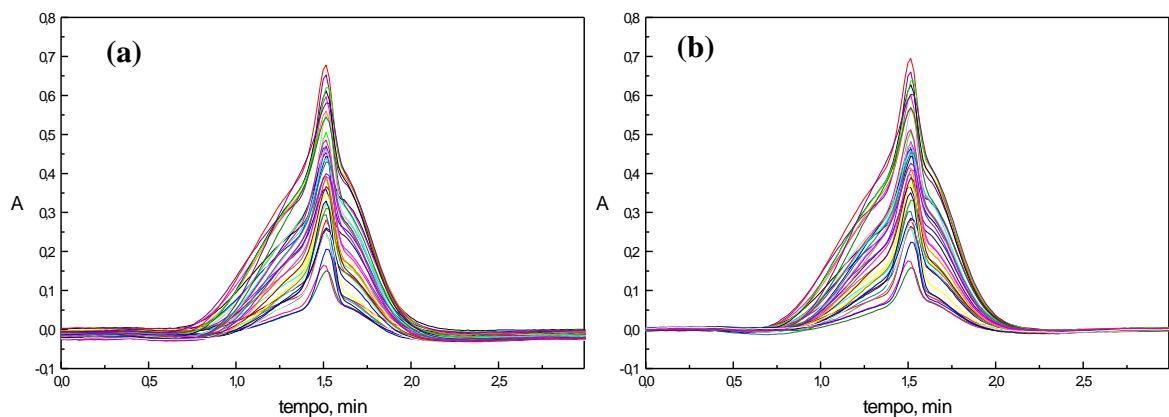
um desses três picos e o valor médio desse número de pontos é utilizado subseqüentemente para definir onde inicia e termina o pico FIA.

A região que define cada pico FIA foi encontrada, tornando os máximos dos picos como referência, sendo o início do pico 66 pontos (46,2 s) antes do máximo e o final a 53 pontos (37,1 s) após o máximo, tendo cada pico um total de 120 pontos. As leituras foram realizadas de 0,7 s em 0,7 s.

Objetivando melhorar a qualidade dos modelos por PLS [145] e a velocidade dos cálculos, realizou-se a tentativa de encontrar um número menor de pontos, para cada pico FIA, que minimize os erros estimados de modelo. Utilizando o Simplex [146] para encontrar o número de pontos antes e após o máximo dos picos mínimos para os cálculos por PLS. Após 25 testes empregando a metodologia Simplex, para determinação de modelos, o ganho na minimização dos erros na previsão foi de menos de 0,05% e o ganho no tempo dos cálculos por PLS foi de menos de 10 s, não justificando o emprego de um número menor de pontos por pico FIA, já que a otimização teria que ser novamente realizada para cada nova calibração por PLS.

A determinação de zinco e níquel usando os perfis dos picos FIA com leitura em 595 nm torna-se possível principalmente devido as diferenças nas cinéticas de retenção e eluição dos dois íons metálicos, uma vez que num pico FIA as informações sobre o zinco e o níquel estão totalmente sobrepostas.

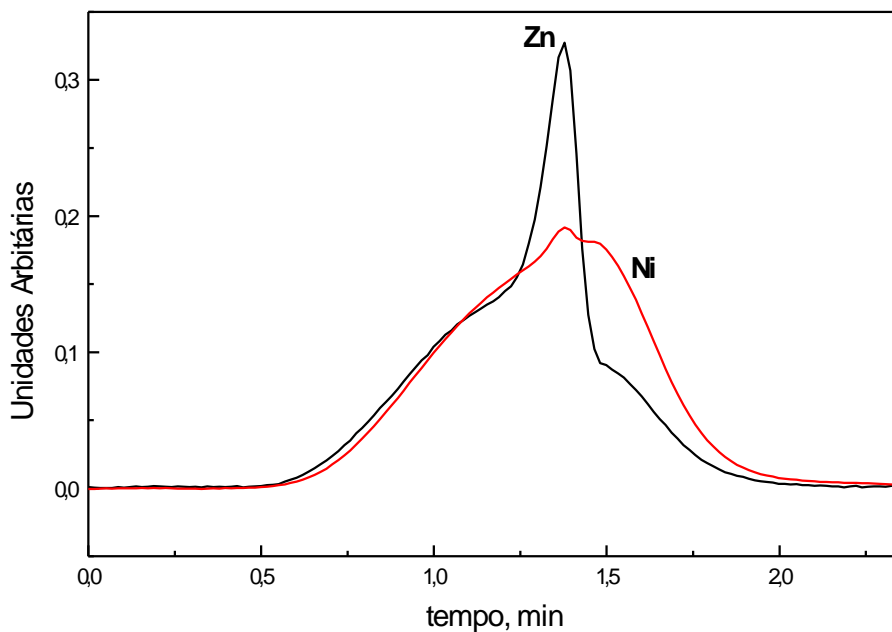
A Figura 54 mostra os perfis dos picos FIA antes (a) e após a correção da linha de base.



**Figura 54.** Picos usados na calibração por PLS (a) antes e (b) após a correção da linha de base.

A Figura 54 mostra que é impossível notar as diferenças entre os perfis dos sinais transientes relacionadas com as diferentes cinéticas de retenção e eluição do zinco e níquel.

As curvas da Figura 55 mostram os gráficos dos *loadings weights* calculados usando PLS1 (onde um modelo diferente é feito para um dos analitos) para o zinco e para o níquel. Esse gráfico fornece informações sobre o perfil do pico FIA estimados para quando cada analito está puro em solução [132]. Esse gráfico ilustra mais claramente as diferenças nas cinéticas de retenção e eluição entre zinco e níquel.

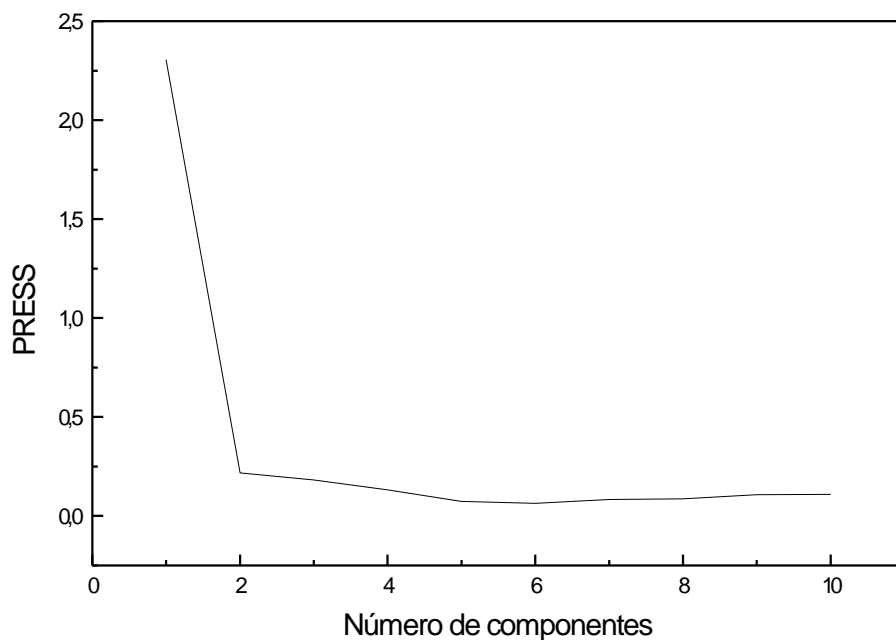


**Figura 55.** Perfis dos picos FIA para zinco e níquel baseado no primeiro loading weight do PLS1.

O algoritmo para PLS2 (onde os dois analitos são modelados em uma única etapa) obteve resultados mais satisfatórios que o PLS1, sendo o primeiro empregado nos cálculos. O número de componentes ótimo foi estimado pelo processo de validação cruzada completa (full cross-validation) e pelo valor da soma residual quadrática (PRESS) calculado para cada componente.

O número de componentes ótimo encontrado pelo algoritmo desenvolvido foi igual a 5, concordando com o número de componentes calculado empregando o programa The Unscrambler 6.0. Dois dos componentes principais estão relacionados com a presença de dois íons metálicos diferentes e outros fatores estão relacionados com a não linearidade

ou outras condições não específicas. A curva da Figura 55 ilustra o gráfico de PRESS versus o número de variáveis latentes.



