

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



DESENVOLVIMENTO E OPTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS
QUIMIOLUMINESCENTES DE DETECÇÃO DE
ESPÉCIES QUÍMICAS EM ÁGUAS

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

JOSÉ RENATO MOREIRA DIAS

LICENCIADO EM QUÍMICA (U.P.)

PORTO
2001

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO E OPTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS
QUIMIOLUMINESCENTES DE DETECÇÃO DE
ESPÉCIES QUÍMICAS EM ÁGUAS**

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

JOSÉ RENATO MOREIRA DIAS

LICENCIADO EM QUÍMICA (U.P.)

**PORTO
2001**

RESUMO

Nesta Tese implementou-se um sistema de detecção de quimioluminescência baseado num tubo fotomultiplicador em que o controlo do detector e aquisição dos dados é efectuada por computador. Com base neste módulo de detecção acoplado a sistemas de fluxo foram desenvolvidos três métodos de análise quantitativa de catião Cu(II), cloro livre e anião bromato.

O desenvolvimento dos métodos de análise envolveu uma primeira fase de optimização recorrendo a técnicas de planeamento de experiências. Foram utilizados planeamentos factoriais completos com dois e três níveis para cada factor, planeamentos factoriais fraccionados e de Plackett-Burman. A análise da significância dos factores estudados e dos modelos de regressão múltipla propostos foi efectuada por ANOVA. Nas fases seguintes do desenvolvimento dos métodos as características de resposta dos sistemas optimizados foram avaliadas.

O método de análise de catião Cu(II) em água é baseado na reacção de oxidação com peróxido de hidrogénio do complexo formado entre o catião Cu(II) e a 1,10-fenantrolina em meio alcalino (hidróxido de sódio) na presença do surfactante brometo de cetileildimetilamónio (CEDAB). Para a optimização do sistema de fluxo foram considerados os seguintes factores experimentais: concentração de peróxido de hidrogénio; concentração de 1,10-fenantrolina; concentração de hidróxido de sódio; concentração de CEDAB; caudal total; volume de injeção; e, volume do reactor. Os factores mais importantes para a resposta do sistema são os volume de injeção e do reactor e a concentração de CEDAB. O sistema optimizado apresenta um limite de detecção cerca de 10^{-10} M.

O método de análise de cloro livre em água é baseado na reacção entre o hipoclorito e a rodamina 6G. Para a optimização do sistema de fluxo foram considerados os seguintes factores experimentais: concentração de rodamina 6G; volume de injeção; caudal total; temperatura; e, presença de surfactante (cloreto de

cetilpiridina, CPC). Com excepção do volume de injeção todos os factores estudados são significativos. O sistema optimizado apresenta um limite de detecção de 6.60×10^{-5} M.

O método de análise de anião bromato em água é baseado na reacção em meio ácido entre o anião bromato e o sulfito, na presença de hidrocortisona. Para a optimização do sistema de fluxo foram considerandos os seguintes factores experimentais: concentração de sulfito; concentração de hidrocortisona; concentração de ácido sulfúrico; caudal da solução indicadora (sulfito, hidrocortisona e ácido sulfúrico); caudal do fluxo de água; volume de injeção; e, volume do reactor. Os factores mais importantes para a resposta do sistema são os volume de injeção e do reactor e a concentração de hidrocortisona. O sistema optimizado apresenta um limite de detecção de $8,20 \times 10^{-8}$ M (11 $\mu\text{g/L}$) e foi detectada uma gama de resposta linear entre $3,60 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ M. O principal interferente do sistema estudado é o anião cloreto.

Os resultados obtidos mostram que existe potencial para a construção de detectores quimioluminescentes portáteis para a análise no local de amostragem do catião Cu(II) em níveis vestigiais, cloro total e anião bromato.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se a orientação do Prof. Doutor Joaquim C.G. Esteves da Silva e da Dr. Júlia M.C.S. Magalhães.

Agradece-se ao CITEVE por todas as facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

Parte do trabalho foi executado no âmbito do Projecto PBIC/C/QUI/2177/95 (Fundação para a Ciência e Tecnologia) e PRAXIS XXI 2/2.1/QUI/294/94 (Fundação para a Ciência e Tecnologia).

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|----|
| 1 – INTRODUÇÃO GERAL | |
| 1.1 – SISTEMAS LUMINESCENTES | 1 |
| 1.1.1 – Introdução | 1 |
| 1.1.2 – Sistemas quimioluminescentes | 1 |
| <u>1.1.2.1 – Reacções quimioluminescentes</u> | 1 |
| <u>1.1.2.2 – Fenómeno de quimioluminescência</u> | 4 |
| <u>1.1.2.3 – Vantagens e desvantagens das técnicas quimioluminescentes</u> | 7 |
| 1.1.3 – Sistemas químicos estudados nesta dissertação | 8 |
| <u>1.1.3.1 – Sistemas químicos estudados nesta dissertação</u> | 8 |
| <u>1.1.3.2 – Reacção de oxidação da rodamina 6G</u> | 8 |
| <u>1.1.3.3 – Reacção de oxidação do sulfito na presença de</u> <u>hidrocortisona</u> | 9 |
| 1.2 – MOLÉCULAS DE SURFACTANTES E QUIMIOLUMINESCÊNCIA | 10 |
| 1.3 – OBJECTIVOS DO TRABALHO | 14 |
| 1.4 – ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO | 15 |
| 1.5 – BIBLIOGRAFIA | 16 |
| | |
| 2 - PLANEAMENTO EXPERIMENTAL E OPTIMIZAÇÃO | 18 |
| 2.1 - INTRODUÇÃO | 18 |
| 2.2 - OBJECTIVOS DO PLANEAMENTO EXPERIMENTAL | 20 |
| 2.3 - OS FACTORES EXPERIMENTAIS E SELECÇÃO DAS RESPOSTAS | 22 |
| 2.3.1 – Factores | 22 |
| 2.3.2 – Respostas | 22 |
| 2.4 - ESTRATÉGIAS DE OPTIMIZAÇÃO | 24 |
| 2.4.1 - Estratégias univariável e multivariável | 24 |
| 2.4.2 - Estratégias de optimização multivariável | 26 |
| 2.5 – O MODELO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA | 29 |
| 2.6 – PLANEAMENTOS FACTORIAIS | 31 |

| | |
|---|----|
| 2.6.1 – Introdução | 31 |
| 2.6.2 – Planeamentos factoriais completos | 32 |
| <u>2.6.2.1 – Formulação do planeamento</u> | 32 |
| <u>2.6.2.2 – Estimativa directa dos efeitos</u> | 33 |
| <u>2.6.2.3 – Análise da significância (ANOVA) dos efeitos</u> | 34 |
| 2.6.3 – Planeamentos factoriais fraccionados | 35 |
| 2.6.4 – Planeamentos de Plackett-Burman | 36 |
| 2.7 – REGRESSÃO MÚLTIPLA | 38 |
| 2.7.1 – Introdução | 38 |
| 2.7.2 – Estimativa dos coeficientes de regressão | 39 |
| 2.7.3 – Comparação dos coeficientes da regressão com os efeito | 41 |
| 2.7.4 – Validação do modelo | 41 |
| <u>2.7.4.1 – Análise dos resíduos e teste de normalidade</u> | 41 |
| <u>2.7.4.2 – Análise da variância (ANOVA) da regressão</u> | 45 |
| <u>2.7.4.3 – O coeficiente de correlação múltipla</u> | 48 |
| <u>2.7.4.4 – Análise da significância dos coeficientes da regressão</u> | 49 |
| 2.8 – SUPERFICIE DE RESPOSTA | 50 |
| 2.8.1 – Superfícies de resposta planas | 50 |
| 2.8.2 – Superfícies de resposta curvas | 52 |
| 2.9 – BIBLIOGRAFIA | 54 |
| | |
| 3 – SECÇÃO EXPERIMENTAL | 55 |
| 3.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES | 55 |
| 3.1.1 - Sistema quimioluminescente para análise de catião Cu(II) | 55 |
| 3.1.2 – Sistema quimioluminescente para análise de cloro livre | 56 |
| 3.1.3 – Sistema quimioluminescente para análise de anião bromato | 56 |
| 3.2 – MATERIAL, EQUIPAMENTO E MONTAGEM DOS SISTEMAS | 58 |
| 3.2.1 – Material | 58 |
| 3.2.2 – Equipamento de detecção de luz (Detector) | 59 |
| 3.2.3 – Montagem dos sistemas | 60 |
| 3.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 63 |
| 3.3.1 – Optimização da resposta dos sistemas | 63 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.2 – Avaliação da resposta dos sistemas otimizados | 63 |
| 3.4 – CÁLCULOS | 64 |
| | |
| 4 – SISTEMA DE DETECÇÃO DO CATIONO Cu(II) | 65 |
| 4.1 – INTRODUÇÃO | 65 |
| 4.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 4.2.1 – Estudo prévio do sistema | 67 |
| 4.2.2 – Estudo dos factores mais significativos | 72 |
| 4.2.3 – Características de resposta do sistema otimizado | 78 |
| 4.3 – CONCLUSÕES | 81 |
| 4.4 – BIBLIOGRAFIA | 82 |
| | |
| 5 – SISTEMA DE ANÁLISE DE CLORO LIVRE | 83 |
| 5.1 – INTRODUÇÃO | 83 |
| 5.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 85 |
| 5.2.1 – Estudo prévio do sistema | 85 |
| 5.2.2 – Estudo dos factores mais significativos | 91 |
| 5.3.3 – Características de resposta do sistema otimizado | 97 |
| 5.3.4 – Estudo do efeito dos surfactantes | 99 |
| 5.3 – CONCLUSÕES | 107 |
| 5.4 – BIBLIOGRAFIA | 108 |
| | |
| 6 – SISTEMA DE ANÁLISE DE ANIÃO BROMATO | 109 |
| 6.1 – INTRODUÇÃO | 109 |
| 6.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 111 |
| 6.2.1 – Estudo prévio do sistema | 111 |
| 6.2.2 – Estudo dos factores mais significativos | 117 |
| 6.2.3 – Características de resposta do sistema otimizado | 128 |
| 6.2.4 – Características de selectividade da resposta do sistema | 130 |
| 6.3 – CONCLUSÕES | 133 |
| 6.4 – BIBLIOGRAFIA | 134 |

| | |
|-----------------------|-----|
| 7 – CONCLUSÕES | 136 |
| APÊNDICE A | 137 |
| APÊNDICE B | 139 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|---|
| ANOVA | análise de variância |
| B | bomba peristáltica |
| b | coeficiente beta |
| BL | bioluminescência |
| c | velocidade da luz |
| C _P ⁺ | contrair (no sentido positivo) o Simplex |
| C _A | concentração de ácido |
| C _{CEDAB} | concentração do surfactante CEDAB |
| C _{CPC} | concentração do surfactante cloreto de cetilpiridina |
| CEDAB | brometo de cetiletildimetilamónio |
| C _F | concentração de 1,10-fenantrolina |
| C _H | concentração de hidrocortisona |
| C _{HS} | concentração de hidróxido de sódio |
| CMC | concentração micelar crítica |
| Cov | covariância |
| C _P ⁻ | contrair (no sentido negativo) o Simplex |
| CPB | brometo de cetilpiridina |
| CPC | cloreto de cetilpiridina |
| C _{PH} | concentração de peróxido de hidrogénio |
| C _R | concentração de rodamina 6G |
| C _S | concentração de sulfito |
| df | graus de liberdade |
| DP _B | desvio padrão de b |
| EDTA | etilenodiaminatetracético |
| E _P | expandir o Simplex |
| F | teste F (razão de Fisher) |
| FIA | análise por injeção em fluxo |
| h | constante de Planck |
| Luminol | 5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona |
| MS | média dos quadrados |
| MS | médias dos quadrados |
| MS _{LOF} | estimativa de σ^2 se o modelo escolhido for correcto. Se o modelo não for correcto o MS _{LOF} estima $\sigma^2 + (\text{erro})^2$. |
| MS _{PE} | estimativa do erro experimental puro (σ^2) |
| MSR | metodologias de superfície de resposta |
| nf | número de factores |
| nm | nanómetros |
| Q ₁ | caudal da solução indicadora (sulfito, hidrocortisona e ácido sulfúrico) |
| Q ₂ | caudal do fluxo de água |
| QL | quimioluminescência |
| Q _T | caudal total |
| R ² | coeficiente de correlação múltipla |
| R ² _{aj} | coeficiente de correlação ajustado |
| R _P | tamanho original do Simplex |
| S | representa uma molécula de surfactante |
| s _e ² | variância residual |

| | |
|----------------|--|
| S_n | representa uma micela constituída por moléculas de surfactante S |
| SPSS | "Statistical Package for Social Sciences " |
| SQR | soma dos quadrados dos resíduos |
| SS | soma dos quadrados |
| SS_{LOF} | soma dos quadrados devido à falta de ajuste |
| SS_{PE} | soma dos quadrados do erro puro |
| SS_R | soma dos quadrados residuais |
| SS_{REG} | soma dos quadrados da regressão |
| SS_T | soma total dos quadrados |
| STY | serpentina de tubo TYGON |
| T | temperatura |
| TFM | tubo fotomultiplicador |
| V_i | volume de injeção |
| V_L | volume do reactor |
| λ_{ex} | limite superior de comprimento de onda necessário para ocorrer a excitação |
| Φ_{ex} | a eficiência de produção das espécies excitadas |
| Φ_L | eficiência de luminescência |
| Φ_{QL} | rendimento quântico da quimioluminescência |
| σ^2 | erro experimental |
| π | pressão osmótica |
| ι | turbidância |
| κ | conductividade |
| k | número de níveis do factor |
| Λ | condutividade molar |
| ΔG | energia livre de Gibbs |

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1– SISTEMAS LUMINESCENTES

1.1.1 – Introdução

A luminescência é um termo genérico que engloba um grande número de processos, e que consiste fundamentalmente na emissão de radiação luminosa quando um electrão excitado após absorção de uma qualquer forma de energia regressa ao estado fundamental [1,2].

Existem muitos tipos de luminescência com designações diversas, que identificam a fonte responsável pela excitação electrónica ou natureza dos estados excitados e fundamental. Neste trabalho, apenas se estuda a quimioluminescência que constitui a base de técnicas de detecção estudadas. Os processos quimioluminescentes são baseados no facto de que algumas reacções químicas dão origem a intermediários ou produtos num estado electrónico excitado. Esta situação é observada porque parte da energia química libertada na reacção é usada para produzir espécies químicas num nível electrónico excitado [3].

1.1.2 – Sistemas quimioluminescentes

1.1.2.1– Reacções quimioluminescentes

O fenómeno da emissão de luz visível por um organismo vivo ou por uma reacção química é um evento visualmente interessante que tem atraído o interesse de biólogos, bioquímicos e químicos ao longo de vários séculos. O primeiro investigador a utilizar o termo “quimioluminescência” para descrever reacções químicas que emitem luz visível foi E. Wiedemann, que em 1888 [4] a definiu como a emissão de luz ocorrendo junto a processos químicos. No entanto, já os Gregos relatavam na literatura a existência de uma “luz fria” (mais tarde designada por quimioluminescência) após observações efectuadas a pirilampos que brilhavam no escuro. O termo “luz fria” resulta do facto de a quimioluminescência não ter associada nenhuma geração de calor [1].

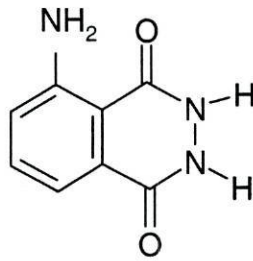
A primeira reacção quimioluminescente bem caracterizada do ponto de vista do seu mecanismo químico foi a oxidação do 5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona (luminol) (Fig. 1.1.a) com peróxido de hidrogénio em meio básico, descrito por H.O.Albrecht em 1928 [3,4]. Entretanto, esta reacção constitui a base de muitas aplicações analíticas [5]. Para que a reacção ocorra é necessário um agente oxidante e um catalisador, e apresenta maior eficiência em meio básico, podendo ser efectuada em soluções aquosas ou em alguns solventes orgânicos, como por exemplo o dimetilsulfóxido.

Na Fig. 1.2 está representado o mecanismo mais provável para a reacção quimioluminescente do luminol em água. O catalisador, que normalmente é um metal de transição, converte o luminol (espécie 1 da Fig. 1.2) em diazoquinona (espécie 2 da Fig. 1.2), a qual reage com o anião do peróxido de hidrogénio, formando o endoperóxido (espécie 3 da Fig. 1.3). Este último perde uma molécula de azoto formando o dianião do ácido 3-aminoftálico (espécie 4 da Fig. 1.2) que decai para o estado fundamental acompanhado pela emissão de radiação a 431 nm [5].