**Figura 56.** PRESS versus o número de componentes empregados.

A raiz da média dos erros quadráticos da previsão (RMSEP, do inglês Root Mean Square Errors of Prediction) calculada a partir das amostras sintéticas, não utilizadas no processo de calibração, foi igual a 0,033 e 0,028 para o zinco e níquel respectivamente.

O método proposto permitiu uma drástica redução de consumo de amostras (<math>1\mu\text{g}</math> de zinco por determinação) e de eluente (700  $\mu\text{L}</math> por determinação) minimizando a geração de descarte.$

Pode-se realizar mais de 100 determinações de zinco e níquel mantendo a sensibilidade, precisão e exatidão dos resultados.

A precisão do método foi avaliada pelas replicatas realizadas nas amostras sintéticas e o desvio padrão relativo foi menor que 5% em todos os casos. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com os obtidos por ICP-AES e concordaram com 95% de confiabilidade (teste *t-pareado*). As concentrações de zinco e níquel previstas para amostras sintéticas são apresentadas na Tabela 7.

**TABELA 7.** Concentrações de zinco e níquel calculadas para amostras sintéticas em duplicata.

Zn, $\mu\text{g mL}^{-1}$		Ni, $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Real	Previsto	Real	Previsto
0.80	0.79	0.50	0.47
0.80	0.79	0.80	0.76
0.50	0.47	0.80	0.81
0.50	0.46	0.50	0.49

A faixa analítica de trabalho para determinação de zinco e níquel foi de 0,30-1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , podendo ser estendida a partir da otimização dos volumes das soluções amostras empregadas.

O sistema possibilitou a determinação de até 43 amostras por hora, com boa sensibilidade.

### **VIII.3.3 - Conclusões**

O método proposto possibilitou a determinação simultânea de zinco e níquel com comprimento de onda e vazão fixos com boa precisão e exatidão.

O algoritmo desenvolvido para os cálculos por PLS apresentou resultados idênticos aos apresentados por programas de calibração multivariada comerciais, possibilitando a determinação de zinco e níquel em tempo real.

O sistema desenvolvido mostrou-se simples, não necessitando do uso de válvulas solenóides para o gerenciamento das soluções, nem sistema de sincronização com a bomba peristáltica.

## IX. POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES

Uma possível aplicação das metodologias de análise desenvolvidas para determinação de zinco em sistema FI-EFS empregando padrão único é a determinação indireta de oxidantes totais em soluções, através da quantificação do zinco liberado quando as soluções-amostra percolam uma coluna redutora de Jones [147,148]. A coluna redutora de Jones consiste em um tubo contendo amálgama de zinco, sendo que quando uma solução oxidante a atravessa esses oxidantes são reduzidos e é liberado zinco(II) da coluna de Jones, que pode ser quantificado pelo sistemas FI-EFS descrito.

Dentre as potencialidades relacionadas ao sistema FI-EFS desenvolvido, destaca-se o uso do método da adição padrão empregando uma única solução de referência, baseando-se em injeções seqüenciais do padrão após a injeção de uma alíquota da amostra. Outra possibilidade é o emprego do metodologia das injeções seqüências em sistema FI-EFS aplicando metodologia semelhante a adição padrão, sendo que ao invés do padrão são realizadas adições da amostra.

No sistema FI-EFS desenvolvido é possível realizar titulações espectrofotométricas de complexação, no qual a mistura entre o analito e o titulante (mascarante) é realizada em linha por amostragem binária, sendo a concentração do analito relacionada com o volume do titulante necessário para que o sinal analítico registrado seja nulo, e com a concentração do titulante.

A automatização dos sistemas desenvolvidos pode ser melhorada pelo desenvolvimento de rotinas que ajustem as condições de análise, como volume

injetado do analito, à faixa de concentração dos analitos automaticamente, possibilitando que o sistema tome decisões.

Em relação à aplicação do PLS para análise multicomponentes, uma das maiores dificuldade foi o quantidade de soluções de referência necessárias para construção do modelo, exigindo muito tempo para o preparo dessas soluções a cada nova análise objetivando ajustar o modelo às condições experimentais. Todavia, hoje em dia estão disponíveis métodos quimiométricos que permitem a recalibração do modelo com o uso de uma pequena quantidade de soluções de referência, permitindo o uso do mesmo modelo em diferentes dias e condições de análise, sem a necessidade da preparação de um extenso número de soluções de referência [149-151].



## X. CONCLUSÕES

O sistema FI-EFS desenvolvido mostrou-se extremamente versátil, eficiente e preciso, possibilitando o seu uso em uma série de metodologias diferentes de análise sem grandes alterações nas suas configurações.

Os estudos da dispersão em sistemas FI-EFS levantaram novos conceitos e elucidaram conceitos já estabelecidos sobre o caráter integrativo inerente aos sistemas FI-EFS.

As metodologias de análise desenvolvidas para construção de curvas de calibração empregando uma única solução de referência em sistema FI-EFS apresentaram boa precisão e exatidão a um nível de 95% de confiabilidade. Essas metodologias são originais e podem ser aplicadas a qualquer outro sistema FI-EFS, empregando diferentes reagentes cromogênicos, suportes sólidos e analitos na determinação em diferentes amostras.

O uso de técnicas como quimiométricas como o PLS, aliadas ao conhecimento químico do sistema, melhoraram a robustez das determinações por FI-EFS, além de possibilitar a determinação multicomponentes empregando equipamentos relativamente simples.

## XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Luque de Castro, M.D.L.; Tena, M.T., *Hyphenated Flow-Injection Systems and High Discrimination Instruments*, *Talanta*, 42, 151, 1995.
- [2] Fang, Z., *Flow Injection Analysis Separation and Preconcentration*, VCH: Weinheim, 1 ed., 1993.
- [3] Kuban, V., *Continuous Precipitation Techniques in Flow-Injection Analysis- A Review*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 346; 873, 1993.
- [4] Carbonell, V. ; Salvador, A.;de La Guardia, M., *Literature Survey of the Online Preconcentration Flow-Injection Atomic Spectrometric Analysis*, *Fres. J. Anal. Chem.*, 342, 529, 1992.
- [5] Luque de Castro, M.D.L.; Valcárcel, M., *Coupling of Continuous Separation Techniques with Unsegmented Flow Systems*, *Anal. Chim. Acta*, 261, 423, 1992.
- [6] Weltz, B., *Flow-Injection Online Sorbent Extraction, Preconcentration and Separation for Flame and Graphite-Furnace Atomic-Absorption Spectrometry*, *Mikrochem J.*, 45, 162, 1992.
- [7] Luque de Castro, M.D.L.; Valcárcel, M., *New Approaches to Coupling Flow-Injection Analysis and Liquid Chromatography*, *J. Chromatogr.*, 600, 183, 1992.
- [8] Kuban, K., *Simultaneous Determination of Several Components by Flow-Injection Analysis*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 23, 15, 1992.
- [9] Clack, G.D.; Whiteman, D. A.; Christian, G.D.; Ruzicka, J., *Sample Handling and Pretreatment using Flow-Injection Analysis*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 21, 367, 1990.

- [10] Ruzicka, J.; Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis*, 2<sup>a</sup> ed., Wiley, Nova York, 1988.
- [11] Teixeira, L.S.G., *Aplicações de 1-2-(tiazolilazo)-2-naftol Imobilizado em Sílica Funcionalizada C<sub>18</sub> em Espectrofotometria em Fase Sólida*, Tese de Doutorado, UFBA, Salvador, 2000.
- [12] Yoshimura, K.; Waki, H.; Ohashi, S., *Ion-Exchanger Colorimetry – I. Micro Determination of Chromium, Iron, Copper and Cobalt in Water*, *Talanta*, 23, 449, 1976.
- [13] Lobinski, R.; Marczenko, Z., *Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 23, 55, 1992.
- [14] Yoshimura, K.; Waki, H., *Ion-Exchanger Phase Absorptiometry for Trace Analysis*, *Talanta*, 32, 345, 1985.
- [15] Brykina, G.D.; Marchenko, D.Y.; Shpigun, O.A., *Solid Phase Spectrophotometry*, *J. Anal. Chem.*, 50, 440, 1995.
- [16] Capitan, F.; Manzano, E.; Vilchez, J.L. ; Capitan-Vallvey, L.F., *Determination of Trace Aluminum in Natural-Waters by Ion-Exchanger Fluorimetry*, *Anal. Sciences*, 5, 549, 1989.
- [17] Yoshimura, K.; Toshimitsu, Y.; Ohashi, S., *Ion-Exchanger Colorimetry. 6-Micro-Determination of Nickel in Natural-Water*, *Talanta*, 27, 693, 1980.
- [18] Narayanaswam, R.; Russel, D.A.; Sevilla, F., *Optical-Fibre Sensing of Fluoride Ions in a Flow-Stream*, *Talanta*, 35, 83, 1988.
- [19] Yoshimura, K.; Waki, H.; Ohashi, S., *Ion-Exchanger Colorimetry. 6-Micro-Determination of Zinc in Water*, *Talanta*, 25, 579, 1978.
- [20] Shinizu, T.; Nukatsuka, I.; Ohzeki, K., *Extraction of Trace Amounts of Copper(II) on a Membrane Filter Using 5,10,15,20-tetraphenyl-*

- 21H,23H,porphinetetrasulfonic acid for Determination by Solid-Phase Spectrophotometry, Anal. Sciences, 15,153, 1999.*
- [21] Lancy, N.; Christian, G.D., Ruzicka, J., *Enhancement of Flow Injection Optosensing by Sorbent Extraction and Reaction Rate Measurement, Anal. Chem., 62, 1482, 1990.*
- [22] Yoshimura, K.; Waki, H., *Enhancement of Sensitivity of Ion-Exchanger Absorptiometry by using a Thick Ion-Exchanger Layer, Talanta, 34, 289, 1987.*
- [23] Yoshimura, K.; Ohashi, S., *Ion-Exchanger Colorimetry. 6- Micro-Determination of Nickel in Natural-Water, Talanta, 27, 693, 1980.a*
- [24] Yoshimura, K.; Nigo, S.; Tarutani, T., *Ion-Exchanger Colorimetry. 8- Micro-Determination of Copper in Natural-Water, Talanta, 29, 173, 1982.*
- [25] Ohzeki, K.; Minorikawa, M.; Yokota ; Nakatsuka, I.; Ryoei, I., *Enrichment of Trace Amounts of Copper as Chelate Compounds using a Finely Divided Ion-Exchange Resin, Analyst, 115, 23, 1990.*
- [26] Ohzeki, K.; Tatehana, M.; Nukatsuka, I.; Ishida, R., *Determination of Humic-Acid and Iron(III) by Solid-State Spectrophotometry to Study their Interactions, Analyst, 116, 199, 1991.*
- [27] Capitan-Vallvey, L.F.; Lopez-Rodrigues, S.; de Orbe, I.; Avidad, R., *Determination of Erythrosine in Glance Cherries by Solid Phase Spectrophotometry, Quim. Anal., 17, 125,1998.*
- [28] Morosanova, E.I.; Marchenko, D.V.; Zolotov, Y.A., *Test Determination of Reducing Agents using Noncovalently Immobilized Quinonimine Indicators, J. Anal. Chem., 51, 76, 200.*

- [29] Lázaro, F.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M., *Integrated Reaction, Spectrophotometric Detection in Unsegmented Flow Systems*, *Anal. Chim. Acta*, 214,217, 1988.
- [30] Shima, C.; Nukatuka, I.; Ohzeki, K., *Solid-Phase Spectrophotometric Determination of Cobalt (II) in Tap Water and Beverage using 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-[N-propyl-N-(3-sulfopropyl)]amino phenol after Preconcentration as the 1-(2-Pyridylazo)-2-naphtol Complex*, *Anal. Sciences*, 14, 337, 1998.
- [31] Abbas, M.N.; Mostafa, G.A., *Determination of Traces of Nitrite and Nitrate in Water by Solid Phase Spectrophotometry*, *Anal. Chim. Acta*, 410, 185, 2000.
- [32] Farag, A.B.; Abbas, M.N.; Al-Assy, NB., *Semiquantitative and Quantitative – Determination of Trace Amount of Phosphate Ion in Water using Polyurethane Foam Thin-Layer*, *Anal. Lett.*, 22, 1765, 1989.
- [33] Capitan-Vallvey, L.F.; Valencia M.C.; Mirón, G., *Flow-Injection Method for Determination of Tin in Fruit Juices using Solid Phase Spectrophotometry*, *Anal. Chim. Acta*, 289, 365, 1994.
- [34] Medina, AR.; de Cordova, M.L.F.; Diaz, A.M., *Flow-Through Solid Phase UV Spectrophotometric Determination of Amoxyeillin*, *Anal. Lett.*, 34, 729, 1999.
- [35] Capitan-Vallvey, L.F.; Ramos, M.D.F.; Paya, I.D.O.; Castaneda, R.A.; *Determination of Synthetic Colorants 4-Phenylazoaniline and Fast Yellow AB in Mixtures by Solid Phase Spectrophotometry*, *Quim. Anal.*, 16, 41, 1997.

- [36] Abollino, O.; Aceto, M.; Sarzanini, C.; Mentast, E., *The Retention of Metal Species by Different Solid Sorbents-Mechanism for Heavy Metal Speciation by Sequential Three Column Uptake*, *Anal. Chim. Acta*, 411, 223, 2000.
- [37] Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D., *Integration of Reaction (Retention) and Spectroscopic Detection in Continuous-Flow Systems*, *Analyst*, 115, 699, 1990.
- [38] Ruzicka, J.; Hansen, E.H., *Homogeneous and Heterogeneous Systems – Flow Injection Analysis: Today and Tomorrow*, *Anal. Chim. Acta*, 214, 1, 1988.
- [39] Martinez-Avila, R.; Carbonell, V.; Salvador, A; de la Guardia, M., *Direct FIA-AS Determination of Potassium and Magnesium in Cements Samples by use of Slurries Approach*, *Talanta*, 40, 107, 1993.
- [40] Matsuoka, S.; Tennichi, Y.; Takehara, K.; Yoshimura, K., *Flow Analysis of Micro Amounts of Chromium(VI) and Chromium(III) in Natural Water by Solid Phase Spectrophotometry using Diphenylcarbazide*, *Analyst*, 124, 787, 1999.
- [41] Alonso, E.V.; Pavon, J.M.C.; Rios, A; Valcárcel, M., *Automatic Determination of Cobalt at Submicrogram per millilitre level using Flowthrough Spectrophotometric Sensor*, *Talanta*, 43, 1941, 1996.
- [42] Ayora-Canada, M.S.; Pascual-Reguera, M.I.; Molina-Diaz, A, *Continuous Flow-through Solid Phase Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Zinc*, *Anal. Chim. Acta*, 375, 71, 1998.

- [43] Barrales, P.O.; de Córdova, F.; Díaz, A.M., *Indirect Determination of Ascorbic Acid by Solid Phase Spectrophotometry*, *Anal. Chim. Acta*, 360, 143, 1998.
- [44] Barrales, P.O.; Díaz, A.M.; Pascual-Reguera, M.I.; Capitan-Vallvey, L.F., *Solid Phase Spectrophotometric Determination of Hydrazine at Sun – ng mL<sup>-1</sup> Level*, *Anal. Chim. Acta*, 353, 115, 1997.
- [45] Pascual-Reguera, M.I.; Díaz, M.A.; Ramos-Matos, N.; *Determination of Traces of Vanadium with 5-Bromosalicylhydroxamic Acid by Solid Phase Spectrophotometry*, *Anal. Lett.*, 24, 2245, 1991.
- [46] Reis, B.F.; Rocha, F.R.P.; Teixeira, L.S.G.; Costa, A.C.S.; Korn, M., *Construção de uma Cella de Fluxo para Medidas por Espectrofotometria em Fase Sólida*, *Quim. Nova*, 23, 116, 2000.
- [47] Cheng, K.L.; Ueno, K.; Iamamura, T., *Handbook of Organic Analytical Reagents*, 2<sup>a</sup> ed., CRC, Boca Raton, 1992.
- [48] Hovind, H.R., *Thiazolylazo Dyes and their Applications in the Analytical Chemistry*, *Analyst*, 100, 1196, 1975.
- [49] Ferreira, S.L.C; Araújo, N.M.L.; Santos, A.B.; Dantas, A.F.; Costa, A C.S.C., *Spectrophotometric Determination of Zinc in Copper-Alloys with TAN*, *Mikrochim. Acta*, 118, 123, 1995.
- [50] Ferreira, S.L.C; Nano, R.M.W., *Use of 1-(2-thiazolylazo)-2-naftol in Rapid Determination of Iron in Geological Matrices*, *Talanta*, 12, 195, 1965.
- [51] Goakar, U.G.; Eshaw, M.C., *Rapid Spectrophotometric Determination of Cerium(III) with 4-(2-thiazolylazo)-resorcionol and 1-(2-Thiazolilazo)-2-naphthol*, *Analyst*, 111, 1393, 1986.