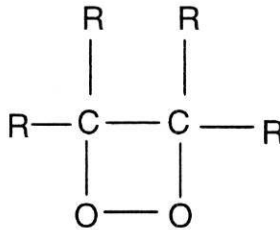
Para além das reacções do luminol observaram-se, mais tarde, avanços no estudo de reacções quimioluminescentes com síntese do 1,2-dioxetano, por Kopecky em 1967 [4] (Fig. 1.1.b) e da 1,2-dioxetanodiona (Fig.1.1.c). Esta última espécie é o dímero do dióxido de carbono, que é considerado como o intermediário chave na quimioluminescência do sistema peroxi-oxalato, uma das reacções quimioluminescentes mais eficientes [6,7,8].

No entanto, os mecanismos envolvidos na formação de intermediários ou produtos em estados electrónicos excitados na maioria das reacções quimioluminescentes ainda não estão bem esclarecidos e continuam a ser objecto de pesquisas recentes [5].

a)



b)



c)

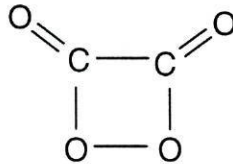


Fig 1.1 - Alguns compostos orgânicos que mostram reacções quimioluminescentes:

(a) luminol; (b) 1,2-dioxetano; e, (c) 1,2-dioxetanodiona.

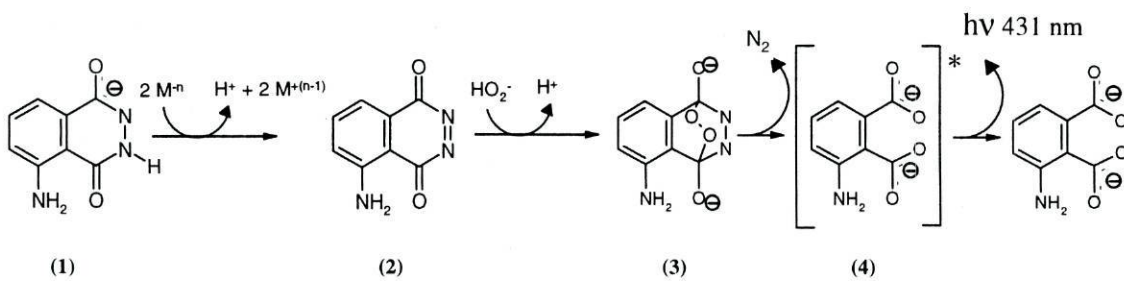


Fig. 1.2 - Mecanismo esquemático da oxidação de luminol pelo peróxido de hidrogénio em meio aquoso, catalisada por um metal de transição.

1.1.2.2 – Fenómeno de quimioluminescência

Como referido anteriormente, a quimioluminescência é a emissão de radiação luminosa produzida numa reacção química ($A+B \rightarrow C$) sem estar associada a qualquer geração de calor (Fig. 1.3). Sistemas químicos geradores de radiação luminosa também ocorrem em sistemas vivos, mas nestes casos é aplicado o termo de bioluminescência.

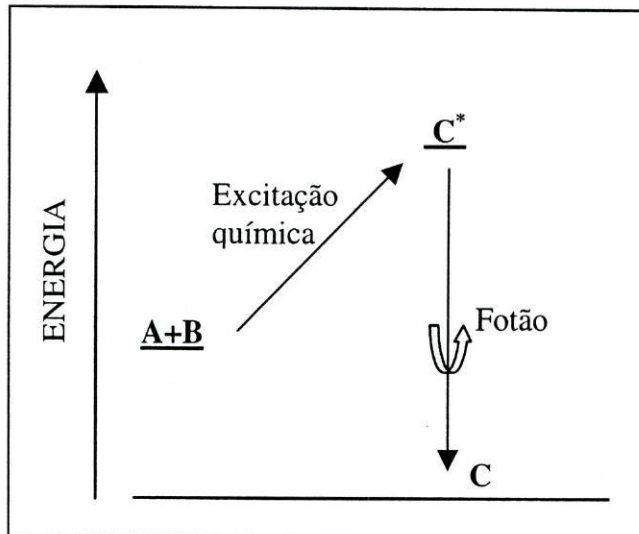


Fig. 1.3 - Esquema do mecanismo de emissão luminosa de quimioluminescência.

A técnicas de detecção de quimioluminescência tem como base a medida de uma alteração na intensidade de emissão na presença de uma espécie química com interesse detectar, o analíto. Esta alteração pode ser um aumento da intensidade de luz ou na sua diminuição (“quenching” ou inibição) [9]. Nestas técnicas é normalmente necessário uma calibração e geralmente pode ser estabelecida uma relação linear entre a intensidade de luz emitida e a concentração do analíto.

Podemos classificar a quimioluminescência em dois tipos: directa e indirecta. Directa quando a reacção gera uma molécula excitada que posteriormente é responsável pela emissão luminosa. Indirecta quando o produto excitado da reacção não é o responsável pela emissão mas transfere essa energia para um outra molécula que de seguida emite luz. A quimioluminescência pode ter origem nos seguintes tipos de mecanismos químicos:

(i) origem num intermediário



(ii) origem num produto



(iii) origem num aceitador de fluorescência



Onde A e B são reagentes, I é um intermediário, P é o produto e F é um aceitador de fluorescência.

Ao contrário de outros processos geradores de luz, a quimioluminescência não envolve a geração de calor ou energia eléctrica [1]. Desta forma, a variação de energia livre (ΔG , kcal/mol) tem que ser suficientemente elevada para produzir um estado excitado de acordo com a seguinte equação [3]:

$$-\Delta G \geq h c / \lambda_{ex} \quad (1.7)$$

$$-\Delta G \geq 2,86 \times 10^4 / \lambda_{ex} \quad (1.8)$$

onde h é a constante de Planck, c é velocidade da luz e λ_{ex} é o limite superior de comprimento de onda necessário para ocorrer a excitação da espécie luminescente. Para que a quimioluminescência se dê na zona do visível $-\Delta G$ tem que estar compreendido entre 40 e 70 kcal/mol. Podemos encontrar valores de energia desta ordem nas oxidações com intermediário peróxido [1].

A eficiência quântica da quimioluminescência (Φ_{QL}) é definida como:

$$\Phi_{QL} = (\text{número de fotões emitidos}) / (\text{número de moléculas que reagiram}) \quad (1.9)$$

Esta razão pode ser representada como um produto de duas outras eficiências:

$$\Phi_{QL} = \Phi_{ex} \Phi_L \quad (1.10)$$

onde Φ_{ex} é a eficiência de produção das espécies excitadas (fracção das moléculas que reagem e que produzem uma molécula excitada) e Φ_L é a eficiência de luminescência (a eficiência de fluorescência) das espécies luminescentes.

A potência radiante da quimioluminescência expressa em fotões por segundo no instante t [$\Phi_{QL,p}(t)$] é dada por:

$$\Phi_{QL,p}(t) = \Phi_{QL} [-dn_A(t)V/dt] \quad (1.11)$$

onde $[-dn_A(t)V/dt]$ é a velocidade da reacção. Assim após a mistura dos reagentes, o sinal de quimioluminescência eventualmente decai com o tempo à medida que os reagentes vão sendo consumidos segundo um decaimento de primeira ordem (Fig. 1.4).

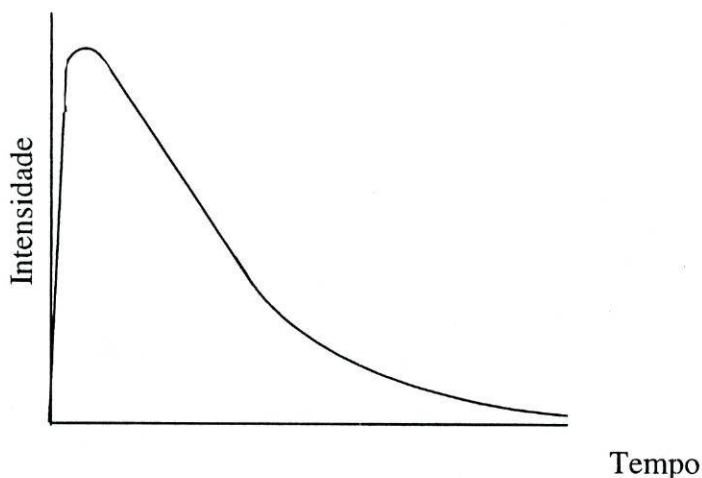


Fig. 1.4 - Curva de decaimento do sinal de quimioluminescência com o tempo.

A sensibilidade das técnicas de detecção quimioluminescente é uma função do rendimento das reacções envolvidas - se o Φ_{QL} for suficientemente elevado (0.01 ou superior) podem-se obter limites de detecção muito baixos.

1.1.2.3 – Vantagens e desvantagens das técnicas quimioluminescentes

Um dos objectivos a atingir quando se desenvolvem métodos de análise vestigial é obter limites de detecção o mais baixo possível. Paralelamente também se pretende efectuar análises rápidas e com a maior selectividade possível. As técnicas de detecção quimioluminescentes são utilizadas para se atingirem limites de detecção muito baixos de um grande variedade de espécies químicas, como por exemplo: catiões metálicos, substâncias orgânicas, etc [1,2,10-15]. Devido à inexistência de uma fonte luminosa externa, os limites de detecção atingidos pela quimioluminescência podem ser bastante baixos [4] – a comparação é feita contra um sinal de fundo. A pureza dos reagentes, a existência de contaminantes no sistema instrumental e a falta de compreensão de algumas reacções químicas são factores importantes que contribuem para o aumento dos limites de detecção das técnicas quimioluminescentes. A extrema sensibilidade das técnicas de quimioluminescência, impõem critérios apertados de limpeza e pureza dos reagentes. Falhas no controlo destes factores, traduzem-se em níveis de “background” elevados e em falta de reprodutibilidade. O limite de detecção dos métodos quimioluminescentes é geralmente restringida pela pureza dos reagentes e não por limitações instrumentais [9].

A quimioluminescência associada à análise por injeção em fluxo permite efectuar determinações em que os picos de emissão de luz ocorrem em menos de um minuto, em alguns casos o pico de emissão de luz é mesmo atingido em menos de 1 segundo [9], o que representa por si só uma enorme vantagem porque permite atingir ritmos de amostragem muito elevados.

As limitações da quimioluminescência na determinação de analítos específicos em amostras de água muito complexas devem-se, em muitos casos, à falta de selectividade das reacções químicas envolvidas. No entanto, este tipo de limitação, frequentemente pode ser ultrapassado usando técnicas de pré-concentração (cromatografia) e/ou complexantes (EDTA) [4].

Em conclusão, as técnicas baseadas na quimioluminescência têm grande potencial para o desenvolvimento de equipamento portátil para a determinação em campo porque possuem grande sensibilidade, excelente reprodutibilidade e grande rapidez de análise associada ao seu baixo custo e simplicidade de instrumentação

1.1.3 – Sistemas químicos estudados nesta dissertação

1.1.3.1 – Reacção de oxidação do complexo de Cu(II) com 1,10-fenantrolina

Na sequência da reacção de decomposição catalítica em meio alcalino do peróxido de hidrogénio pelo complexo que se forma entre o Cu(II) e a 1,10-fenantrolina (Fig. 1,5) e subsequente destruição oxidativa da 1,10-fenatrolina observa-se a emissão de luz (quimioluminescência) [16]. A quimioluminescência é aumentada se existir na solução micelas de surfactantes catiónicos da família dos alquilamónios [16] - o surfactante brometo de cetiletdimetilamónio (CEDAB, Fig. 1.6) originava o maior aumento [16]. Esta reacção tem a particularidade de ser bastante selectiva, para além de apresentar elevada sensibilidade, o que a torna praticamente ideal para constituir a base de sistemas de detecção quimioluminescente de catião Cu(II) [17,18].

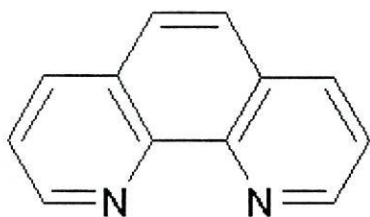


Fig. 1.5 - Estrutura da 1,10-fenantrolina.

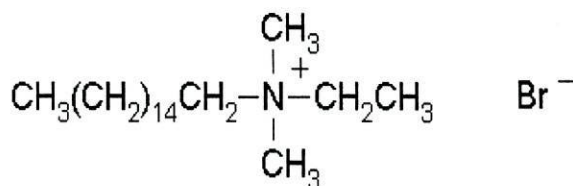


Fig. 1.6 - Estrutura do CEDAB.

1.1.3.2 – Reacção de oxidação da rodamina 6G

Os corantes dos xantenos reagem com o cloro livre com emissão de luz. Os corantes com propriedades alcalinas, como é o caso da rodamina 6G (Fig. 1.7), dá origem a quimioluminescência em meios não tamponados. Por este motivo a reacção do cloro livre com a rodamina 6G é a base de metodologias quimioluminescentes para a detecção e quantificação de cloro livre [19-21].

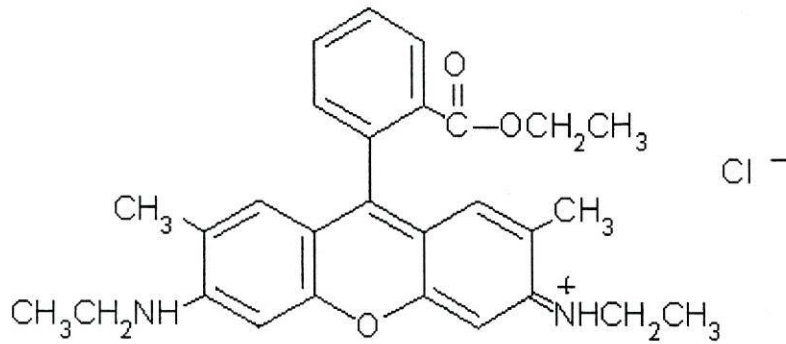


Fig. 1.7 - Estrutura da rodamina 6G.

1.1.3.3 – Reacção de oxidação do sulfito na presença de hidrocortisona

A oxidação do anião sulfito em meio ácido é uma reacção quimioluminescente conhecida, particularmente quando o oxidante é o permanganato de potássio [22,23] e o ião cério(IV) [24]. A intensidade da radiação emitida neste oxidação é bastante aumentada com a presença de alguns compostos denominados de amplificadores (“sensitizers”). Alguns exemplos de compostos amplificadores são: riboflavina, ácido 3-ciclohexilaminopropanosulfónico (CAPS), quinina, quinidina, cortisona e hidrocortisona. A estrutura química que parece atribuir propriedades amplificadoras é o grupo ciclohexilo [25].

Mais recentemente, a reacção de oxidação do sulfito usando como agente oxidante o anião bromato foi estudada [25]. Neste estudo, foi avaliado o efeito amplificador de alguns esteroides, tendo sido observado que a hidrocortisona (Fig. 1.8) proporcionava o maior efeito amplificador.

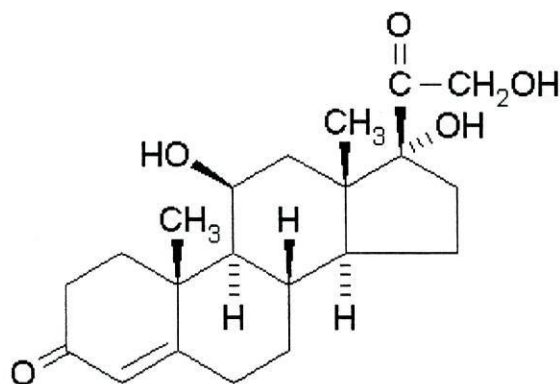


Fig. 1.8 - Estrutura da hidrocortisona.

1.2 – MOLÉCULAS DE SURFACTANTES E QUIMIOLUMINESCÊNCIA

A estrutura e as propriedades químicas de algumas substâncias orgânicas podem ser alteradas com a modificação das características do meio em que estão inseridas. De facto, no caso das substâncias orgânicas surfactantes, a presença de dois ramos, um polar (hidrofílico) e outro apolar (hidrofóbico) (Fig.1.5), fazem com que o seu comportamento em solução aquosa apresente características particulares. Por este facto, a sua solubilidade em meio aquoso está dependente do equilíbrio entre os dois ramos [26,27]. O ramo hidrofóbico da molécula é constituído por uma cadeia hidrocarbonada que é responsável pela diminuição da sua solubilidade. No entanto, com o aumento da concentração de surfactante, a solubilidade destas espécies é alterada devido à formação de agregados vulgarmente designados por micelas (Fig.1.9). Nestas estruturas, as zonas hidrofóbicas ficam voltadas para o seu interior, minimizando desta forma o seu contacto com a água [27] e promovendo a sua dispersão. O processo de formação de micelas pode ser descrito pela seguinte equação química:



em que S representa uma molécula de surfactante e S_n representa uma micela constituída por moléculas de surfactante S , com um grau de agregação n .

Como já foi referido anteriormente, a formação de micelas só ocorre acima de uma determinada concentração bem definida de surfactante, denominada concentração micelar crítica (CMC) [27], que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. Na Tabela 1.1 apresentam-se os CMC para alguns surfactantes que serão utilizados neste trabalho. Com o aumento da concentração e consequente formação de micelas, certas propriedades físicas da solução sofrem alterações. É o caso da condutividade, κ , turbidância, τ , pressão osmótica, π , ou a condutividade molar, Λ - estas variações podem ser observadas na Fig.1.10 [27].

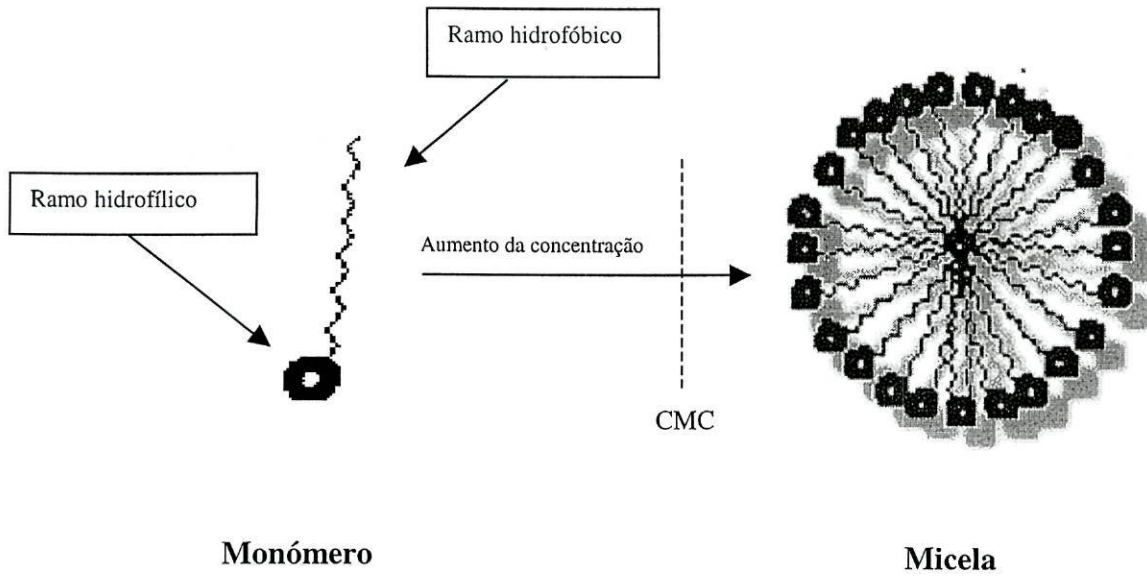


Fig. 1.9 - Representação esquemática da origem e formação de micelas.

Tabela 1.1 - Valores de concentração micelar crítica (CMC), expressos em M, para os surfactantes utilizados neste trabalho, retirados da literatura [28,29].

| Surfactante | Valor retirado da literatura |
|-------------|------------------------------|
| CEDAB | 0,0008 M |
| CPC | 0,00063 M |
| CPB | 0,0067 M |

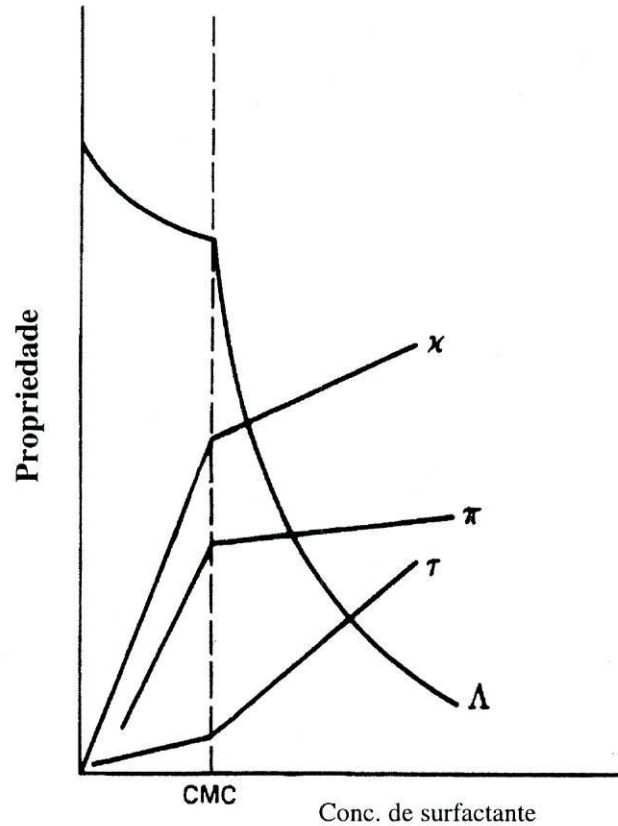
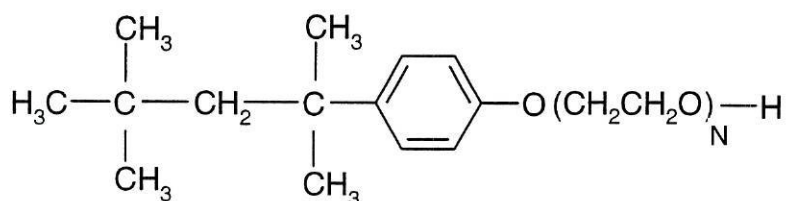


Fig. 1.10 - Ilustração esquemática da variação de algumas propriedades (condutividade, κ ; turbidância, τ ; pressão osmótica, π ; e a condutividade molar, Λ) com a concentração de surfactante.

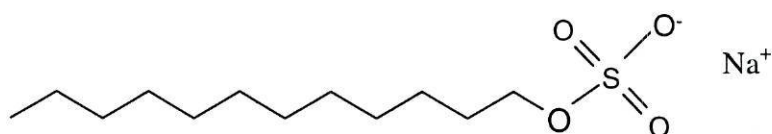
O ramo hidrofílico das moléculas surfactantes pode ser iônico ou não iônico. Os grupos não iônicos mais comuns são geralmente constituídos por cadeias não muito extensas de polietileno $[-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x-]$, com valores de x a variar entre 3 e 20, ou superior (Fig. 1.11.a). Quanto aos iônicos, podem-se dividir em catiónicos e aniônicos. Os catiónicos mais usados são constituídos essencialmente por grupos de amônio quaternários $(-\text{NR}_3^+)$ (Fig. 1.11.c,d), enquanto os aniônicos mais comuns são os que apresentam grupos como o sulfato $(-\text{SO}_4^-)$ ou carboxilato $(-\text{CO}_2^-)$ (Fig. 1.11.c). Existem também surfactantes anfotéricos, que apresentam em simultâneo grupos carregados com carga positiva e negativa.

As moléculas de surfactantes quando existem em solução aquosa com uma concentração superior à CMC dão origem a estruturas organizadas, as micelas, que podem alterar as propriedades da luz emitida nos processos luminescentes. Por exemplo, é vulgar observar um aumento significativo da quantidade de luz emitida. Neste caso, as espécies químicas responsáveis pela emissão de luz ao entrarem para dentro da estrutura hidrofóbica da micela vêm os mecanismos radiativos favorecidos em oposição aos mecanismos não radiativos. Esta alteração pode-se ficar a dever apenas a um efeito de solvente na estabilização do estado excitado da espécie emissora de luz ou a um efeito catalizador da reacção quimioluminescente.

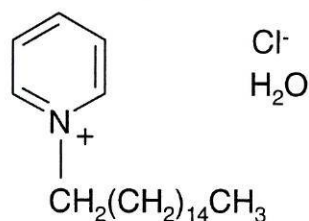
a)



b)



c)



d)

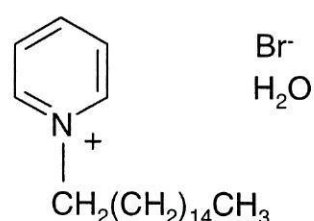


Fig. 1.11 - Estruturas de alguns surfactantes: (a) triton; (b) dodecilsulfato de sódio; (c) cloreto de cetilpiridina (CPC); e (d) brometo de cetilpiridina (CPB).

1.3 – OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo global desta dissertação foi montar um sistema para detecção de quimioluminescência e implementar e otimizar três sistemas com detecção quimioluminescente para análise quantitativa de catião Cu(II) a níveis vestigiais, cloro livre e anião bromato em águas. Do ponto de vista instrumental a montagem do sistema de detecção envolveu fundamentalmente a integração de um tubo fotomultiplicador, sistema de alimentação e célula de fluxo de quimioluminescência. A estratégia de optimização envolveu técnicas de planeamento de experiências.

As três espécies químicas em análise estão relacionadas com dois tipos de problemas que afectam a química do ambiente natural: (i) o catião Cu(II) está relacionado com problemas de poluição de sistemas ambientais com metais pesados; (ii) o cloro livre e o anião bromato estão relacionados com processos químicos de tratamento de águas com cloro e ozono – águas para consumo humano (água potável) ou no tratamento de águas residuais.

O objectivo final do trabalho realizado é avaliar as potencialidades dos sistemas de detecção desenvolvidos na construção de sistemas portáteis que permitam a realização de análises químicas quantitativas nos locais de amostragem.

1.4 – ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Além deste capítulo de introdução às técnicas quimioluminescentes, esta dissertação contém: um **segundo** capítulo, onde se apresentam os fundamentos teóricos das técnicas de planejamento de experiências e análise de dados experimentais usadas neste trabalho; um **terceiro** capítulo, onde se descreve o trabalho experimental; três capítulos, **quarto, quinto e sexto**, onde se apresentam os resultados obtidos com três sistemas quimioluminescentes para análise de catião Cu(II), cloro livre e anião bromato; e, finalmente, um **sétimo** capítulo de conclusões globais.

1.5 – BIBLIOGRAFIA

1. D.B. Paul, *Talanta*, **25**, 377 (1978).
2. D. Price, P.J. Worsfold, R.F.C. Mantoura, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 121 (1994).
3. J.D.Ingle, S.R.Crouch, *Spectrochemical Analysis*, Prentice-Hall, London, 1988, 478-485.
4. R. Albertin, M.A.G.Arribas, E. L. Bastos, S.Röpke, P.N.Sakai, A.M.M. Sanches, C.V. Stevani, I. S.Umez, J. Yu, W.J. Baader, *Quimica Nova*, **21**, 6 (1998)
5. L.J. Kricka, G.H. Thorpe, *Analyst*, **108**, 1274 (1983).
6. R.E.Milofsky, J.W.Birks, *Anal. Chem.*, **62**, 1050 (1990).
7. B.Mann, M.L.Grayeski, *Anal. Chem.*, **62**, 1536 (1990).
8. O.M.Steijger, P.Rodenburg, H.Lingeman, U.Brikman, J.Holthuis, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 233 (1992).
9. P.Jones, T.Williams, L.Ebdon, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 291 (1990).
10. K. Sato, S. Tanaka, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 459 (1990).
11. M.M. Müller, A. Griesmacher, M. Grabenwöger, *Mikrochimica Acta*, 157 (1991).
12. D. Price, R.C. Mantoura, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, **377**, 145 (1998).
13. K.Okamura, T.Gamo, H.Obata, E.Nakayama, H.Karatani, Y.Nozaki, *Anal. Chim. Acta*, **377**, 125 (1998).
14. J.Jong, J.den Das, U.Bathmann, M.Stoll, G.Kattner, R.Nolting, H.Baar, *Anal. Chim. Acta*, **377**, 113 (1998).
15. T. Jonsson, K. Irgum, *Anal. Chim. Acta*, **400**, 257 (1999).
16. M.Yamada, S.Suzuki, *Anal. Letters*, **17**, 251 (1984).
17. K.H. Coale, K.S. Johnson, P.M. Stout, C.M. Sakamoto, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 345 (1992).
18. H.Zamzow, K.H.Coale, K.S. Johnson, C.M. Sakamoto, *Anal. Chim. Acta*, **377**, 133 (1998).
19. M.Yamada, T. Hobo, S.Suzuki, *Anal. Letters*, **21**, 1887 (1988).
20. T. Nakagama, M. Yamada, T.Hobo, *Analyst*, **114** (1989) 1275.

21. G.P. Irons, G.M.Greenway, *Analyst*, **120**, 477 (1995).
22. J. Stauff, W.Jaeschke, *Atmos. Environ.*, **9**, 1038 (1975).
23. W.Jaeschke, *Atmos. Environ.*, **12**, 715 (1978).
24. K.Takeuchi, T. Ibusuki, *Anal. Chim. Acta*, **174**, 359 (1985).
25. A.B. Syropoulos, E.G. Sarantonis, A.C. Calorkerinos, *Anal. Chim. Acta*, **239**, 195 (1990).
26. J.T. Overbeek, *Pure & Appl. Chem.*, **46**, 91 (1976).
27. P.C. Hiemenz, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1986, Cap. 8.
28. N.M. van Os, J.R. Haak, L.A.M. Rupert, *Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
29. U.R.Kim, B.J.Jeong, M.J.Lee, K.S. Min, *J.Korean Chem. Soc.*, **37**, 22 (1993).

2 - PLANEAMENTO EXPERIMENTAL E OPTIMIZAÇÃO

Neste capítulo apresentam-se as metodologias de planeamento experimental e técnicas de análise dos dados experimentais utilizadas neste trabalho com o objectivo de estudar, modelar e otimizar os sistemas quimioluminescentes.

2.1 - INTRODUÇÃO

As metodologias de **planeamento experimental** podem ser usadas em dois contextos. Descrever um conjunto de experiências que são realizadas com o objectivo de desenvolver um **modelo**, como por exemplo um modelo de regressão (secção 2.7.1) ou um modelo ANOVA (secção 2.7.3). As metodologias de planeamento experimental podem também ser usadas num contexto de **optimização**, com o objectivo de determinar de uma forma eficiente um conjunto de condições que são necessárias para obter as melhores condições (as condições óptimas) de um processo tecnológico ou sistema químico em geral - a partir daqui o objecto da optimização é denominado **sistema**. No entanto, como um dos caminhos para se atingir a optimização é através da modelação, neste trabalho as metodologias de planeamento experimental são utilizadas sequencialmente com o objectivo de modelar e otimizar – **modelos óptimos**.

Os modelos óptimos são caracterizados por um conjunto de condições, ou valores para os **factores**. Factor é o nome dado no planeamento experimental às variáveis que são modificadas de forma controlada de modo a estudar o seu efeito no sistema e que poderá ter influenciar as suas características. De uma maneira geral existem vários factores, o que faz do planeamento experimental um problema de análise multivariável. As características dos sistemas que serão objecto de um processo de optimização denominam-se de **respostas** – variáveis que descrevem a performance do sistema.

Deste modo, existem dois tipos de variáveis: as respostas e os factores. As respostas são as variáveis dependentes e os factores as independentes. Representando as respostas pela letra y e os factores pela letra x ,

$$(y_1, y_2, \dots, y_p) = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (2.1)$$

Na maior parte dos casos, cada uma das respostas y é modelada separadamente pelo que a equação 2.1 vem,

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (2.2)$$

O modelo que relaciona a resposta com o efeito dos factores é denominado de função de resposta ou, devido ao seu carácter multivariável, de **superfície de resposta**.

Os modelos são obtidos dos dados experimentais. Nas metodologias de planeamento experimental (do inglês “experimental design”) a palavra “planeamento” significa que as condições experimentais são definidas não de uma forma arbitrária mas segundo um protocolo bem estudado.

2.2 - OBJECTIVOS DO PLANEAMENTO EXPERIMENTAL

O planeamento experimental é usado para obter um sistema com umas características desejadas segundo um processo eficiente. Assim pretende-se

- compreender o efeito dos factores e/ou
- modelar a relação entre y e x

com um mínimo número de experiências. Para se atingir estes objectivos é necessário conhecer as características experimentais dos sistemas em análise. Se o planeamento experimental for bem aplicado obtém-se uma economia de custos.

Nos processos de optimização normalmente pretende-se analisar o efeito dos factores e modelar a resposta (Fig. 2.1) [1]. Inicialmente procede-se à determinação dos factores que influenciam a resposta e em que extensão. O passo seguinte é obter um modelo que descreva de forma quantitativa esses efeitos nas resposta do sistema. Eventualmente, pode-se tentar obter as condições óptimas para os níveis dos factores que dão origem ao óptimo na performance do sistema. O óptimo pode corresponder ao valor máximo ou mínimo das respostas, mas, na maior parte dos casos reais o interesse está em obter resultados suficientemente bons.