- [52] Kawase, A.; *Derivatives of 2-(2-thiazolylazo)phenol as Analytical Reagents – VII. Spectrophotometric Determination of Zinc with 1-(2-Thiazolilazo)-2-naphthol*, *Talanta*, 12, 195, 1965.
- [53] Teixeira, L.S.G.; Rocha, F.R.P.; Korn, M.; Reis, B.F.; Ferreira, S.L.C.; Costa, A.C.S.; *Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Zinc in Pharmaceutical Preparations*, *Anal. Chim. Acta*, 383, 309, 1999.
- [54] Bergamin F<sup>o</sup>, H.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G., *A New Device for Improving Sensitivity and Stabilization in Flow Injection Analysis*, *Anal. Chim. Acta*, 97, 427, 1978.
- [55] Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D., *Flow-Injection Analysis: Principles and Applications*, Ellis Horwood, Chincheter, 1987.
- [56] Stewart, K.K., *Flow Injection Analysis – New Tool for Old Assay – New Approach to Analytical Measurements*, *Anal. Chem.*, 55, 931A, 1983.
- [57] Ruzicka, J.; Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis. Part X. Theory, Techniques and Trends*, *Anal. Chim. Acta*, 99, 37, 1978.
- [58] Hovai, G.; Pungor, E., *Theoretical Backgrounds of Flow Analysis*, *Crit. Rev. Anal Chem.*, 17, 231, 1987.
- [59] Vanderslice, J.T.; Stewart, K.K.; Rosenfeld, A.G.; Higgs, D.J., *Laminar Dispersion in Flow-Injection Analysis*, *Talanta*, 28, 11, 1981.
- [60] Vanderslice, J.T.; Rosenfeld, A.G.; Beecher, G.R., *Laminar-Flow Bolus Shapes in Flow Injection Analysis*, *Anal. Chim. Acta*, 179, 119, 1986.
- [61] Gerhardt, G.; Adams, R.N.; *Determination of Diffusion Coefficients by Flow Injection Analysis*, *Anal. Chim. Acta*, 59, 2922, 1987.
- [62] Yoshimura, K., *Implementation of Ion-Exchanger Absorptiometric Detection in Flow Analysis Systems*, *Anal. Chem.*, 54, 2922, 1987.



- [63] Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D.; *Flow-Throgh (Bio)Chemical Sensors – Plenary Lecture, Analyst*, 118, 593, 1993.
- [64] Jacintho, A.O.; Arruda, M.A.Z.; Zagatto, E.A.G.; Reis, B.F., *Analytical Balance as a Detector in Flow Analysis, Anal. Chim. Acta*, 258, 129, 1992.
- [65] Reis, B.F., *Análise por Injeção em Fluxo: Vinte Anos de Desenvolvimento, Quim. Nova*, 19, 51, 1996.
- [66] Bergamim F<sup>o</sup>, H.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; *Analytical Balance as a Detector in Flow Analysis, Anal. Chim. Acta*, 261, 345, 1992.
- [67] Reis, B.F.; Giné, M.F.; Zagatto, E.A.G.; Lima, J.L.F.C., *Muticommution in Flow Analysis. Part I. Binary Samples: Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plants Digests, Anal. Chim. Acta*, 293, 129, 1994.
- [68] Martelli, P.B.; Reis, B.F.; Kronka, E.A.M.; Bergamin F<sup>o</sup>, H.; Zagatto, E.A.G.; Costa Lima, J.L.F.; Araújo, A.N., *Multicommution in Flow Analysis 2. Binary Sampling for Spectrofotometric Determination of Nickel, Iron and Chromium in Steel Alloys, Anal. Chim. Acta*, 308, 397, 1995.
- [69] Reis, B.F.; Bergamin F<sup>o</sup>, H., *Quim. Nova*, 16, 517, 1993.
- [70] Kronka, E.A.M.; Reis, B.F.; Vieira, J.A.; Blanco, T.; Gervasio, A.P.G., *Multicomutação e Amostragem Binária em Análise Química em Fluxo. Determinação Espectrofotométrica em Águas Naturais, Quim. Nova*, 20, 372, 1997.
- [71] Reis, B.F.; Guiné, M.F.; Tumang, C.A, *Amostragem Binária em Sistema de Análise Química em Fluxo Empregando a Força Gravitacional para Movimentar as Soluções. Determinação Espectrofotométrica de Cloreto, Quim. Nova*, 19, 116, 1996.

- [72] Paim, A.P.S.; Kronka, E.A.M.; Reis, B.F., Determinação Espectrofométrica de Ácido Ascórbico em Fármacos Empregando Amostragem Binária em Fluxo, *Quim. Nova*, 21, 47, 1998.
- [73] Kronka, E.A.M.; Reis, B.F.; Korn, M.; Bergamin F<sup>o</sup>, H., *Multicommutation in Flow Analysis. Part 5. Binary Sampling for Sequential Spectrophotometric Determination of Ammonium and Phosphate in Plants Digests*, *Anal. Chim. Acta*, 334, 287, 1996.
- [74] Vieira, J.A.; Reis, B.F.; Kronka, E.A.M.; Paim, A.D.S.; Giné, M.F., *Multicommutation in Flow Analysis. Parts 6. Binary Sampling for a Wide Range Turbidimetric Determination of Sulphate in Plants Digests*, *Anal. Chim. Acta*, 386, 129, 1999.
- [75] Lapa, R.A.S.; Costa Lima, J.L.F.; Reis, B.F.; Santos, J.L.M.; Zagatto, E.A.G., *A Multicommutated Flow System with on-line Compensation of the Schillieren Effect Applied to the Spectrophotometric Determination of Pindolol*, *Anal. Chim. Acta*, 366, 209, 1998.
- [76] Kronka, E.A.M.; Reis, B.F., *Spectrophotometric Determination of Iron and Aluminium in Plants Digests Employing Binary Sampling in Flow Analysis*, *Quim. Anal.*, 17, 15, 1998.
- [77] Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, 4<sup>a</sup> ed., W.H. Freeman, Nova York, 1995.
- [78] Ruzicka, J.; Hansen, E.; Mosbaek, H., *Flow Injection Analysis .9. New Approach to Continuous-Flow Titrations*, *Anal. Chim. Acta*, 92, 235, 1977.
- [79] Nagy, G.; Feher, Z.; Toth, K.; Pungor, E., *Novel Titration Technique for Analysis of Streamed Samples - Triangle-Programmed Titration Technique*

- .3. *Titrations With Electrically Generated Bromine*, *Anal. Chim. Acta*, 100, 181, 1978.
- [80] Korn, M.; Gouveia, L.F.B.P.; de Oliveira, E.; Reis, B.F., *Binary Search in Flow Titration Employing Photometric End-Point Detection*, *Anal. Chim. Acta*, 313, 177, 1995.
- [81] Gomez, F.B.; Reig, F.B.; Falco, P.C., *A Chemometric study of the Simultaneous Determination of Calcium and Magnesium in Natural Waters*, *Talanta*, 49, 155, 199.
- [82] Rio-Segade, S.; Bendicho, C.; *Determination of Total and Inorganic Mercury in biological and Environmental Samples with On-line Oxidation Coupled to Flow Injection-Cold Vapor Atomic Spectrometry*, *Spectrochim. Acta*, 54, 1129, 1999.
- [83] Li, Z.J.; Zhu, Z.Z.; Jan, T.; Pan, J.M., *Synthesis of meso-tetra-(3,5-dibromo-4-hydroxylphenyl)-porphyrin and its Application to Second-Derivative Spectrophotometric Determination of Lead in Clinical Samples*, *Analyst*, 124, 1227, 1999.
- [84] Vereda, E.; Rios, A.; Valcarcel, M., *Simultaneous Automatic Determination of Trace Amounts of Copper and Cobalt by use of Flow-Through Sensor and First-Derivative Spectrophotometry*, *Analyst*, 122, 85, 1997.
- [85] Schindler, R.; Lendl, B.; Kellner, R., *Simultaneous Determination of alpha-amylase and amyloglucosidase Activities using Flow Injection Analysis with Fourier Transform Infrared Spectroscopic Detection and Partial Least Squares Treatment*, *Anal. Chim. Acta*, 366, 35, 1998.