As aplicações das metodologias de planeamento experimental são muitas e diversas nas áreas das ciência e tecnologia, como por exemplo: (i) química analítica - maximizar a absorção num procedimento colorimétrico com os factores quantidade de reagente, pH e tipo de tampão; (ii) química orgânica – maximizar o rendimento de uma síntese enquanto minimiza a formação de produtos laterais; (v) indústria química – otimizar as propriedades de viscosidade de um plástico em função de factores relacionados com o processo de preparação. O planeamento experimental não é apenas usado para obter respostas óptimas mas também para obter modelos óptimos.

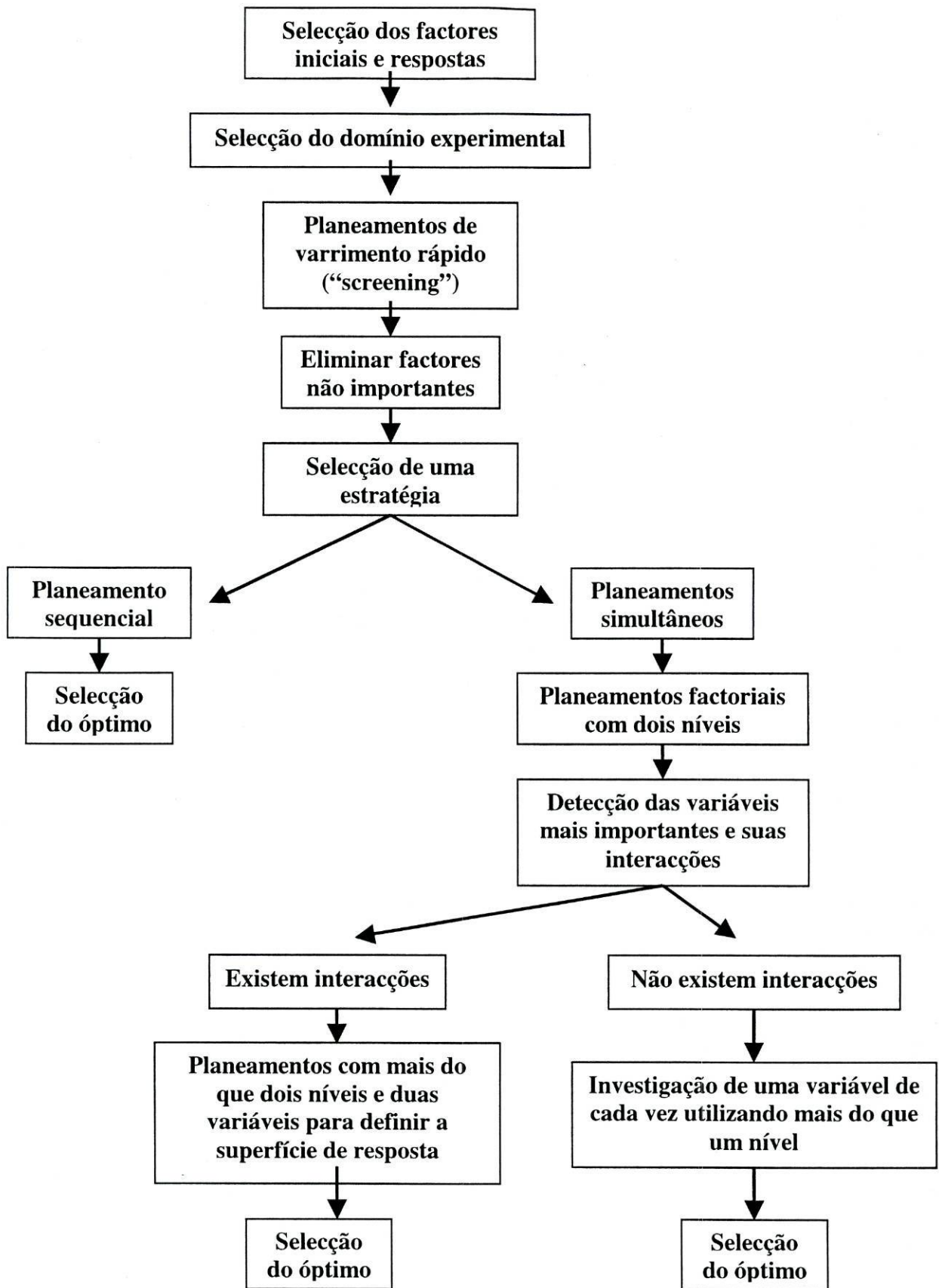


Fig. 2.1 – Os passos principais num planeamento experimental [1].

2.3 - OS FACTORES EXPERIMENTAIS E SELECÇÃO DAS RESPOSTAS

2.3.1 – Factores

Os factores em planeamento experimental podem ser **quantitativos** (por exemplo, o pH) ou **qualitativos** (por exemplo, o tipo de catalisador). Os diferentes valores que o factor ter são denominados de **níveis** – por exemplo se um sistema necessita de ter o factor pH aos valores 5 e 9, então existem dois níveis de pH. A um factor qualitativo pode ser atribuído arbitrariamente um nível – de uma maneira geral atribui-se uma conotação quantitativa de **nível alto e baixo**.

A selecção dos factores é normalmente o primeiro passo de uma aplicação de um planeamento experimental (Fig. 2.1). Por vezes há conhecimento prévio dos factores que mais poderão afectar a resposta, mas, na maior parte dos casos esta informação não está acessível. Neste caso o estudo tem início por se obter uma lista de todos os factores que possam ter um efeito na resposta. De seguida efectua-se um estudo de “screening” para seleccionar os factores que têm efeito significativo na resposta (secção 2.6.2.3).

Uma vez seleccionados os factores, é necessário definir as fronteiras do **domínio experimental**, ou seja, os níveis extremos para os quais os factores serão estudados. O domínio experimental está limitado pelos níveis de cada factor. É necessário uma correcta definição das fronteiras e dos níveis. Fronteiras muito largas levam a execução de experiências em regiões pouco importantes e levam um modelo com pouca precisão na área experimental em investigação. No entanto, fronteiras muito apertadas podem não conter o óptimo.

2.3.2 – Respostas

Um passo muito importante no planeamento experimental é a selecção da(s) resposta(s) a serem investigadas. Normalmente, cada resposta é modelada em separado e procura-se obter os factores que levam à resposta máxima ou mínima. É normalmente difícil, e errado, modelar respostas compostas sendo, sempre que possível, preferível modelar as respostas em separado e combinar num passo seguinte as funções de resposta.

No sentido clássico a optimização procura o máximo ou o mínimo da função de resposta. No entanto, por vezes estas duas hipóteses não são necessariamente a melhor

escolha. Considere-se por exemplo a superfície de resposta da Fig. 2.2 onde o ponto do máximo está localizado num cume muito estreito (ponto A). Pequenas variações no valor de um dos factores leva a uma rápida variação da resposta dos sistema. Neste caso seria melhor optar pelo ponto B da superfície de resposta (Fig. 2.2). Neste caso a resposta não é tão alta mas é muito **mais robusta** – pequenas variações nos factores não provocam grandes variações na resposta.

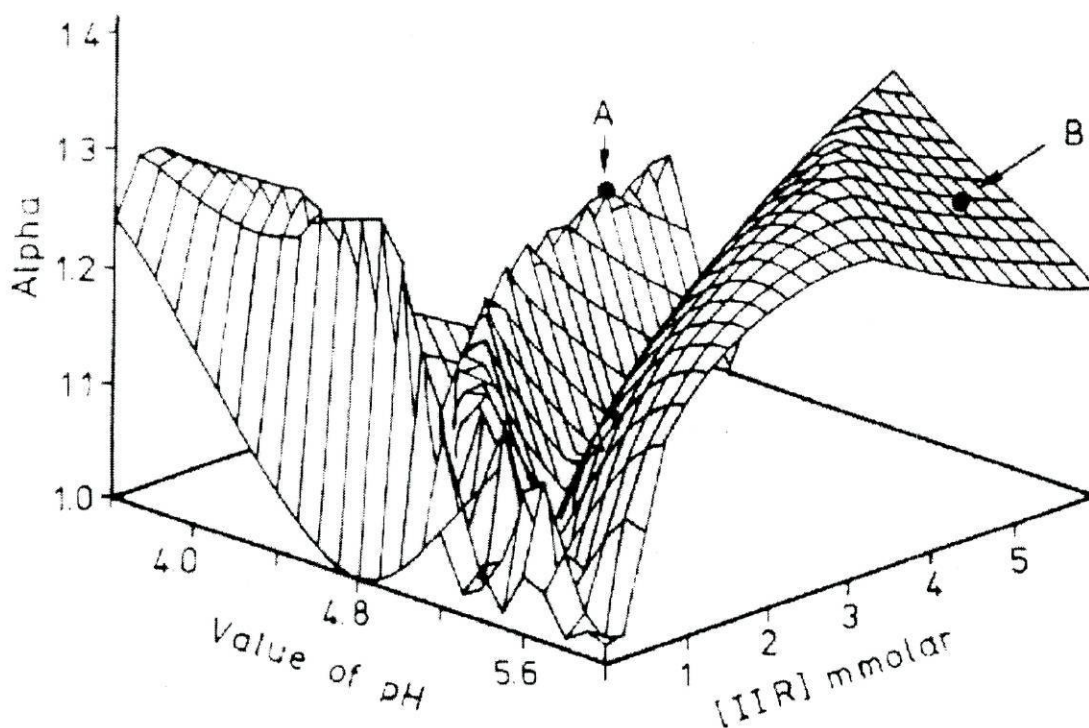


Fig. 2.2 - Superfície de resposta que mostra que o ponto B é mais robusto do que o ponto A [1].

2.4 - ESTRATÉGIAS DE OPTIMIZAÇÃO

2.4.1 - Estratégias univariável e multivariável

As metodologias do planeamento experimental tem uma natureza **multivariável**. Este tipo de análise está em oposição com uma estratégia clássica de variar um factor de cada vez (**estratégica univariável**). A estratégia univariável não deve ser usada quando não se conhece os sistemas porque não é sensível à existência de **interacções entre os factores** em investigação – quando existem interacções deve-se utilizar uma estratégia multivariável.

A Fig. 2.3 mostra, para um exemplo simples de dois factores (x_1 e x_2), a limitação da estratégia univariável na optimização de sistemas onde há interacção entre os factores. A Fig. 2.3.a ilustra um sistema sem interacção desses factores em que se parte de um ponto inicial A e pretende-se atingir o ponto de óptimo O. Na estratégia univariável o factor x_1 seria variado para um valor constante de x_2 e atingia-se o ponto B. De seguida, o factor x_2 seria variado para um valor constante de x_1 e atingia-se o ponto óptimo. Neste caso a estratégia univariável teve êxito porque não há interacção entre os factores. Na Fig. 2.3.b um procedimento semelhante ao anterior levaria ao ponto C que está longe de ser o óptimo – este só seria atingido após repetição do procedimento, para o qual seria necessário realizar um número de experiências muito elevado. Para casos com mais do que dois factores o esforço experimental seria muito superior o que comprometia o processo de optimização. Este tipo de problemas ocorrem quando há **interacção entre os factores**.

A existência de interacção é ilustrada na Fig. 2.3.c. Neste exemplo, quanto o factor x_2 é aumentado do nível c para o nível d com o factor x_1 constante num nível baixo (nível a) a resposta do sistema diminui (pontos A e B, respectivamente).

No entanto, quando a mesma transformação ocorre para o factor x_2 constante num nível alto (nível b) observa-se que a resposta do sistema aumenta (pontos C e D, respectivamente). Por outras palavras, o efeito de x_2 na resposta do sistema depende de x_1 o que significa que estes factores interactuam. No caso do exemplo da Fig. 2.3.a esta situação não se verifica porque não há interacção entre os factores. Deste modo, uma estratégia univariável só é eficiente quando não existem interacções entre os factores e deixa de o ser quando existem interacções. Em casos reais, os sistemas com interacções

são mais vulgares do que os sistemas onde não há interacções pelo que uma estratégia multivariável é normalmente mais eficiente do que uma estratégia univariável.

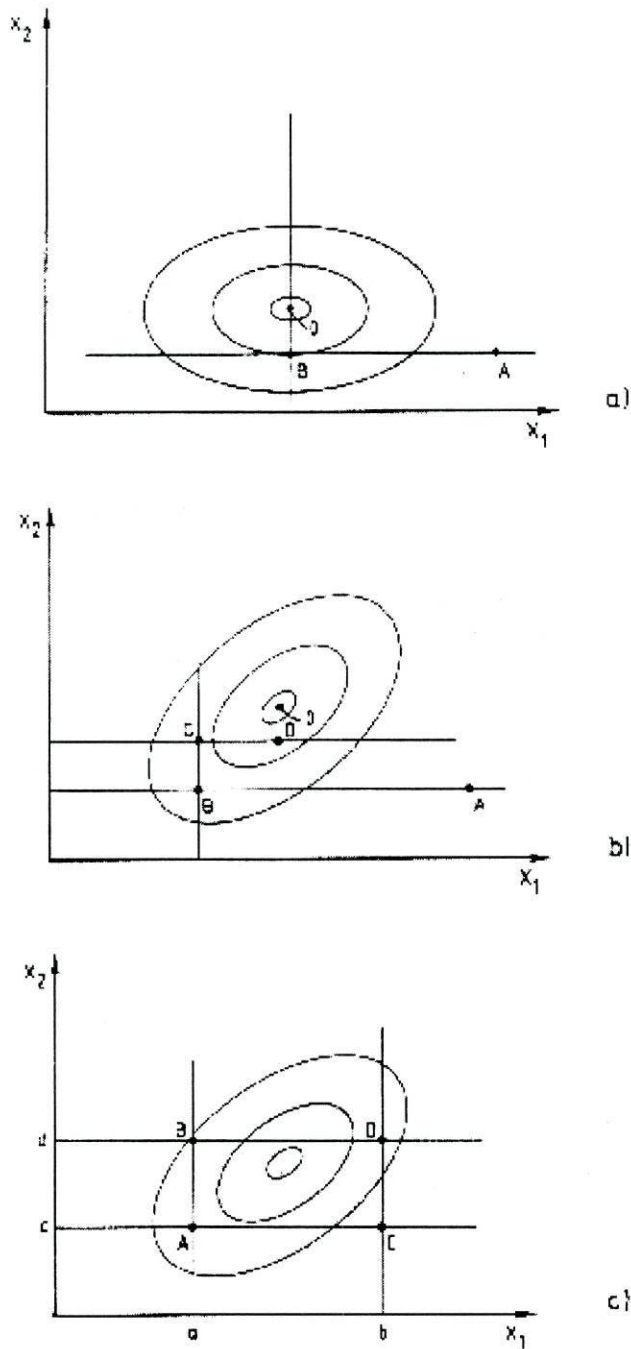


Fig. 2.3 – Optimização de um factor de cada vez por análise das curvas de nível [1]:
 (a) não há interacção entre os factores; (b) há interacção entre os factores; (c) há interacção entre os factores mas o efeito de x_2 é diferente para os dois níveis de x_1 .

2.4.2 - Estratégias de otimização multivariável

Existem duas estratégias de otimização multivariável que são denominadas de **otimização sequencial** e **otimização simultânea**.

Uma estratégia de otimização sequencial consiste na realização de um pequeno conjunto de experiências de cada vez e usar a informação obtida para planejar a experiência que será executada a seguir. Um dos métodos sequenciais mais usados é o **método Simplex** cujo funcionamento para um problema com dois factores é ilustrado na Fig. 2.4.

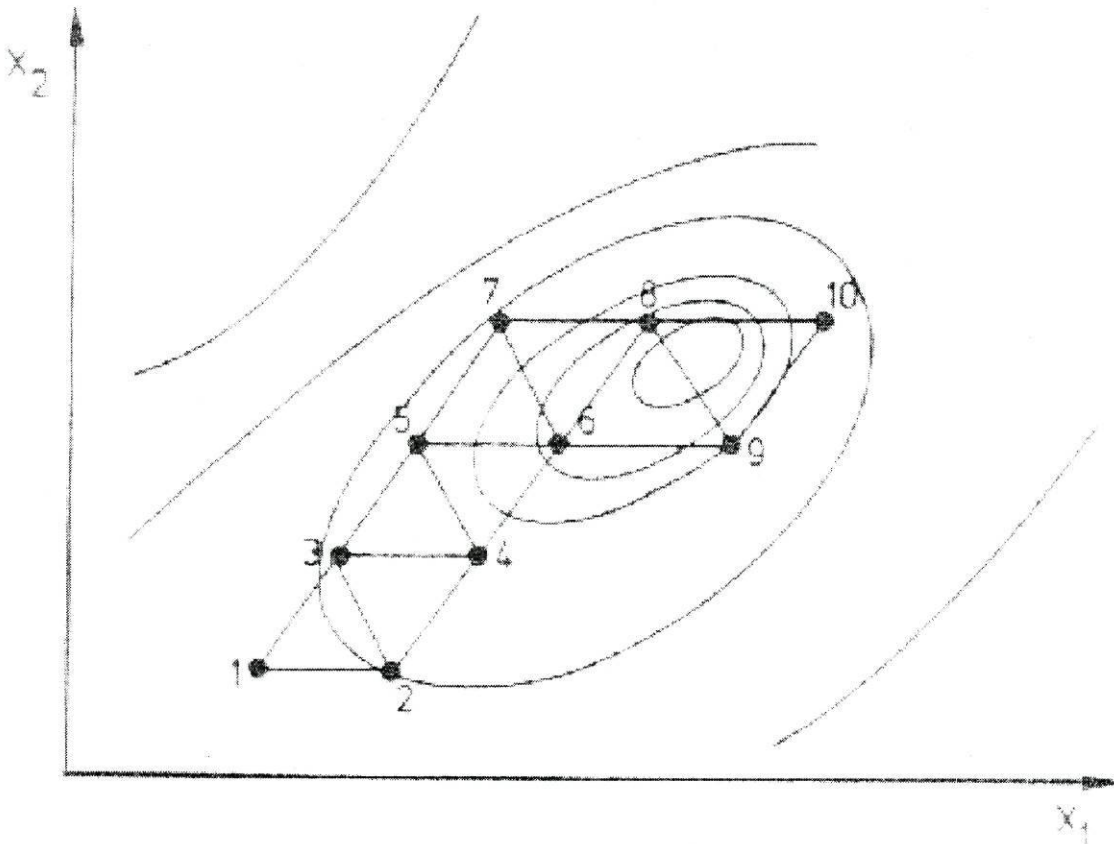


Fig. 2.4 – Exemplo de uma otimização sequencial com o método Simplex [1].

O Simplex corresponde a uma figura geométrica que tem um número de vértices igual ao número de factores a otimizar mais um [2]. O Simplex inicial da Fig. 2.4 tem três vértices (1,2,3), que correspondem a três experiências. A experiência 1 dá origem à pior resposta e, conseqüentemente, conclui-se que este ponto encontra-se na direcção errada. Deste modo, o óptimo deverá localizar-se na direcção oposta. Um novo Simplex é construído utilizando quase todos os vértices do anterior, e um novo vértice é obtido por projecção da pior resposta sobre a direcção do óptimo. Na prática, este procedimento corresponde a obter um novo conjunto de valores para os factores e a obter uma nova resposta (novo vértice do Simplex). Este procedimento é sequencialmente repetido (ver Fig. 2.4), até se atingir um critério de convergência previamente estabelecido.

As estratégias sequenciais devem ser aplicadas quando apenas se pretende determinar o óptimo de um sistema e não há interesse em obter uma relação entre a resposta e os factores. Devido à sua versatilidade em escalar superfícies de resposta os métodos sequenciais são muito eficientes na determinação do óptimo. Aliás, para se melhorar a performance do método Simplex original (Fig. 2.4), diversas modificações do método Simplex foram propostas que permitem acelerar a detecção do óptimo e a sua detecção mais precisa [2]. As modificações propostas tornaram mais versátil os movimentos do Simplex. No Simplex modificado, esquematicamente representado na Fig. 2.5, existem quatro hipóteses para a reflexão do vértice P (que corresponde à pior resposta): manter o tamanho original do Simplex (R_P); expandir o Simplex (E_P); contrair (no sentido positivo) o Simplex (C^+_P); e, contrair (no sentido negativo) o Simplex (C^-_P).

Embora a informação recolhida pelo Simplex durante a sua evolução pela superfície de resposta permita modelá-la, o modelo obtido não será necessariamente um bom modelo. Na realidade, o caminho percorrido pelo Simplex poderá não ser representativo da superfície de resposta e, portanto, o resultado da modelação dependerá de um factor aleatório que é o caminho percorrido pelo Simplex. Quando se efectua mais do que uma medição experimental para a resposta do sistema os métodos sequenciais não são recomendados. Por estes motivos os métodos de optimização simultânea devem ser privilegiados em qualquer estudo de planeamento experimental.

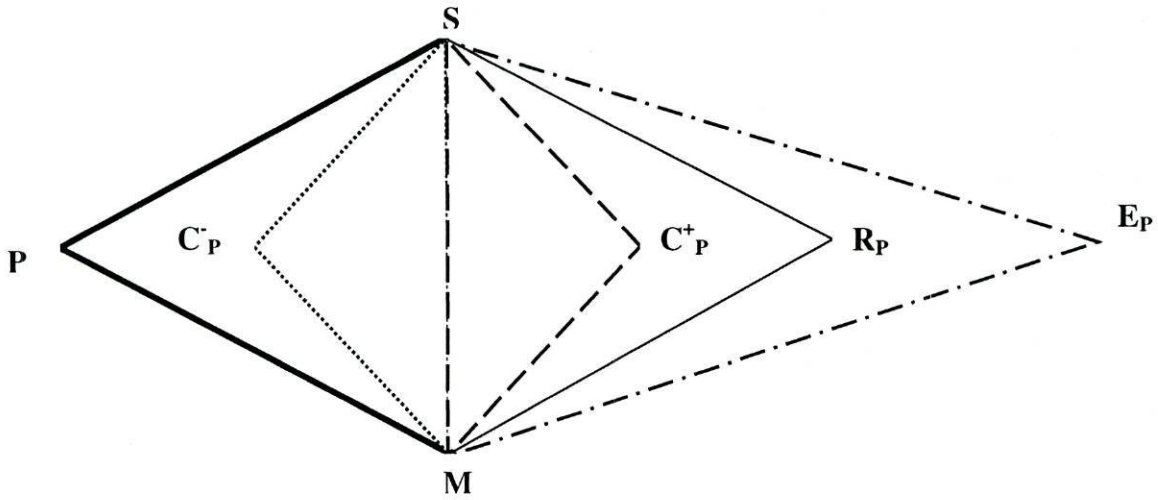


Fig. 2.5 – Possíveis movimentos do Simplex modificado – ver no texto o significado das letras da figura.

2.5 - O MODELO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Os planeamentos experimentais são usados para desenvolver **modelos empíricos** o que significa que são usados em situações onde não é possível obter uma função de resposta para o sistema em estudo a partir da teoria. Na prática, esta situação é muito vulgar. A teoria permite prever que haverá uma relação entre um determinado factor e a resposta, até permite derivar o tipo de função (linear, quadrática, etc.) que poderá ser obtida, mas raramente dá os coeficientes dessa função.

Funções de resposta típicas para um sistema com uma resposta (y) e dois factores x_1 e x_2 são as seguintes:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (2.3)$$

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (2.4)$$

Estas funções consistem no seguinte.

- (i) Um termo constante b_0 , que é o valor de y quando x_1 e x_2 são zero. Muitas vezes nos planeamentos experimentais são utilizados **factores codificados**. Suponha-se que um dos factores é uma concentração de um reagente e que se realizam experiências a dois níveis, 0,1 M e 0,3 M. Se estes dois níveis da concentração forem codificados como -1 e $+1$, o nível 0 corresponderia a 0,2 M – b_0 corresponde ao valor de y para este valor da concentração.
- (ii) Termos de primeira ordem (eq. 2.3) e de segunda ordem (eq. 2.4) para x_1 e x_2 .
- (iii) O último termo das equações 2.3 e 2.4 é o termo da interacção.

Este tipo de modelo é válido para a denominadas variáveis ou **factores de processo**. Em contraste a estas variáveis existem as variáveis ou **factores de misturas**. Factores de mistura são componentes de uma mistura e são caracterizados pelo facto de que a sua soma ser igual a 1 (por exemplo, as fracções de acetonitrilo, metanol e água numa mistura ternária de solventes). No caso das variáveis de processo esta condição não se verifica, como por exemplo para a temperatura, pH e características de um reactor. Deve-se notar que os planeamentos experimentais que envolvem factores de misturas denominam-se **planeamentos de misturas** e os que envolvem factores de processo denominam-se **planeamentos factoriais**. Atendendo ao tipo de sistemas em estudo nesta dissertação apenas serão abordados planeamentos factoriais.

O modelo para um sistema com factores de processo é de segunda ordem – contém termos quadráticos e interacções binárias. Em princípio pode-se colocar a hipótese de existirem termos de terceira ordem ou de ordem superior, mas de uma maneira geral não são necessários. Interacções ternárias são raramente significativas (secção 2.6.3) e modelos de terceira ordem ou modelos não lineares ocorrem raramente. Na prática, a natureza pode ser aproximadamente, pelo menos localmente, por modelos do tipo **funções de segunda ordem** traduzidas por **modelos que são lineares ou de primeira ordem nos parâmetros de regressão (b)**.

Os modelos descritos pelas equações 2.3 e 2.4 são **modelos de regressão**. Os coeficientes de regressão “b” são obtidos por regressão múltipla (secção 2.7.2), pelo menos quando o número de experiências é maior ou igual ao número de coeficientes. Quando a regressão múltipla é utilizada é necessário observar as seguintes condições: (i) verificar se todos os termos no modelo são necessários; (ii) validar o modelo; (iii) obter estimativas o mais precisas possível dos coeficientes; e, (iv) tentar obter o óptimo ou outras regiões com interesse com um erro menor possível.

2.6 - PLANEAMENTOS FACTORIAIS

2.6.1 – Introdução

Os **planeamentos simultâneos** são denominados de **planeamentos factoriais** [1,3-7]. Este tipo de planeamento inclui um vasto conjunto de métodos que podem ser agrupados em duas classes.

A primeira classe inclui os planeamentos que têm como objectivo detectar quais os factores que mais influência na resposta do sistema e obter uma estimativa para essa influência. O planeamento mais elementar desta classe é o **planeamento factorial completo com dois níveis**. Neste desenho cada factor é estudado a dois níveis e as experiências são realizadas para cada uma das possíveis combinações dos níveis – para um número de factores igual a nf o **número total de experiências é igual a 2^{nf}** . Estes desenhos permitem estimar o efeito de todos os factores e das suas interações e obter um modelo de primeira ordem incluindo as interações binárias (eq. 2.3).

Quando o número de factores aumenta, o número de experiências também aumenta. Por exemplo para 10 factores o número de experiências é igual a 1024 o que torna inviável qualquer estudo com estas características. Nestes casos é necessário utilizar apenas uma fracção desse conjunto de experiências, por exemplo 1/2, 1/4 ou 1/8. Estes planeamentos são denominados de **planeamentos factoriais fraccionados**. Neste tipo de planeamentos, como apenas se realizam algumas experiências relativamente ao planeamento completo, perde-se alguma informação acerca de algumas ou todas as interações entre os factores [1,3-6].

Em alguns estudos não é necessário obter informação acerca das interações, mas apenas determinar quais são os factores mais importantes para a resposta do sistema. Quando se estudam novos sistemas o primeiro objectivo é verificar quais dos factores possíveis afectam a sua resposta e assim é necessário efectuar o “screening” dos factores. Nestes casos, um planeamento factorial de dois níveis com o menor número de experiências deve ser utilizado ou um **planeamento de Plackett-Burman**.

Uma segunda classe de planeamentos factoriais é utilizada em modelação e construção de superfícies de resposta. No caso geral, este tipo de superfícies são curvas (modelos de segunda ordem, eq. 2.4), e para as descrever são necessários pelo menos três níveis para cada factor. Os planeamentos típicos desta classe são os **planeamentos de compósito central** embora possam ser utilizados planeamentos factoriais completos

com três (número de experiências = 3^{nf}), ou mais níveis (n) (número de experiências = n^{nf}).

2.6.2 – Planejamentos factoriais completos

2.6.2.1 – Formulação do planeamento

O planeamento factorial completo mais simples tem dois factores com dois níveis e está representado na Fig. 2.6.a. Na Fig. 2.6.b representa-se um planeamento factorial completo com três factores e dois níveis. Como se viu atrás e pode-se verificar na Fig. 2.6, o número de experiências a realizar em cada um destes três exemplos são 4 e 6 ($=2^{nf}$).

Os níveis do factores podem ser representados de várias maneiras. Nesta dissertação e nos planeamentos com dois níveis estes serão representados por +1 (valor mais alto do factor) e -1 (valor mais baixo do factor). Esta representação corresponde a trabalhar com variáveis codificadas (secção 2.5) ou seja reduzir o seu intervalo de variação experimental ao intervalo de $[-1, +1]$. Nos planeamentos com três níveis, inclui-se um nível intermédio que corresponde ao nível 0 (zero). Quando os factores são qualitativos, o valor +1 corresponde a um valor maior ou à existência de uma característica e o valor -1 a um valor menor ou à inexistência dessa característica.

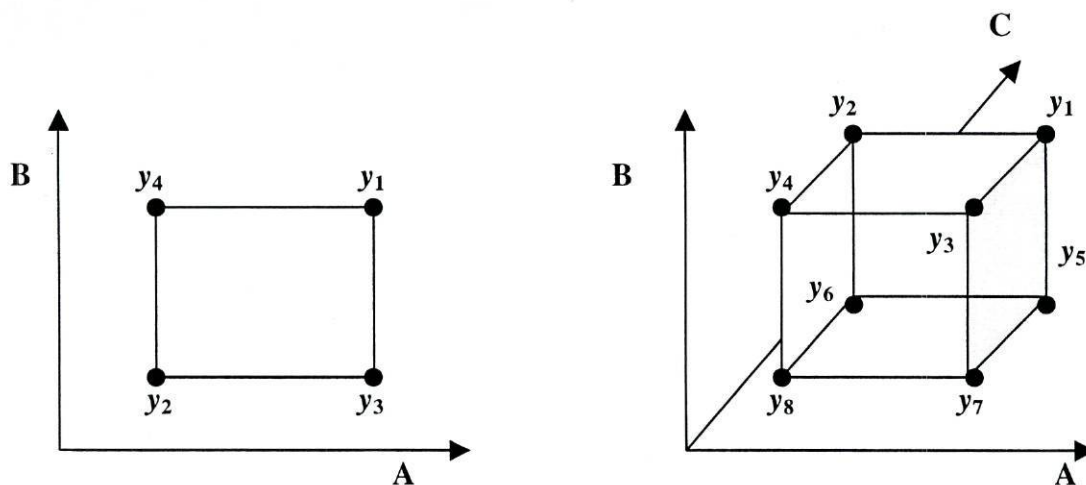


Fig. 2.6 – Esquema de um planeamento factorial completo com dois (a) e três (b) factores com dois níveis.

Para o caso de dois factores e dois níveis a lista das experiências a realizar (**matriz do planeamento**), que são todas as combinações possíveis dos factores aos níveis considerados, é apresentada nas duas primeiras colunas da Tabela 2.1. A terceira coluna (interacção), é obtida por simples multiplicação das duas primeiras, e é apenas útil para calcular o efeito da interacção na resposta dos sistema (como se apresentará na secção seguinte).

De uma maneira geral as experiências devem ser realizadas segundo uma **sequência aleatória** para evitar artefactos nas conclusões. Outro factor importante a ter em conta na realização experimental é a **repetição das experiências** porque, como se focará mais em baixo, permite obter mais informação sobre o sistema em estudo.

Tabela 2.1 – Planeamento das quatro experiências num planeamento experimental completo com dois factores e dois níveis.

| Factor A | Factor B | Interacção AxB | Experiência |
|----------|----------|----------------|-------------|
| +1 | +1 | +1 | 1 |
| -1 | -1 | +1 | 2 |
| +1 | -1 | -1 | 3 |
| -1 | +1 | -1 | 4 |

2.6.2.2 – Estimativa directa dos efeitos

A fase seguinte é a análise das respostas para calcular o efeito dos factores na resposta do sistema. Dois tipos de efeitos têm que ser considerados: efeitos principais (o efeito dos factores); efeitos das interacções entre os factores. No caso particular de um planeamento completo com dois factores e dois níveis têm que se determinar dois efeitos principais (factores A e B) e um efeito da interacção entre os dois factores. No caso particular de um planeamento completo com três factores e dois níveis têm que se determinar três efeitos principais (factores A, B e C) e quatro efeitos das interacções (três binários, AB, AC e BC, e um ternário, ABC).