- [86] Tryzell, R.; Karlberg, B., *Calibration Methods for Determination of Ammonium and excess acid in Kjeldahl Digests by Flow Injection Analysis*, *Anal. Chim. Acta*, 343, 183, 1997.
- [87] Arruda, M.A.Z.; Gallego, M.; Varcácel, M. *Flow-Through Microwave Digestion System for Determination of Aluminum Shellfish by Electrothermal Atomic Absorption Spectrophotometric*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 10, 501, 1995.
- [88] Almeida, M.D.; Colta, L.K.C.; Santelli, R.E.; de la Guardia, M., *Flow-Injection Microwave Assisted Dissolution of Silicate Rocks for Magnesium Determination by Flame Absorption Spectrometry*, *J. At. Spectrom.*, 6, 457, 1991.
- [89] Karanassios, V.; Li, F.H.; Liu, B.; Salin, E.D., *Rapid Stopped-Flow Microwave Assisted Dissolution of Silicate Rocks for Magnesium Determination by Flame Absorption Spectrophotometry*, *J. At. Spectrom.*, 6, 457, 1991.
- [90] de la Guardia, M.; Carbonelli, V.; Rubio, A.M.; Salvador, A., *On-line Microwave-Assisted Digestion of Solid Samples for their Flame Atomic Spectrophotometric Analysis*, *Talanta*, 40, 1609, 1993.
- [91] Burguera, J.L.; Burguera, M.; Bonetto, M.R., *In Vivo Uptake and On-line Measurement of Cobalt in Whole Blood by Microwave-Assisted Mineralization and Flow Injection Electrothermal Atomic Absorption Spectrophotometric*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 10, 343, 1995.
- [92] Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Recent Developments in Flow-Injection Analysis - Gradient Techniques and Hydrodynamic Injection*, *Anal. Chem.*, 145, 1, 1983.

- [93] Olsen, S.; Ruzicka, J.; Hansen E.H., *Gradient Techniques In Flow-Injection Analysis - Stopped-Flow Measurement of the Activity of Lactate-Dehydrogenase with Electronic Dilution*, *Anal. Chim. Acta*, 136, 101, 1982.
- [94] Reis, B.F.; Martelli, P.B.; Menegário, A.A.; Giné, M.F., *Sistema de Análise Química por Injeção em Fluxo Controlada por Microcomputador para Diluição Automática em Espectrofotometria de Absorção Atômica*, *Quim. Nova*, 16, 109, 1993.
- [95] Lapa, R.A.S.; Costa Lima, J.L.F.; Santos, J.L.M., *Fluorimetric Determination of Isoniazid by Oxidation with Cerium(III) in Multicommutated Flow System*, *Anal. Chim. Acta*, 419, 17, 2000.
- [96] Chen, H.W.; Fang, Z.L., *Combination of Flow Injection with Capillary Electrophoresis. Part 5. Automated Preconcentration and Determination in Human Plasma*, *Anal. Chim. Acta*, 394, 13, 1999.
- [97] Jorgensen, U.U.; Nielsen, S.; Hansen, E.H., *Dilution Methods in Flow Injection Analysis, Evaluation of Differences Approaches as Exemplified for the Determination of Nitrosyl in Concentrated Sulphuric Acid*, *Anal. Lett.*, 31, 2181, 1998.
- [98] Rocha, F.R.P.; Martelli, P.B.; Frizzarin, R.M.; Reis, B.F., *Automatic Multicommutation Flow System for Wide Range Spectrophotometric Calcium Determination*, *Anal. Chim. Acta*, 366, 45, 1998.
- [99] Araújo, M.C.U.; Pasquini, C.; Bruns, R.E., *Um Sistema Simples de Adições Padrão em Análise por Injeção em Fluxo*, *Quim. Nova*, 16, 182, 1993
- [100] Silva, E.C.; Araújo, M.C.U.; Honorato, R.S.; Costa Lima, J.L.F.; Zagatto, E.A.G.; Brienza, S.M.B., *Standard Additions in Flow Analysis based on*

- Merging Zones and Gradient Exploitation: Application to Copper Determination in Spirits, Anal. Chim. Acta*, 319, 153, 1996.
- [101] Silva, E.C.; Martins, V.L.; Araújo, A.F.; Araújo, M.C.U., *Implementation of Generalized Standard Addition Method in a Flow Injection System using Merging-Zones and Gradients Exploitation, Anal. Sciences*, 15, 1235, 1999.
- [102] Vêras, G.; Honorato, R.S.; Sarinho, V.T.; Araújo, M.C.U., *A Single for Non-linear Calibration in Flow-Injection Spectrophotometry. Kinetic Determination of Total Protein in Blood Serum, Anal. Chim. Acta*, 401, 215, 1999.
- [103] Rocha, F.R.P.; Nóbrega, J.A., *Efeito Scilieren em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo, Quim. Nova*, 19, 1996.
- [104] Miller, J.C.; Miller, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry*, Elly Horwood, 1984.
- [105] Ruzicka, J.; Stewart, J.W.B.; Zagatto, E.A.G., *Flow Injection Analysis .4. Stream Sample Splitting and its Application to Continuous Spectrophotometric Determination of Chloride in Brackish Waters, Anal. Chim. Acta*, 81, 387, 1976.
- [106] Kuban, V. *Simultaneous Determination of Several Components by Flow-Injection Analysis, Crit. Rev. Anal. Chem.*, 23, 15, 1992.
- [107] Abbas, M.N.; Mostafa, G.A., *Determination of Traces of Nitrite and Nitrate in Water by Solid Phase Spectrophotometry, Anal. Chim. Acta*, 410, 185, 2000.
- [108] Medina, A.R.; de Córdova, M.L.F.; Díaz, A.M., *A Very Simple Resolution of the Mixture of Paracetamol and Salicylamide by Flow Injection-Solid Phase Spectrophotometry, Anal. Chim. Acta*, 394, 149, 1999.

- [109] Capitan-Vallvey, L.F.; Ramos, M.D.F.; Paya, I.D.O.; Castaneda, R.A., *Determination of the Synthetic Colorants 4-phenylazoaniline and Fast Yellow AB Mixtures by Solid Phase Spectrophotometry*, *Quim. Anal.*, 16, 41, 1997.
- [110] Bosque-Sendra, J.M.; Valencia, M.C.; Boundra, S., *Speciation of Vanadium (IV) and (V) with Eriochrome Cyanine R in Natural Water by Solid Phase Spectrophotometry*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360, 31, 1998.
- [111] Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, S.N.; Deming, Y.; Kaufman, L., *Chemometrics: a textbook*, 1998.
- [112] Bruns, R.E.; Faigle, J.F.G., *Quimiometria*, *Quim. Nova*, 1995.
- [113] Pascual-Reguera, M.I.; Diaz, A.M.; Pacheco, M.C.C.; Fernandes, M.C.A.; Cordova, M.L.F.; Capitan-Vallvey, L.F., *Determination of Tungsten with Pyrocatechol Violet by 1<sup>st</sup>-derivate Solid Phase Spectrophotometry*, *Mikrochim. Acta*, 112, 225, 1994.
- [114] Capitan-Vallvey, L.F.; Deorbe, J.; Valencia, M.C.; Berzasnevado, J.J., *Determination of Sulphathiazole in Presence of Sulphametazine by 1<sup>st</sup> derivate Solid Phase Spectrophotometry*, *Mikrochim. Acta*, 112, 225, 1994.
- [115] Capitan-Vallvey, L.F.; Deorbe, I.; Valencia, M.C.; Berzasnevado, J.J., *Implementation of Ultraviolet Solid Phase Spectrophotometry by use of Derivative Techniques*, *Anal. Chim. Acta*, 282, 75, 1993.
- [116] Capitan-Vallvey, L.F.; Fenandez, M.D.; de Orbe, I.; Avidad, R., *Simultaneous Determination of Colorants Tartrazine, Ponceau 4R and Sunset Yellow FCF in Foodstuff by Solid Phase Spectrophotometry using Partial Least Squares Multivariate Calibration*, *Talanta*, 47, 861, 1998.