O cálculo dos efeitos principais consiste em calcular a variação provocada por um factor quando os outros estão constantes. Por exemplo, os dois efeitos principais resultantes de um planeamento factorial completo com dois factores e dois níveis são calculados do seguinte modo,

$$\text{Efeito de A} = [(y_1 - y_4) + (y_3 - y_2)]/2 = (y_1 - y_2 + y_3 - y_4)/2 \quad (2.5)$$

$$\text{Efeito de B} = [(y_1 - y_3) + (y_4 - y_2)]/2 = (y_1 - y_2 - y_3 + y_4)/2 \quad (2.6)$$

De uma maneira geral os efeitos principais são determinados somando todas as respostas correspondentes ao nível +1 e subtrair as correspondentes ao nível -1 (diferença entre as médias das respostas nos níveis alto e baixo). Usando a Tabela 2.1, este cálculo é automático. Este método pode ser utilizado para calcular o efeito da interacção entre os factores A e B,

$$\text{Efeito de AxB} = (y_1 + y_2 - y_3 - y_4)/2 \quad (2.7)$$

O calculo dos efeitos de uma interacção binária corresponde à média da diferença do efeito do factor A quando o factor B está no nível mais elevado pelo efeito do factor A quando o factor B está no nível mais baixo.

Uma análise preliminar dos efeitos permite detectar os factores que mais influenciarão o sistema. No entanto, uma análise pormenorizada do real significado dos efeitos só poderá ser efectuada após a sua análise estatística como se descreve na próxima secção.

2.6.2.3 - Análise da significância (ANOVA) dos efeitos

O melhor método de analisar a significância dos efeitos num planeamento experimental completo com dois níveis é efectuando uma ANOVA com efeitos fixos de múltiplas vias. Na Tabela 2.2 mostra-se uma Tabela de ANOVA de uma via (um factor) – quando existem vários factores e interacções acrescentam-se mais linhas à tabela e os graus de liberdade dos “Resíduos” e “Total” têm que ser ajustados.

Tabela 2.2 – Tabela da ANOVA de uma via [1].*

| Fonte da variação | SS | df | MS | F^{**} |
|-------------------|--------|-------|--------|-------------|
| Factor A | SS_A | $k-1$ | MS_A | MS_A/MS_R |
| Resíduos | SS_R | $n-k$ | MS_R | |
| Total | SS_T | $n-1$ | | |

* SS – soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados; F – teste F; k – número de níveis do factor; n – número de experiências (= $k \times$ número de repetições).

** $F_{0.05; k-1, n-k} = \dots$, conclusão acerca da significância do factor A (se $F < F_{0.05; k-1, n-k}$ então o factor contribui significativamente para a resposta do sistema).

A análise dos testes F dos factores e das interacções permite concluir se a sua contribuição é significativa ou não para a resposta do sistema em estudo.

2.6.3 – Planeamentos factoriais fraccionados

O número de experiências num planeamento factorial completo aumenta de forma exponencial com o número de factores. Por exemplo, quando o número de factores é igual a 7 o número de experiências é igual a 128 que são usadas para calcular os seguintes efeitos para além do valor médio: 7 efeitos principais; 21 interacções binárias; 35 interacções ternárias; 35 interacções quaternárias; 21 interacções de cinco factores; 7 interacções de seis factores; e, 1 interacção de sete factores. É claro que existe uma grande redundância e poder-se-á definir um planeamento experimental mais pequeno. De facto, em muitos casos verifica-se que o efeito das interacções diminui à medida que aumenta o número de factores envolvidos e por conseguinte as interacções de ordem mais elevada podem ser consideradas redundantes. Os planeamentos factoriais fraccionados exploram este aspecto e na matriz do planeamento, as colunas de contrastes para alguns factores são idênticas às colunas correspondentes à interacção de

outros factores. Neste caso, em que as colunas de contrastes são idênticas, diz-se que o efeito do factor se encontra **confundido** com a interacção ou que o factor e a interacção são “**aliases**”.

Para construir planeamentos factoriais fraccionados é necessário definir as equações que traduzem as “**aliases**” também designadas por **geradores do planeamento**. Por exemplo, num planeamento correspondente a meio factorial com dois níveis e três factores (A, B e C), o efeito de um dos factores pode ser confundido com a interacção dos outros dois e neste caso o gerador da matriz do planeamento é traduzido por

$$A \times B = C \quad (2.8)$$

a partir desta equação, calcula-se a expressão de definição dos contrastes, representada por I, que é obtida multiplicado os dois membros do gerador do planeamento,

$$I = A \times B \times C \quad (2.9)$$

As “aliases” de cada efeito no planeamento podem ser calculadas multiplicando-o por I, seguindo as regras algébricas normais, sendo imposta uma condição adicional: os efeitos que surgem no produto um número par de vezes desaparecem. No caso anterior, traduzido por eq. 2.8 e 2.9, obtemos,

$$\text{Aliáse de C} = A \times B \times C^2 = A \times B \quad (2.10)$$

2.6.4 – Planeamentos de Plackett-Burman

Quando existem mais de 7 factores os planeamentos factoriais fraccionados necessitam de um mínimo de 16 experiências para se estudar o efeito de todos os factores [1]. Os planeamentos de Plackett-Burman propõem $(4 \times n)$ experiências, nomeadamente 4, 8, 12, 16, 20, etc., para estudar um número de factores igual a $(4 \times n - 1)$, 3, 7, 11, 15, 19, ..., etc, respectivamente. Quando n é uma potência de 2 estes planeamentos correspondem a um desenho factorial fraccionado [6].

Os planeamentos de Plackett-Burman têm a particularidade das suas colunas serem construídas através de uma permuta cíclica dos contrastes que se encontram

resumidos nas linhas da Tabela 2.3, respectivamente para 12, 20 e 24 experiências. A última experiência dos planeamentos apenas tem contrastes (-) para todos os factores.

Tabela 2.3 – Contrastes para a construção de planeamentos de Plackett-Burman com o número de experiências indicado [6].

| 4xn | Contrastes |
|-----|-----------------------|
| 12 | ++ -++++-+- |
| 20 | ++-++-+-+-----+- |
| 24 | ++++-+-+---+---+----- |

Os planeamentos de Plackett-Burman podem ser utilizados também para estudar um número de factores igual ou superior a $4x(n-1)$ e inferior a $4xn-1$, mas o número de experiências a efectuar é sempre $4xn$.

2.7 - REGRESSÃO MÚLTIPLA

2.7.1 - Introdução

Quando há informação ou suspeitas de que a resposta de sistema depende de diferentes variáveis ou factores (x_1, x_2, \dots, x_m) obtém-se um modelo multivariável que é linear nos coeficientes de regressão “b” que pode ser escrito com seguinte forma geral:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_m x_m = b_0 + \sum_{(i=1,m)} b_i x_i \quad (2.11)$$

A seguinte relação,

$$y = b_0 + b_1/x_1^2 + \dots + b_2 \log x_2 \quad (2.12)$$

também é um modelo linear, porque se considerar-mos $x'_1 = 1/x_1^2$ e $x'_2 = \log x_2$ obtém-se uma relação semelhante à equação 2.11.

Equações não lineares, como por exemplo a seguinte equação,

$$y = b_0 + \log (x_1 - b_1) \quad (2.13)$$

não são podem ser transformadas em equações lineares por mudança de variável. No entanto alguns modelos não lineares são intrinsecamente não lineares uma vez que podem ser transformados em relações lineares. Por exemplo a função exponencial,

$$y = b_0 e^{(b_1 x_1)} \quad (2.14)$$

pode ser transformada na seguinte função linear,

$$\ln y = \ln b_0 + b_1 x_1 \quad (2.15)$$

Um caso especial de modelos lineares são os polinómios. Se na equação 2.11, $x_1 = x, x_2 = x^2, \dots, x_m = x^m$, obtém-se um polinómio de grau m entre a resposta e o factor, representado pela seguinte equação,

$$y = b_0 + b_1 x + \dots + b_m x^m = b_0 + \sum_{(i=1,m)} b_i x^i \quad (2.16)$$

Apenas quando $m=1$ é que o modelo linear define uma linha recta. Todos os outros modelos lineares correspondem a representações gráficas não lineares. Assim, e para evitar confusões entre a definição de modelos não lineares e modelos lineares que dão origem a representações não lineares, denominam-se estes últimos por **modelos lineares curvilíneos**.

2.7.2 - Estimativa dos coeficientes da regressão

Um dos métodos mais vulgares para obter estimativas dos coeficientes de regressão é o **método dos mínimos quadrados**. Considere-se que se realizam n experiências, e obtêm-se n valores de y (y_1, y_2, \dots, y_n) cada um com uma variância σ^2 , após n combinações diferentes das variáveis independentes (factores) x_1, x_2, \dots, x_m ($n > m$). Assumindo um modelo linear semelhante ao da eq. 2.11, cada experiência pode ser representada como,

$$y_i = b_0 + b_1 x_{i1} + \dots + b_m x_{im} + \varepsilon_i \quad \text{com } i = 1, 2, \dots, m \quad (2.17)$$

onde y_i é a resposta da experiência i , x_{ik} é o valor do factor k na experiência i , e ε_i é o resíduo na experiência i .

O método dos mínimos quadrados permite estimar os p ($p = m + 1$) coeficientes da regressão por minimização da **soma dos quadrados dos resíduos** (SQR) o que envolve a resolução de um sistema de p equações com p incógnitas. Formalizando este problema numa notação matricial começa-se por definir o vector coluna das respostas \mathbf{y} ($n \times 1$), o vector coluna dos coeficientes da regressão \mathbf{b} ($p \times 1$) e a matriz das variáveis independentes \mathbf{X} ($n \times p$). A primeira linha da matriz \mathbf{X} é $[1 \ x_{11} \ x_{12} \ \dots \ x_{1m}]$ e a primeira coluna contendo 1 permite estimar o coeficiente b_0 (a intercepção). É necessário definir o vector coluna dos resíduos $\boldsymbol{\varepsilon}$ ($n \times 1$). O modelo representado pela eq. 2.17 pode ser apresentado em notação matricial,

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \mathbf{b} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (2.18)$$

A resolução desta equação pelo método dos mínimos quadrados dá origem às equações normais (multiplicando à esquerda ambos os membros da eq. 2.18 pela matriz transposta de \mathbf{X} , \mathbf{X}^T),

$$\mathbf{X}^T \mathbf{X} \mathbf{b} = \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (2.19)$$

Quando a matriz $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})$ é não singular pode-se obter uma estimativa do vector \mathbf{b} , aqui denominado \mathbf{b}' ,

$$\mathbf{b}' = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (2.20)$$

Como as variáveis foram planeadas (planeamento experimental) para serem **ortogonais**, portanto não estão correlacionadas, significa que a matriz $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})$ é diagonal e facilmente se obtém a inversa.

Com a estimativa dos coeficientes de regressão pode-se obter uma estimativa do vector das respostas \mathbf{y} , aqui denominado \mathbf{y}' ,

$$\mathbf{y}' = \mathbf{X} \mathbf{b} = \mathbf{X} (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (2.21)$$

A partir das respostas experimentais (vector \mathbf{y}) e das suas estimativas (vector \mathbf{y}') pode-se calcular a variância residual (s_e^2) que é uma estimativa do erro experimental, σ^2 , se o modelo utilizado estiver correcto,

$$s_e^2 = \Sigma e_i^2 / (n-p) = \Sigma (y_i - y'_i)^2 / (n-p) \quad (2.22)$$

onde $e_i = (y_i - y'_i)$ representa o resíduo da experiência i .

As propriedades de variância do vector \mathbf{b}' é expresso pela matriz de covariância, $\mathbf{Cov}(\mathbf{b}')$ calculada pela seguinte expressão [4],

$$\mathbf{Cov}(\mathbf{b}') = \sigma^2 (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \quad (2.23)$$

Os elementos da diagonal principal da matriz de covariância são as variâncias dos coeficientes de regressão.

2.7.3 - Comparação dos coeficientes da regressão com os efeitos

Para um planeamento factorial completo com dois factores e dois níveis o modelo que está subjacente à ANOVA dos efeitos (secção 2.6.2.3) é do tipo,

$$y = \mu + a + b + (ab) + e \quad (2.24)$$

Os efeitos a , b e ab estão associados aos efeitos principais devidos a x_1 e x_2 e à interacção entre x_1 e x_2 , respectivamente. Assim, a eq. 2.24 pode ser escrita como a eq. 2.3 que é a equação de regressão,

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 + e \quad (2.25)$$

Nesta equação, b_1 é uma medida do efeito de x_1 . Na realidade, b_1 descreve o efeito em y quando x_1 vai de 0 até +1. No entanto, os coeficientes de regressão b correspondem apenas a metade do valor dos efeitos porque estes são definidos como a diferença de y para os níveis -1 e $+1$ do factor.

2.7.4 - Validação do modelo

2.7.4.1 – Análise dos resíduos e teste de normalidade

Os resíduos podem dar informações úteis sobre a qualidade do ajuste dos resultados experimentais ao modelo proposto. A simples representação dos resíduos e_i em função y'_i pode dar informação sobre a qualidade do ajuste como se mostra em três exemplos na Fig. 2.7.

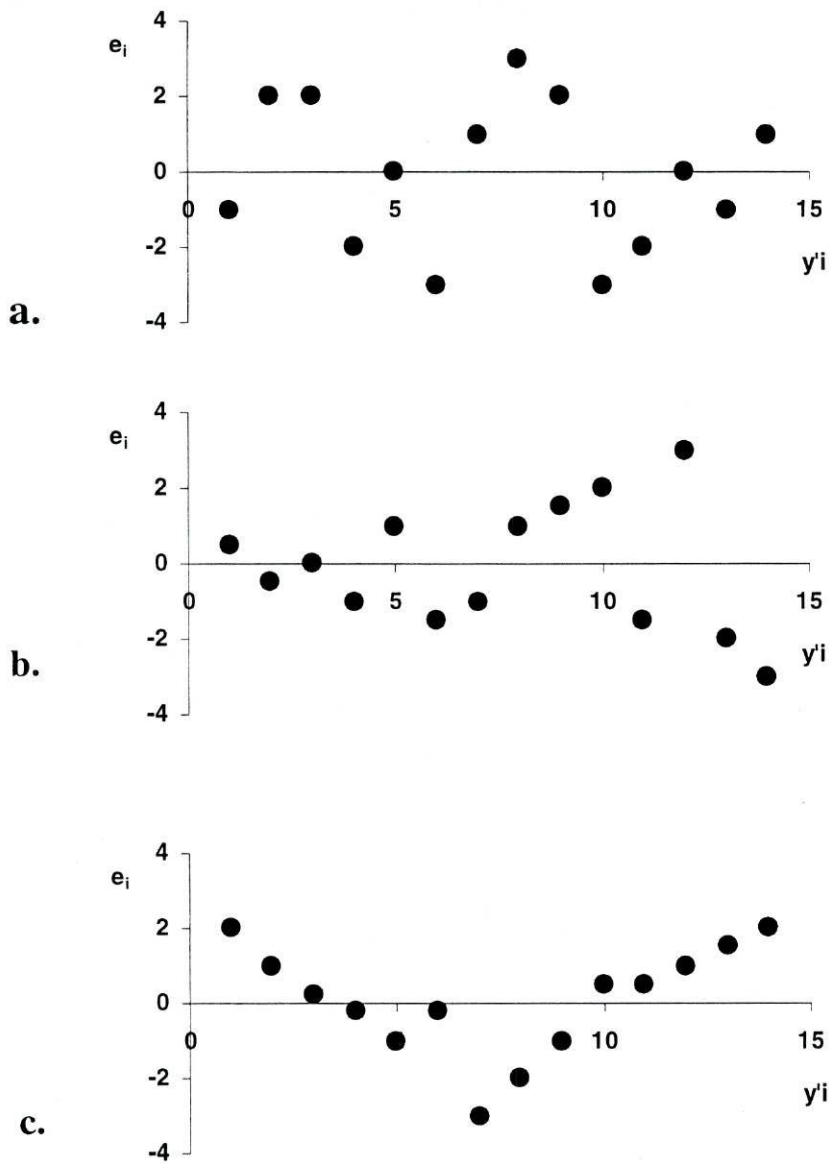


Fig. 2.7 – Exemplos de gráficos de resíduos.

A Fig. 2.7.a mostra que não existe nenhuma anormalidade - os resíduos estão aleatoriamente distribuídos ao longo da linha horizontal com um número de resíduos positivos semelhante ao número de resíduos negativos. A Fig. 2.7.b mostra um exemplo onde a condição de homoedasticidade não é cumprida - a dispersão dos resíduos

aumenta com o y' o que indica que a precisão das medições não é constante. Os resíduos em forma de “U” da Fig. 2.7.c é o resultado de um ajuste a uma recta ou plano de dados que seriam melhor representados por uma curva ou superfície curva.