- [117] Capitan-Vallvey, L.C. ; Fenandez, M.D.; de Orbe, I.; Vilchez, J.L.; Avidad, R., *Simultaneous Determination of Colorants Sunset Yellow and Quinoline by Solid Phase Spectrophotometry using Partial Least Squares Multivariate Calibration*, *Analyst*, 122, 351, 1997.
- [118] Molina, M.F.; Mounir, N.; Bosquesendra, J.M., *Determination of Zinc in Environmental Samples by Solid Phase Spectrophotometry: Optimization and Validation Study*, *Anal. Sciences*, 14, 791, 1998.
- [119] Nechar, M.; Molina, M.F.; Bosque-Sendra, J.M., *Application of Doehlert Optimization and Factorial Designs in Developing and Validating a Solid Phase Spectrophotometric Determination of Trace Level of Cadmium*, *Anal. Chim. Acta*, 383, 117, 1999.
- [120] Bosque-Sendra, J.M.; Nechar, M.; Rodriguez, L.C., *Decision Protocol for Checking Robustness with Previous Outlier Detection in Validating of Analytical Methods*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 365, 480, 1999.
- [121] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Riba, J., *Multicomponent Analysis of Concentrated-Solutions by Flow Injection Analysis with Zone Sampling and Partial Least Squares Resolution*, *Anal. Chim. Acta*, 259, 219, 1992.
- [122] Hernandez, O.; Jimenez, A.J.; Jimenez, I.; Arias, J.J., *Evaluation of Multicomponents Flow-Injection Analysis Data by use of Partial Least Squares Calibration Method*, *Anal. Chim. Acta*, 310, 53, 1995.
- [123] Bro, R., *Multi Way Analysis in Food Industry: Models, Algorithms and Applications*, Tese PhD, University of Amstedam, Netherlands, 1998.  
(<http://models.kvd.dk.user/rasmus/thesis/thesis.html>)



- [124] Whitman, D.A.; Seasholtz, M.B.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.; Kowalski, B.R., *Double-Injection Flow Analysis using Multivariate Calibration Multicomponent Analysis*, *Anal. Chem.*, 63, 775, 1991.
- [125] Schongarth, K.; Hitzmann, B., *Simultaneous Calibration in Flow-Injection Analysis using Injection Signals Evaluated by Partial Least Squares*, *Anal. Chim. Acta*, 363, 183, 1998.
- [126] Tryzell, R.; Karlberg, B., *Comparison of Various Peak Evaluation Techniques for Limited and Extended Dynamic Ranges in Flow Injection Systems*, *Anal. Chim. Acta*, 365, 97, 1998.
- [127] Beebe, K.R.; Kowalski, B.R., *An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis*, *Anal. Chem.*, 59, 1007A, 1987.
- [128] Kowalski, B.R.; Bender, C.F., *Pattern Recognition: A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data*, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 5632, 1972.
- [129] Brown, S.D.; Bear Jr., R.S.; Blank, T.B., *Chemometrics*, *Anal. Chem.*, 64, 22R, 1992.
- [130] Geladi, P.; Kowalski, B.R.; *Partial Least-Squares Regression: A Tutorial*, *Anal. Chim. Acta*, 185, 1, 1986.
- [131] Geladi, P.; Kowalski, B.R.; *Partial Least Squares Regression: An Example of 2-Block Predictive Partial Least-Squares Regression with Simulated Data*, *Anal. Chim. Acta*, 185, 19, 1986.
- [132] Haaland, D.M.; Thomas, E.V., *Partial Least-Squares Methods for Spectral Analysis. 1. Relation to other Quantitative Methods and the Extraction of Qualitative Information*, *Anal. Chem.*, 60, 1193, 1988.

- [133] Brown, C.W.; Lynch, P.F.; Obrenski, R.J.; Lavery, D.S., *Matrix Representations and Criteria for Selecting Analytical Wavelengths for Multicomponent Spectroscopic Analysis*, *Anal. Chem*, 54, 1472, 1982.
- [134] Mark, H.; *Comparative-Study Of Calibration Methods for Near-Infrared Reflectance Analysis using a Nested Experimental-Design*, *Anal. Chem*, 58, 2814, 1986.
- [135] Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., *Principal Components Analysis*, *Chemom. Intell. Lab. Systems*, 2, 37, 1987.
- [136] Lu, J.; McClure, W.F., *Effect of Randon Noise on the Performance of NIR Calibrations*, *J. Near Infrared Spectrosc.*, 6, 77, 1998.
- [137] Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O., *Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial*, *Quim. Nova*, 22, 724, 1999.
- [138] Verdú-Andrés, J.; Massart, D.L., *Comparison of Prediction – and Correlation – Based Methods to Select the Best Subset of Principal Components for Principal Components Regression and Detection of Outlying Object*, *App. Spectrosc.* 52, 1425, 1998.
- [139] Wise, B.; Gallagher, N.B.; *PLS Toolbox for use with MATLAB*, ver 1.5.1., 1995.
- [140] Oliveira, F.S.; Teixeira, L.S.G.; Korn, M., *Application of Partial Least Squares Calibration for Multicomponents Determination by Flow Injection – Solid Phase Spectrophotometry*, *Lab. Robotics Automat.*, 12, 305, 2000.
- [141] Martelli, P.B., Reis, B.F.; Korn, M.; Rufini, I.A., *J. Braz. Chem. Soc.*, 8, 479, 1996.

- [142] Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., *Planejamento Experimental e Otimização*, UNICAMP, 2<sup>a</sup> ed., 1996.
- [143] Deming, S.N.; Morgan, S.L., *Experimental Design: A Chemometric Approach*, vol 3, Elsevier, 1987.
- [144] Teixeira, L.S.G.; Rocha, F.P.R.; Korm, M.; Reis, B.F.; Ferreira, S.L.C.; Costa, A.C.S., *Nickel and Zinc Determination by Flow-Injection Solid-Phase Spectrophotometry*, *Talanta*, 51, 1027, 2000.
- [145] Spiegelman, C.H.; McShane, M.J.; Goeta, M.J.; Motamed, M.; Yue, Q.L.; Coté, G.L., *Theoretical Justification of Wavelength Selection in PLS Calibration: Development of a New Algorithm*, *Anal. Chem.*, 70, 35, 1998.
- [146] Deming, S.N.; Parker Jr., L.R., *A Review of Simplex Optimization in Analytical Chemistry*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 7, 187, 1978.
- [147] Hillebrand, W.F.; Lundell, G.E.F., *Applied Inorganic Analysis with Special Reference to the Analysis of Metals, Minerals and Rocks*, 2<sup>a</sup> ed., Wiley, 1953.
- [148] Kolthoff, I.M.; Belcher, R.; Stenger, V.A.; Matsuyana, ; *Volumetric Analysis – Titration Methods – Oxidation Reduction Reactions*, vol. 2, 2<sup>a</sup> ed., Interscience, 1957.
- [149] Wang, Y.; Veltkamp, D.J.; Kowalski, B.R., *Multivariate Instrument Standardization*, *Anal. Chem. Acta*, 63, 2750, 1991.
- [150] Wang, Y.; Lysaght, M.J.; Kowaski, B.R.; *Improvement of Multivariate Calibration Through Instrument Standardization*, *Anal. Chem.*, 64, 562, 1992.
- [151] Blank, T.B.; Sum, S.T.; Brown, S.D., *Transfer of Near-Infrared Multivariate Calibration without Standards*, *Anal. Chem.*, 66, 2987, 1996.

# ANEXO

## Subrotinas gerais escritas em QuickBasic 4.5

```
SUB Sincroniza

'Subrotina realiza a sincronizacao da bomba peristaltica com a injecao
'da amostra ou padrao.

sinalsinc = 0

'Aguarda ate que o interruptor esteja pressionado
DO UNTIL sinalsinc > 500
    sinalsinc = Leitsinc(500) - 2048 'subtraindo o valor correspondente
a zero
LOOP
media
inteface
sincronizador
'onde está conectado o

'Aguarda ate que o interruptor nao esteja pressionado
DO UNTIL sinalsinc < 500
    sinalsinc = Leitsinc(500) - 2048 'subtraindo o valor correspondente
a zero
LOOP

'Aguarda ate que o interruptor esteja pressionado
DO UNTIL sinalsinc > 500
    sinalsinc = Leitsinc(500) - 2048 'subtraindo o valor correspondente
a zero
LOOP

SUB RegrLin (x(), n AS INTEGER, cang, clin, r)

'Subrotina que faz os calculos por regressao linear dos parametros
'duma curva de calibracao

xm = 0
ym = 0
FOR i = 1 TO n
    xm = xm + x(i, 1)
    ym = ym + x(i, 2)
NEXT i
xm = xm / n
ym = ym / n
sxy = 0
sxx = 0
FOR i = 1 TO n
    sxy = sxy + (x(i, 1) - xm) * (x(i, 2) - ym)
    sxx = sxx + (x(i, 1) - xm) ^ 2
NEXT i
cang = sxy / sxx
clin = ym - cang * xm

SQreg = 0
SQtot = 0
```

```
FOR i = 1 TO n
    SQreg = SQreg + (cang * x(i, 1) + clin - ym) ^ 2
    SQtot = SQtot + (x(i, 2) - ym) ^ 2
NEXT i
Rquad = SQreg / SQtot
r = SQR(Rquad)
```

```
END SUB
```

```

SUB autoscale (nam%, nvx%, x(), med(), std())

'Autor: Fabio Santos de Oliveira
'Data de construcao: 05/05/99
'Ultima modificacao: 22/06/99

' Esta rotina realiza a normalizacao do dados (autoscaling), subtrai
a media
' e divide pelo desvio padrao as colunas da matriz x
' Os parametros sao os seguintes:
' nam      : numero de amostras
' nvx      : numero de variaveis independentes
' nvy      : numero de variaveis dependentes
' npc     : numero de componentes principais (variaveis latentes)
'          a serem utilizados
' x        : matriz para realizar o autoscaling
' med      : vetor das medias das colunas de x
' std      : vetor dos desvios padrao das colunas de x

FOR j = 1 TO nvx%
  med(j) = 0
  FOR i = 1 TO nam%
    med(j) = med(j) + x(i, j)
  NEXT i
  med(j) = med(j) / nam%
  std(j) = 0
  FOR i = 1 TO nam%
    std(j) = std(j) + (x(i, j) - med(j)) * (x(i, j) - med(j))
  NEXT i
  std(j) = SQR(std(j) / (nam% - 1))
  FOR i = 1 TO nam%
    x(i, j) = (x(i, j) - med(j)) / std(j)
  NEXT i
NEXT j

END SUB

SUB centrmed (nam%, nvx%, x(), med())

'Autor: Fabio Santos de Oliveira
'Data de construcao: 05/05/99
'Ultima modificacao: 22/06/99

' Esta rotina realiza a centralizacao na media, subtrai a media
' pelas colunas da matriz x
' Os parametros sao os seguintes:
' nam      : numero de amostras
' nvx      : numero de variaveis independentes
' nvy      : numero de variaveis dependentes
' npc     : numero de componentes principais (variaveis latentes)
'          a serem utilizados
' x        : matriz para realizar a centralizacao na media da matriz x
' med      : vetor das medias das colunas de x

FOR j = 1 TO nvx%
  med(j) = 0
  FOR i = 1 TO nam%

```

```

        med(j) = med(j) + x(i, j)
    NEXT i
    med(j) = med(j) / nam%
    FOR i = 1 TO nam%
        x(i, j) = x(i, j) - med(j)
    NEXT i
NEXT j

```

END SUB

SUB centrmedpred (namp%, nvx%, x(), med())

'Autor: Fabio Santos de Oliveira  
'Data de construcao: 05/05/99  
'Ultima modificacao: 22/06/99

' Esta rotina realiza a centralizacao na media das amostas para  
' previsao, utiliza a media das amostras de calibracao da matriz x  
' Os parametros sao os seguintes:  
' nam : numero de amostras  
' nvx : numero de variaveis independentes  
' nvy : numero de variaveis dependentes  
' npc : numero de componentes principais (variaveis latentes)  
' a serem utilizados  
' x : matriz para realizar a centralizacao na media  
' med : vetor das medias das colunas de x da calibracao

```

FOR i = 1 TO namp%
    FOR j = 1 TO nvx%
        x(i, j) = x(i, j) - med(j)
    NEXT j
NEXT i

```

END SUB

SUB cv (nam%, nvx%, nvy%, npcsmx%, x(), y(), ypred(), w(), t(), u(),  
p(), q(), b(), press(), ss())

'Autor: Fabio Santos de Oliveira  
'Data de construcao: 05/05/99  
'Ultima modificacao: 22/06/99

' Esta rotina realiza a validacao cruzada completa (cross-validation)  
' dos dados para calibracao  
' Os parametros sao os seguintes:  
' nam : numero de amostras  
' nvx : numero de variaveis independentes  
' nvy : numero de variaveis dependentes  
' npcsmx : numero de componentes principais (variaveis latentes)  
' a serem utilizados  
' x : matriz (nam x nvx) das variaveis independentes  
' y : matriz (nam x nvy) das variaveis dependentes  
' t : matriz (nam x npc) dos scores de x  
' p : matriz (nvx x npc) dos loadings de x  
' u : matriz (nam x npc) dos scores de y

```

' q      : matriz (nvy x npcs)
' w      : matriz (nvx x npcs) dos pesos
' b      : vetor (npcs x 1) dos coeficientes da regressao para os
'         componentes do PLS
' press  : vetor (npcsmax x 1) da soma quadratica residual da
previsao
' ss     : matriz (nam x npcsmx) dos residuos quadraticos da
previsao
' xn     : matriz x sendo retirada uma das amostras por vez
' yn     : matriz y sendo retirada uma das amostras por vez
' xtest  : amostra retirada da matriz x
' ytest  : amostra retirada da matriz y

```

```

DIM xtest(1, nvx%), ytest(1, nvy%)
DIM xn(nam% - 1, nvx%), yn(nam% - 1, nvy%)

```

```

FOR in% = 1 TO npcsmx%
  press(in%) = 0
  FOR ii = 1 TO nam%
    n = 0
    FOR i = 1 TO nam%
      IF i = ii THEN
        FOR j = 1 TO nvx%
          xtest(1, j) = x(i, j)
        NEXT j
        FOR j = 1 TO nvy%
          ytest(1, j) = y(i, j)
        NEXT j
      ELSE
        n = n + 1
        FOR j = 1 TO nvx%
          xn(n, j) = x(i, j)
        NEXT j
        FOR j = 1 TO nvy%
          yn(n, j) = y(i, j)
        NEXT j
      END IF
    NEXT i
    CALL plscal(nam% - 1, nvx%, nvy%, in%, xn(), yn(), w(), t(),
u(), p(), q(), b())
    CALL plsprod(1, nvx%, nvy%, in%, xtest(), ypred(), t(), w(),
p(), q(), b())
    ss(ii, in%) = 0
    FOR j = 1 TO nvy%
      ss(ii, in%) = ss(ii, in%) + (ypred(1, j) - ytest(1, j)) *
(ypred(1, j) - ytest(1, j))
    NEXT j
    press(in%) = press(in%) + ss(ii, in%)
  NEXT ii
NEXT in%

```

```

END SUB

```



```

SUB outlier (nam%, npcsmi%, ss(), outl%())

numarq = FREEFILE

OPEN "f95.dat" FOR INPUT AS #numarq
FOR i = 1 TO nam% - 1
    INPUT #numarq, f95
NEXT i
CLOSE #numarq

FOR i = 1 TO nam%
    sumss = 0
    FOR ii = 1 TO nam%
        IF i <> ii THEN
            sumss = sumss + ss(ii, npcsmi%)
        END IF
    NEXT ii
    IF f95 < (((nam% - 1) * ss(i, npcsmi%)) / (sumss)) THEN
        outl%(i) = 1
    ELSE
        outl%(i) = 0
    END IF
NEXT i

END SUB

SUB pcsmin (press(), nam%, nvy%, npcsmi%, npcsmi%, npcsmi%)

pressmin = press(1)
npcsmi% = 1
FOR i = 2 TO npcsmi%
    IF pressmin > press(i) THEN
        pressmin = press(i)
        npcsmi% = i
    END IF
NEXT i

numarq = FREEFILE

OPEN "f75.dat" FOR INPUT AS #numarq
FOR i = 1 TO nam% - 1
    INPUT #numarq, f75
NEXT i
CLOSE #numarq

i = nvy%
DO
    IF f75 >= (press(i) / pressmin) THEN
        pressmi% = press(i)
        npcsmi% = i
        EXIT DO
    END IF
    i = i + 1
LOOP WHILE i <= npcsmi%

```

END SUB

SUB plscal (nam%, nvx%, nvy%, npc%, x(), y(), w(), t(), u(), p(),  
q(), b())