A maior parte dos testes estatísticos são baseados na assunção de que os dados experimentais apresentam uma distribuição normal. Um método gráfico denominado procedimento de “rankit” permite de uma forma expedita verificar se a distribuição é normal [1,7]. Este procedimento consiste em ordenar por ordem crescente os np pontos experimentais e atribuir a cada ponto uma frequência de ocorrência cumulativa (ver exemplo da Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Exemplo de cálculo de desvios normais para um conjunto de dados ordenados [1].

| Medição (y) | Frequência cumulativa | Frequência cumulativa (%) |
|-------------|-----------------------|---------------------------|
| 2.104 | 1 | 7.7 |
| 2.222 | 2 | 15.4 |
| 2.247 | 3 | 23.1 |
| 2.286 | 4 | 30.8 |
| 2.327 | 5 | 38.5 |
| 2.367 | 6 | 46.1 |
| 2.388 | 7 | 53.8 |
| 2.512 | 8 | 61.5 |
| 2.707 | 9 | 69.2 |
| 2.751 | 10 | 76.9 |
| 3.158 | 11 | 84.6 |
| 3.172 | 12 | 92.3 |

De seguida é necessário converter a frequência cumulativa numa percentagem de frequência cumulativa calculada do seguinte modo,

$$\text{Frequência cumulativa (\%)} = (100 \times \text{frequência cumulativa}) / (np+1) \quad (2.26)$$

A representação gráfica da percentagem de distribuição cumulativa em função das medições y deverá ter uma tendência linear se os dados estiverem normalmente distribuídos (Fig. 2.8).

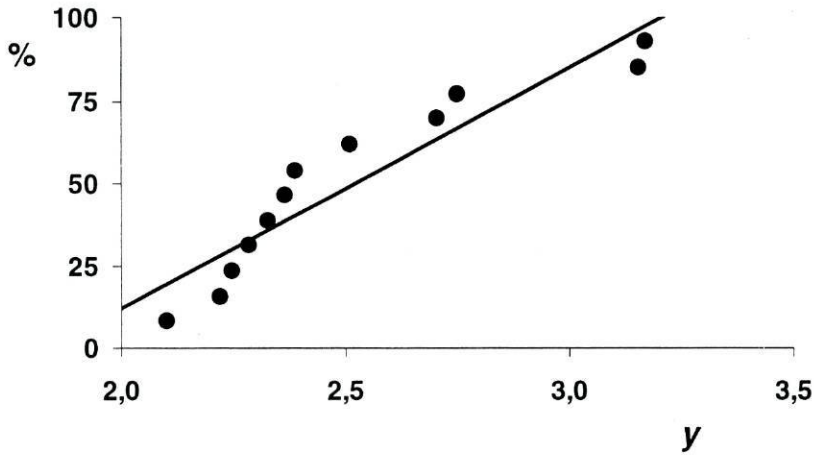


Fig. 2.8 – Método de “rankit” aplicado aos dados da Tabela 2.4.

Por outro lado, a análise destes gráficos permite detectar a presença de pontos experimentais anormais (“outliers”). Por exemplo, a Fig. 2.9.a mostra um gráfico de “rankit” onde a falta de tendência linear da representação se deve à existência de dois pontos anormais e não a uma distribuição não normal. Após retirar os dois pontos suspeitos o gráfico mostra que os pontos experimentais estão normalmente distribuídos (Fig. 2.9.b).

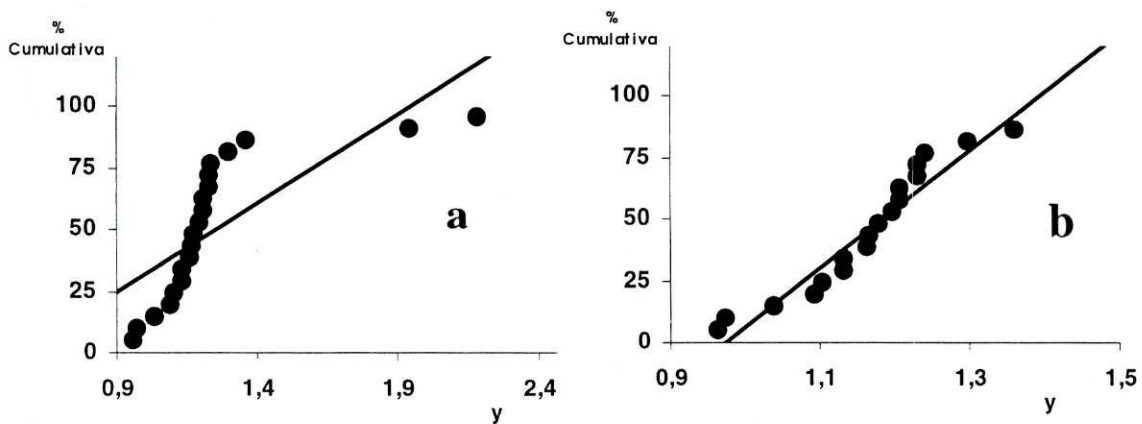


Fig. 2.9 – Método de “rankit” aplicado a um conjunto de dados antes (a) e depois (b) de retirar dois pontos anormais do cálculo [1].

2.7.4.2 – Análise da variância (ANOVA) da regressão

A análise da variância (ANOVA) da regressão permite verificar se as variáveis independentes previstas no modelo podem explicar uma quantidade significativa da variância na variável dependente (resposta). Também, se foram efectuadas experiências repetidas ou se existe uma estimativa do erro experimental, a validade do modelo proposto pode ser verificada. A ANOVA pode ser utilizada para verificar falta de ajuste numa regressão, de modo a verificar se o modelo escolhido é o correcto.

A variação total dos valores de y relativamente ao seu valor médio, \bar{y} , descrito pelo total da soma dos quadrados (SS_T) é dado por

$$SS_T = \sum_{(i=1,k)} \sum_{(j=1,n_i)} (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (2.27)$$

onde:

y_{ij} – uma das repetições das n_i medições para x_i ;

n_i – o número de repetições das medições efectuadas a x_i ;

$\sum_{(i=1,k)} n_i = n$ – número total de experiências, incluindo as repetições;

k – número de valores de x diferentes;

\bar{y} – média de todas as respostas (grande média).

Na ANOVA esta SS_T é dividida em diferentes contribuições para as variações observadas.

$$(y_{ij} - \bar{y}) = (y_{ij} - y'_i) + (y'_i - \bar{y}) \quad (2.28)$$

Como os resíduos $(y_{ij} - y'_i) = (y_{ij} - \bar{y}_i) + (\bar{y}_i - y'_i)$ a equação anterior vem,

$$(y_{ij} - \bar{y}) = (y_{ij} - \bar{y}_i) + (\bar{y}_i - y'_i) + (y'_i - \bar{y}) \quad (2.29)$$

onde \bar{y}_i é o valor médio das repetições y_{ij} para x_i , y'_i é o valor de y para x_i estimado pela equação de regressão. Todas as repetições a x_i têm o mesmo valor estimado de y'_i .

Os desvios contemplados na SS_T foram divididos em três partes e que podem ser interpretadas da seguinte maneira:

$(y_{ij} - \underline{y}_i)$ – desvios das respostas individuais para x_i a partir da média das respostas para x_i . Esta quantidade é independente do modelo escolhido – apenas depende do erro medido. É importante para se estimar o erro puro experimental.

$(y_i - y'_i)$ – desvios da resposta média para x_i a partir da resposta estimada para x_i . Esta quantidade depende do modelo escolhido. Se o modelo escolhido não for o correcto este desvio contém um erro (falta de ajuste ou “lack of fit”). Por outro lado, se o modelo for adequado, este desvio pode ser explicado com base no erro experimental.

$(y'_i - \underline{y})$ - desvios da resposta estimada em x_i a partir da grande média. Esta quantidade depende da existência de regressão entre x e y . Este desvio torna-se zero se y não variar com x . Esta contribuição é assim importante para testar o significado da regressão.

Elevando ao quadrado ambos os membros da eq. 2.29 e efectuando a soma sobre i e j para incluir todas as medições dá origem à SS_T ,

$$\begin{aligned}
 SS_T &= \sum_{(i=1,k)} \sum_{(j=1,ni)} (y_{ij} - \underline{y})^2 \\
 &= \underbrace{\sum_{(i=1,k)} \sum_{(j=1,ni)} (y_{ij} - \underline{y}_i)^2}_{SS_R} + \underbrace{\sum_{(i=1,k)} (y_i - y'_i)^2}_{SS_{REG}} + \underbrace{\sum_{(i=1,k)} (y'_i - \underline{y})^2}_{SS_{LOF}} \\
 &\quad \underbrace{\hspace{10em}}_{SS_{PE}}
 \end{aligned} \tag{2.22}$$

A variação total dos valores de y a volta de \underline{y} foram separados em dois componentes, nomeadamente:

SS_{REG} – a variação que pode ser atribuída à regressão ou seja ao facto de y variar com x . Deste modo este termo é denominado **soma dos quadrados da regressão**.

SS_R – a variação residual que mede a variação que não pode ser explicada pela equação de regressão. Este termo é denominado por **soma dos quadrados residuais**. Quando existem repetições este termo pode ser separado em dois:

SS_{PE} – um componente que mede as variações devidas a erro puro. Este termo é denominado **soma dos quadrados do erro puro**.

SS_{LOF} – um componente que mede a variação das médias dos grupos, \bar{y}_i , à volta da equação de regressão. Este termo é denominado **soma dos quadrados devido a falta de ajuste** (“lack of fit”).

Todos estes termos são reunidos na denominada tabela de ANOVA (Tabela 2.5) onde as **médias dos quadrados (MS)** são calculados a partir da divisão da soma dos quadrados pelos respectivos **graus de liberdade (df)**. MS_{PE} dá uma estimativa do erro experimental puro (σ^2) e MS_{LOF} é uma estimativa de σ^2 se o modelo escolhido for correcto. Se o modelo não for correcto o MS_{LOF} estima $\sigma^2 + (\text{erro})^2$.

Em forma matricial o cálculo de cada uma das soma dos quadrados é efectuado no seguinte modo:

$$SS_T = \sum_{(i=1,k)} \sum_{(j=1,n_i)} (y_{ij} - \bar{y})^2 = \mathbf{y}^T \mathbf{y} - n \bar{y}^2 \quad (\text{df} = n-1) \quad (2.31)$$

$$SS_{REG} = \sum_{(i=1,k)} n_i (y'_i - \bar{y})^2 = \mathbf{b}^T \mathbf{X}^T \mathbf{y} - n \bar{y}^2 \quad (\text{df} = p-1) \quad (2.32)$$

$$SS_R = \sum_{(i=1,k)} \sum_{(j=1,n_i)} (y_{ij} - y'_i)^2 = \mathbf{e}^T \mathbf{e} = \mathbf{y}^T \mathbf{y} - \mathbf{b}^T \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (\text{df} = n-p) \quad (2.33)$$

$$SS_{PE} = \sum_{(i=1,k)} \sum_{(j=1,n_i)} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (\text{df} = n-k) \quad (2.34)$$

$$SS_{LOF} = \sum_{(i=1,k)} n_i (\bar{y}_i - y'_i)^2 = \mathbf{y}^T \mathbf{y} - \mathbf{b}^T \mathbf{X}^T \mathbf{y} - SS_{PE} \quad (\text{df} = k-p) \quad (2.35)$$

Onde:

\bar{y} – grande média;

n_i – número de repetições efectuadas para cada combinação de x ;

$\sum_{(i=1,k)} n_i = n$ – número total de experiências;

y_{ij} – uma das n_i medições para uma dada combinação de x ;

\bar{y}_i – a média das repetições y_{ij} para uma dada combinação de x ;

y'_i – o valor de y para uma dada combinação de x estimado a partir da equação de regressão.

Tabela 2.5 – Tabela da ANOVA para regressão múltipla [1].*

| Fonte da variação | SS | df | MS | F |
|-------------------|------------|-------|------------|--------------------|
| Regressão | SS_{REG} | $p-1$ | MS_{REG} | MS_{REG}/MS_R |
| Resíduos | SS_R | $n-p$ | MS_R | |
| Falta de ajuste | SS_{LOF} | $k-p$ | MS_{LOF} | MS_{LOF}/MS_{PE} |
| Erro puro | SS_{PE} | $n-k$ | MS_{PE} | |
| Total | SS_T | $n-1$ | | |

* SS – soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados; F – teste F; p – número de coeficientes de regressão; n – número de experiências; k – número de combinações diferentes das variáveis x ($m < k < n$).

O teste da falta de ajuste (lack of fit) compara a razão $F = MS_{LOF} / MS_{PE}$ com uma distribuição F com (k-p) e (n-k) graus de liberdade. Se este teste for significativo para o nível de significado escolhido (MS_{LOF} significativamente maior do que MS_{PE}) pode-se concluir que o modelo é inadequado. Se MS_{LOF} e MS_{PE} são comparáveis, o modelo está justificado e ambas as MS são estimativas independentes de σ^2 . Consequentemente, a estimativa de σ^2 dada pelo $MS_R = s_e^2$ é usada nos cálculos subsequentes.

2.7.4.3 – O coeficiente de correlação múltipla

O **coeficiente de correlação múltipla** (R^2) é definido do seguinte modo [1,4],

$$R^2 = SS_{REG} / SS_T = (SS_T - SS_R) / SS_T = 1 - SS_R / SS_T \quad (2.36)$$

Este coeficiente é usado para estimar a proporção de variação de y que é explicado pela regressão. O coeficiente de correlação múltipla é a correlação entre y e y'.

Se não houver uma relação linear entre as variáveis dependente e independente $R^2 = 0$; se existe um ajuste perfeito $R^2 = 1$. O valor de R^2 pode de uma maneira geral aumentar por adição de mais variáveis x ao modelo. O valor de R^2 até pode ser igual a um se o número de coeficientes no modelo for igual ao número de experiências ($p=n$) – por exemplo, uma recta ($p=2$) ajusta-se perfeitamente a dois pontos experimentais ($n=2$). Por este motivo, o R^2 deve ser usado com cuidado.

Devido a esta limitação do R^2 , por vezes é usado o **coeficiente de correlação ajustado** R^2_{aj} , definido como [4]

$$R^2_{aj} = 1 - [SS_R / (n-p)] / [SS_T / (n-1)] = 1 - [(n-1) / (n-p)] (1 - R^2) \quad (2.37)$$

De um modo geral, o R^2_{aj} não aumenta à medida que novas variáveis são adicionadas ao modelo. De facto, se termos não necessários forem adicionados ao modelo, o valor de R^2_{aj} diminuirá.

2.7.4.4 - Análise da significância dos coeficientes da regressão

O problema da análise da significância dos coeficientes da regressão está relacionado com o problema da selecção das variáveis previstas no modelo da regressão – quais variáveis devem fazer parte da equação de regressão? O método mais completo para resolver este problema é efectuar a comparação de todas as possíveis regressões efectuadas com todas as variáveis do modelo. O processo consiste em ajustar todas as equações de regressão com apenas uma variável, de seguida com duas variáveis, até que a equação de regressão inclui todas as variáveis (método de “stepwise regression”) [1].

Como há uma relação entre os efeitos dos factores e os coeficientes de regressão (secção 2.7.3), em estudos de planeamento de experiências o significado dos coeficientes de regressão (e por conseguinte, as variáveis correspondentes) é semelhante ao significado dos efeitos que pode ser avaliado por ANOVA (secção 2.6.2.3).

2.8 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

Uma superfície de resposta é um gráfico ou uma resposta em função de um ou mais factores. Após um estudo de planeamento experimental de um sistema e da sua conveniente modelação é possível estimar a forma da superfície de resposta para esse sistema na gama de condições experimentais utilizadas. Por sua vez, as superfícies de resposta poderão ser utilizadas para obter informação sobre as condições de funcionamento óptimo do sistema.

Embora as superfícies de resposta estejam incluídas nas denominadas **metodologias de superfície de resposta (MSR)** do planeamento experimental, nesta dissertação não houve uma abordagem sistemática dos sistemas estudados segundo essas metodologias. Nomeadamente, foram preferencialmente utilizados modelos lineares de primeira ordem em vez dos modelos de segunda ordem e não foram utilizados **planeamentos de compósito central** [3-7].

No entanto, e com o objectivo de classificar tipos de superfícies de resposta que serão observadas ao longo da dissertação, descrevem-se de seguida as formas de diferentes superfícies de resposta típicas e os respectivos modelos matemáticos.