'Autor: Fabio Santos de Oliveira

'Data de construcao: 05/05/99

'Ultima modificacao: 22/06/99

' Esta rotina realiza a calibracao PLS para construcao do modelo  
' Os parametros sao os seguintes:  
' nam : numero de amostras  
' nvx : numero de variaveis independentes  
' nvy : numero de variaveis dependentes  
' npc : numero de componentes principais (variaveis latentes)  
' a serem utilizados  
' x : matriz (nam x nvx) das variaveis independentes  
' y : matriz (nam x nvy) das variaveis dependentes  
' t : matriz (nam x npc) dos scores de x  
' p : matriz (nvx x npc) dos loadings de x  
' u : matriz (nam x npc) dos scores de y  
' q : matriz (nvy x npc)  
' w : matriz (nvx x npc) dos pesos  
' b : vetor (npc x 1) dos coeficientes da regressao para os  
' componentes do PLS

'CONST dimnam = 40, dimnvx = 150, dimnvy = 10, dimnpc = 30

'DIM x(dimnam, dimnvx), y(dimnam, dimnvy)

'DIM t(dimnam, dimnpc), p(dimnvx, dimnpc)

'DIM u(dimnam, dimnpc), q(dimnvy, dimnpc)

'DIM w(dimnvx, dimnpc), b(dimnpc)

DIM o(nam%, npc%)

ERASE w, t, u, p, q, b

FOR in = 1 TO npc%

FOR i = 1 TO nam%

u(i, in) = y(i, 1)

NEXT i

cn% = 0

DO

IF cn% >= 1 THEN

FOR i = 1 TO nam%

'Variavel temporaria para verificar a conversao de t

o(i, in) = t(i, in)

NEXT i

END IF

'Calculo dos pesos

'w=X'\*u/(u'\*u)

wn = 0

FOR j = 1 TO nvx%

w(j, in) = 0

uquad = 0

FOR i = 1 TO nam%

w(j, in) = w(j, in) + x(i, j) \* u(i, in)

uquad = uquad + u(i, in) \* u(i, in)

NEXT i

w(j, in) = w(j, in) / uquad

wn = wn + w(j, in) \* w(j, in)

NEXT j

wn = SQR(wn)

'w=w/||w||

```

FOR j = 1 TO nvx%
    w(j, in) = w(j, in) / wn
NEXT j
'scores do bloco X
't=X*w/(w'*w)
FOR i = 1 TO nam%
    t(i, in) = 0
    wquad = 0
    FOR j = 1 TO nvx%
        t(i, in) = t(i, in) + x(i, j) * w(j, in)
        wquad = wquad + w(j, in) * w(j, in)
    NEXT j
    t(i, in) = t(i, in) / wquad
NEXT i
'loadings do bloco Y
'q=X'*w/(w'*w)
qn = 0
FOR j = 1 TO nvy%
    q(j, in) = 0
    tquad = 0
    FOR i = 1 TO nam%
        q(j, in) = q(j, in) + y(i, j) * t(i, in)
        tquad = tquad + t(i, in) * t(i, in)
    NEXT i
    q(j, in) = q(j, in) / tquad
    qn = qn + q(j, in) * q(j, in)
NEXT j
qn = SQR(qn)
'q=q/||q||
FOR j = 1 TO nvy%
    q(j, in) = q(j, in) / qn
NEXT j
'scores do bloco Y
'u=Y*q/(q'*q)
FOR i = 1 TO nam%
    u(i, in) = 0
    qqquad = 0
    FOR j = 1 TO nvy%
        u(i, in) = u(i, in) + y(i, j) * q(j, in)
        qqquad = qqquad + q(j, in) * q(j, in)
    NEXT j
    u(i, in) = u(i, in) / qqquad
NEXT i
'Confere a convergencia de t
IF cn% >= 1 THEN
    d1 = 0
    FOR i = 1 TO nam%
        d1 = d1 + (t(i, in) - o(i, in)) * (t(i, in) - o(i, in))
    NEXT i
    d1 = SQR(d1)
ELSE
    d1 = 1
END IF
cn% = cn% + 1
IF cn% = 50 THEN EXIT DO
LOOP WHILE d1 > .000001
pn = 0
'loadings do bloco X
'p=X't/(t'*t)
FOR j = 1 TO nvx%
    tquad = 0

```

```

    FOR i = 1 TO nam%
        p(j, in) = p(j, in) + x(i, j) * t(i, in)
        tquad = tquad + t(i, in) * t(i, in)
    NEXT i
    p(j, in) = p(j, in) / tquad
    pn = pn + p(j, in) * p(j, in)
NEXT j
pn = SQR(pn)
'p=p/||p||
FOR j = 1 TO nvx%
    p(j, in) = p(j, in) / pn
NEXT j
'Correcao dos pesos e scores
't=t*||p||
FOR i = 1 TO nam%
    t(i, in) = t(i, in) * pn
NEXT i
'w=w*||p||
FOR j = 1 TO nvx%
    w(j, in) = w(j, in) * pn
NEXT j
b(in) = 0
ttquad = 0
'Coeficientes da regressao
'b=u'*t/(t't)
FOR i = 1 TO nam%
    b(in) = b(in) + (u(i, in) * t(i, in))
    ttquad = ttquad + t(i, in) * t(i, in)
NEXT i
b(in) = b(in) / ttquad
'resduos do bloco X
'X=X-t*p'
FOR j = 1 TO nvx%
    FOR i = 1 TO nam%
        x(i, j) = x(i, j) - (t(i, in) * p(j, in))
    NEXT i
NEXT j
'resduos do bloco Y
'Y=Y-b*t*q'
FOR j = 1 TO nvy%
    FOR i = 1 TO nam%
        y(i, j) = y(i, j) - ((b(in) * t(i, in)) * q(j, in))
    NEXT i
NEXT j
NEXT in
END SUB

SUB pls pred (namp%, nvx%, nvy%, npcsp%, xpred(), ypred(), tp(), w(),
p(), q(), b())

```

```

'Esta rotina realiza os calculos do PLS para previsao
'de amostras com concentracao desconhecida
'namp : numero de amostras desconhecidas
'nvx  : numero de variaveis independentes
'nvy  : numero de variaveis dependentes
'npcsp : numero de componentes principais (variaveis latentes) a serem
'      utilizados
'xpred : matriz de variaveis independentes
'ypred : matriz de variaveis dependentes
'w     : matriz (nvx x npcsp) dos pesos determinada na fase de
treinamento

```

```
'p      : matriz (nvx x npcs) dos loadings de x determinada na fase de
'      treinamento
'q      : matriz (nvy x npcs) dos loadings de y determinada na fase de
'      treinamento
'b      : vetor (npcs x 1) dos coeficientes da regressao para os
componentes
'      do PLS determinado na fase de treinamento
'tp     : matriz de scores de xpred
```

```
'CONST dimnamp = 40, dimnvx = 150, dimnvy = 10, dimnpcsp = 30
'DIM xpred(dimnamp, dimnvx), ypred(dimnamp, dimnvy)
'DIM w(dimnvx, dimnpcs), p(dimnvx, dimnpcs)
'DIM q(dimnvy, dimnpcs), b(dimnpcs)
'DIM tp(namp%, npcsp%)
```

```
ERASE ypred, tp
```

```
FOR in = 1 TO npcsp%
```

```
    FOR k = 1 TO namp%                                'scores de
xpred
        tp(k, in) = 0
        FOR j = 1 TO nvx%
            tp(k, in) = tp(k, in) + xpred(k, j) * w(j, in)
        NEXT j
    NEXT k
    FOR j = 1 TO nvx%
        FOR k = 1 TO namp%
            xpred(k, j) = xpred(k, j) - (tp(k, in) * p(j, in))
        NEXT k
    NEXT j
    FOR i = 1 TO nvy%
        FOR k = 1 TO namp%                                'previsao
            ypred(k, i) = ypred(k, i) + (b(in) * tp(k, in) * q(i, in))
        NEXT k
    NEXT i
NEXT in
END SUB
```

```
SUB recentrmed (nam%, nvx%, x(), med())
```

```
FOR i = 1 TO nam%
    FOR j = 1 TO nvx%
        x(i, j) = x(i, j) + med(j)
    NEXT j
NEXT i
```

```
END SUB
```

```
SUB rescale (nam%, nvx%, x(), med(), std())
```

```
FOR i = 1 TO nam%
    FOR j = 1 TO nvx%
        x(i, j) = (x(i, j) * std(j)) + med(j)
    NEXT j
NEXT i
```

END SUB

SUB scale (namp%, nvx%, x(), med(), std())

FOR i = 1 TO namp%

FOR j = 1 TO nvx%

x(i, j) = (x(i, j) - med(j)) / std(j)

NEXT j

NEXT i

END SUB