2.8.1 Superfícies de resposta planas

Basicamente dois tipos de superfícies de resposta planas podem ser observadas, as que correspondem a um modelo sem (Fig. 2.10) e com (Fig. 2.11) interacção. Os modelos que lhes correspondem são respectivamente os seguintes:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 \quad (2.38)$$

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (2.39)$$

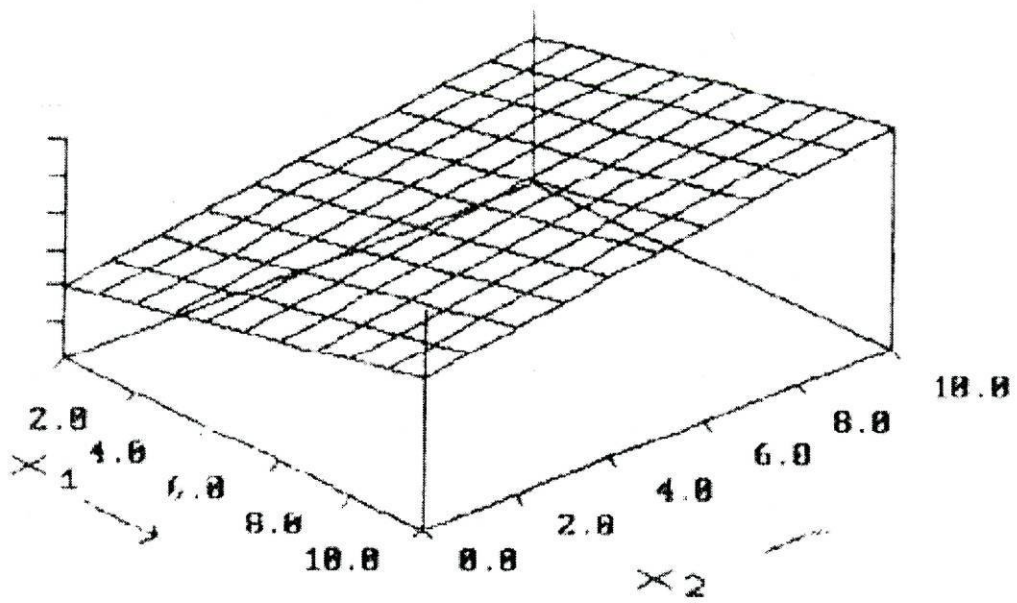


Fig. 2.10 –Superfície de resposta para um modelo de primeira ordem sem interacção [3].

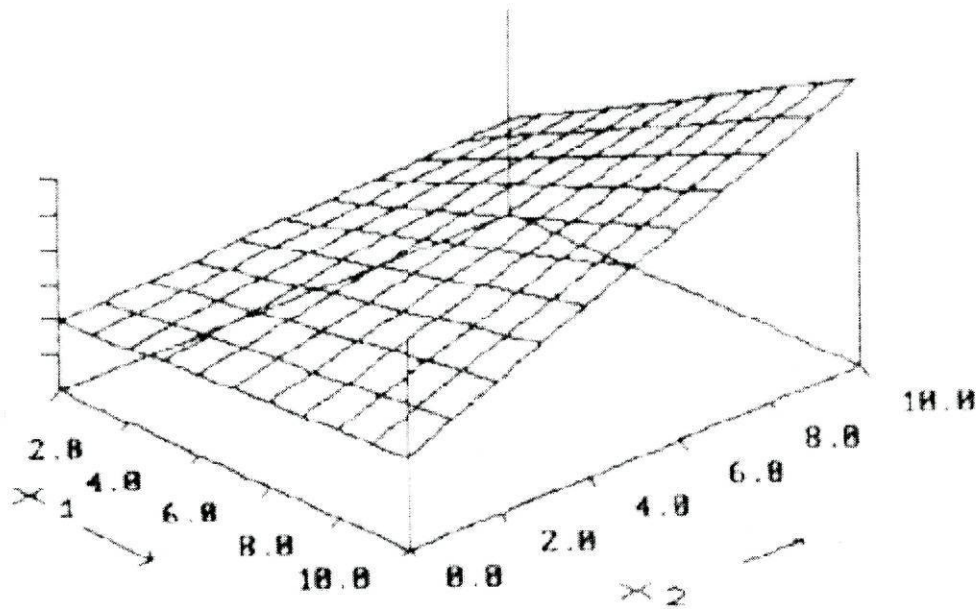


Fig. 2.11–Superfície de resposta para um modelo de primeira ordem com interacção [3].

2.8.2 - Superfícies de resposta curvas

As superfícies de resposta curvas mais vulgares podem ser observadas nas Fig. 2.12 a 2.14. O modelo de base, é semelhante :

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (2.40)$$

As diferenças de sinal e grandeza relativa dos coeficientes b_{11} e b_{22} dão origem a superfícies de resposta curvas com diferentes formas. Se ambos os coeficientes forem negativos e com a mesma grandeza observa-se uma parábola aberta para baixo (Fig. 2.12). Se ambos os coeficientes forem negativos mas com valores muito diferentes observa-se um cume (Fig. 2.13). Se os coeficientes tiverem sinais opostos e com a mesma ordem de grandeza observa-se uma sela (Fig. 2.14).

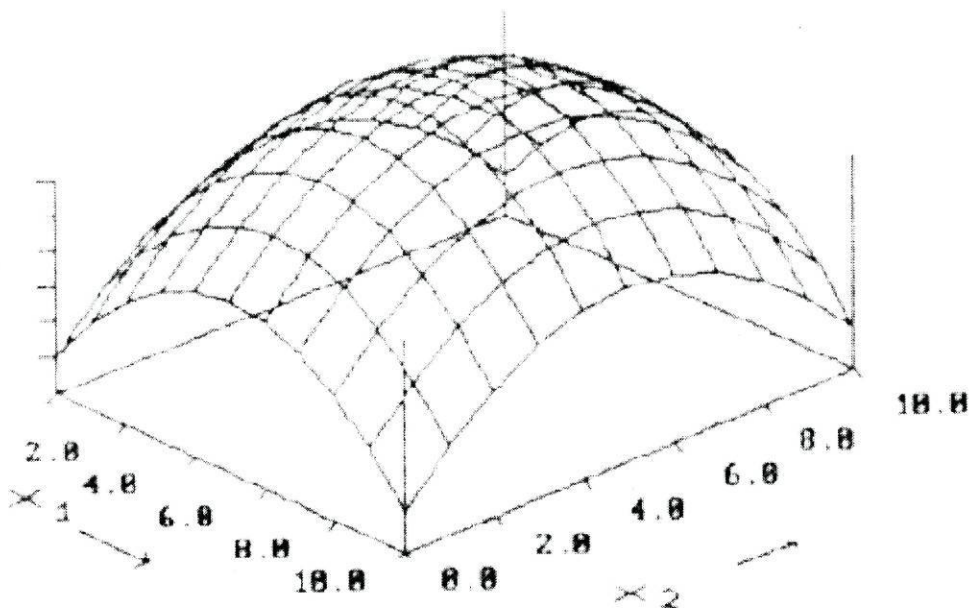


Fig. 2.12 – Superfície de resposta com uma parábola a abrir para baixo [3].

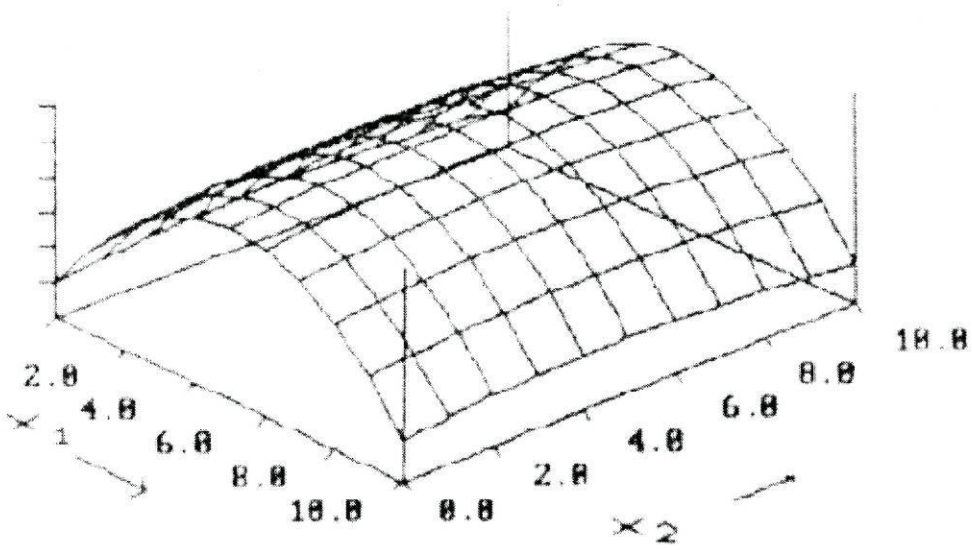


Fig. 2.13 – Superfície de resposta curva com um cume [3].

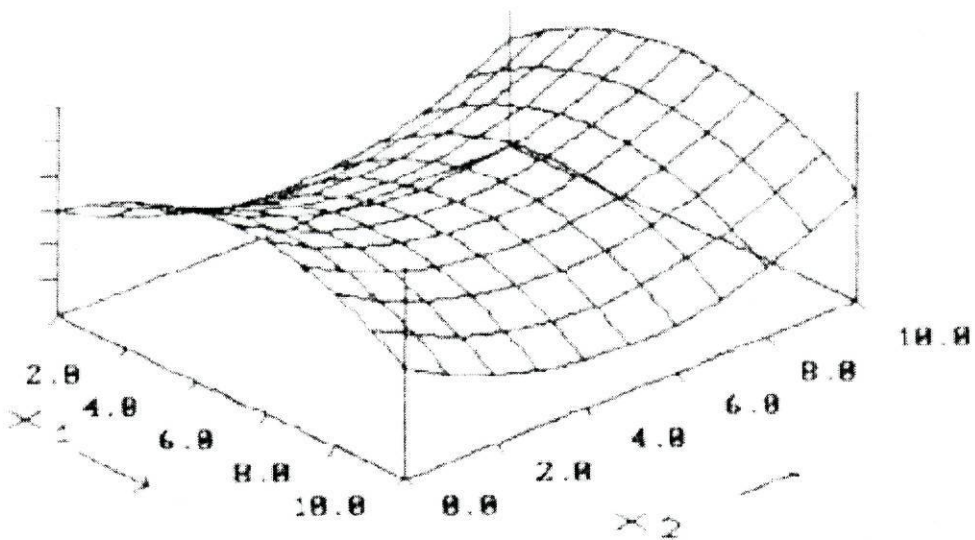


Fig. 2.14 – Superfície de resposta curva com a forma de uma sela [3].

2.9 - BIBLIOGRAFIA

1. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginsts, L.M.C. Buydens, D. de Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
2. S.L.Morgan e S.N. Deming, Anal. Chem., **46** 1170 (1974).
3. Ed Morgan, Chemometrics: Experimental Design, ACOI, Wiley, Chichester, 1991.
4. D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, Wiley, New York, 1997.
5. S.N.Deming e S.L.Morgan, Experimental design: A chemometric approach, 2 Ed., Elsevier, Amsterdam, 1993.
6. N.A. Armstrong e K.C.James, Understanding experimental design and interpretation in pharmaceuticals, Ellis Horwood, New York, 1990.
7. CAMO, The Unscramble design, User manual, Oslo, 2000.

3 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados todos os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho. Como tal, a preparação de todas as soluções, o equipamento utilizado para a montagem dos sistemas de fluxo, a montagem do detector e dos sistemas de fluxo estão descritos respectivamente nas alíneas 3.1 e 3.2. Os procedimentos experimentais para a exploração factorial das superfícies de resposta dos sistemas e para a avaliação dos sistemas de fluxo otimizados encontram-se descritos na alínea 3.3. Por último, na alínea 3.4 são referidos os programas utilizados para efectuar os cálculos.

3.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizados reagentes de elevado grau de pureza, de qualidade p.a. ou equivalente. Para a preparação de todas as soluções foi utilizada água desionizada com resistividade superior a $4 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$. Os restantes pormenores de preparação das soluções são descritos seguidamente, organizados segundo os três sistemas estudados.

3.1.1 Sistema para análise de catião Cu(II)

- Soluções de ácido clorídrico: foi preparada uma solução de ácido clorídrico 6 M por diluição a partir de ácido clorídrico concentrado (solução a 37%). Esta solução foi usada para acidificar as soluções padrão de cobre. Para a limpeza do sistema de fluxo e do material de vidro usado para a preparação das soluções foi utilizada uma solução a 10 % do mesmo ácido, preparada também por diluição a partir de ácido clorídrico concentrado.
- Soluções de Cu(II): foram preparadas soluções padrão de Cu(II) na gama de valores de concentração de 1×10^{-7} a 1×10^{-11} M, por diluição a partir de uma solução padrão de nitrato de cobre 0,1 M. Para evitar a formação de complexos de cobre, estas soluções foram acidificadas com ácido clorídrico 6 M na proporção de 20 μl de solução de ácido para cada 25,00 ml de solução ($\text{pH} \approx 3$).

- Solução de Tetraetilenopentamina (TEPA): foi preparada uma solução 4×10^{-3} M de TEPA por pesagem do sólido e dissolução em água desionizada. Esta solução foi utilizada para a preparação das soluções indicadoras.
- Solução de 1,10 – fenantrolina: foi preparada uma solução $1,2 \times 10^{-2}$ M de 1,10-fenantrolina por pesagem e dissolução em água desionizada.
- Soluções de peróxido de hidrogénio: as soluções de peróxido de hidrogénio entre 5 e 10% foram preparadas por diluição de uma solução concentrada a 30%.
- Soluções indicadoras: foram utilizadas diversas soluções indicadoras contendo diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina, na gama de valores de concentração de 6×10^{-4} e 6×10^{-5} M, preparadas por diluição rigorosa a partir da solução $1,2 \times 10^{-2}$ M de 1,10-fenantrolina, uma concentração de TEPA 4×10^{-7} M e o surfactante brometo de cetiletildimetilamónio (CEDAB).

3.1.2 – Sistema para análise de cloro livre

- Soluções de hipoclorito: as soluções de hipoclorito foram preparadas diariamente por diluição rigorosa com água desionizada, a partir de uma solução concentrada. O título da solução concentrada de hipoclorito foi determinado por iodometria sendo igual a 1,24 M (7,5 % de cloro livre).
- Soluções de Rodamina 6G: foram utilizadas soluções de rodamina 6G com concentração entre $1,31 \times 10^{-2}$ e $1,41 \times 10^{-4}$ M, preparadas por pesagem e dissolução em água desionizada. Para estudar o efeito de surfactantes na resposta do sistema foram também preparadas soluções, por pesagem dos compostos e dissolução em água desionizada, constituídas por misturas de rodamina 6G com um surfactante (brometo de cetilpiridina (CPB) ou cloreto de cetilpiridina (CPC)).

3.1.3 – Sistema para análise de anião bromato

- Soluções de bromato: foi preparada uma solução 1×10^{-3} M de bromato de potássio por pesagem e dissolução do sal em água desionizada. Devido à sua baixa concentração, entre 1×10^{-4} e 1×10^{-8} M, as soluções de bromato utilizadas

no estudo do sistema foram preparadas diariamente por diluição rigorosa a partir da solução 1×10^{-3} M.

- Solução de sulfito de sódio: foi preparada por pesagem e dissolução uma solução de sulfito de sódio 1×10^{-2} M.
- Solução de hidrocortisona: foi preparada uma solução de hidrocortisona 1×10^{-3} M por pesagem e dissolução do composto em água desionizada.
- Soluções indicadoras: tendo em vista a optimização da composição da solução indicadora, foram preparadas diversas soluções constituídas por diferentes proporções de sulfito de sódio (valores de concentração entre 10^{-3} e 10^{-5} M.), hidrocortisona (concentração entre 10^{-4} e 10^{-6} M) e ácido sulfúrico (concentração entre 0,19 e 0,38 M). Estas soluções foram preparadas por diluição rigorosa a partir de ácido sulfúrico concentrado e das soluções de sulfito de sódio 1×10^{-2} M e de hidrocortisona 1×10^{-3} M.

3.2 – MATERIAL, EQUIPAMENTO E MONTAGEM DOS SISTEMAS

3.2.1 – Material

- Tubo fotomultiplicador (TFM): as medições de quimioluminescência foram efectuadas por um TFM de marca Hamamatsu (Bridgewater, Nj), referência HC1135-01 (Figura 3.1), controlado por computador através de uma interface RS-232-C cuja aquisição de dados pode ser feita com um tempo de integração entre 0,01 e 0,1 segundos por leitura na gama de comprimentos de onda de 300 a 650 nm.

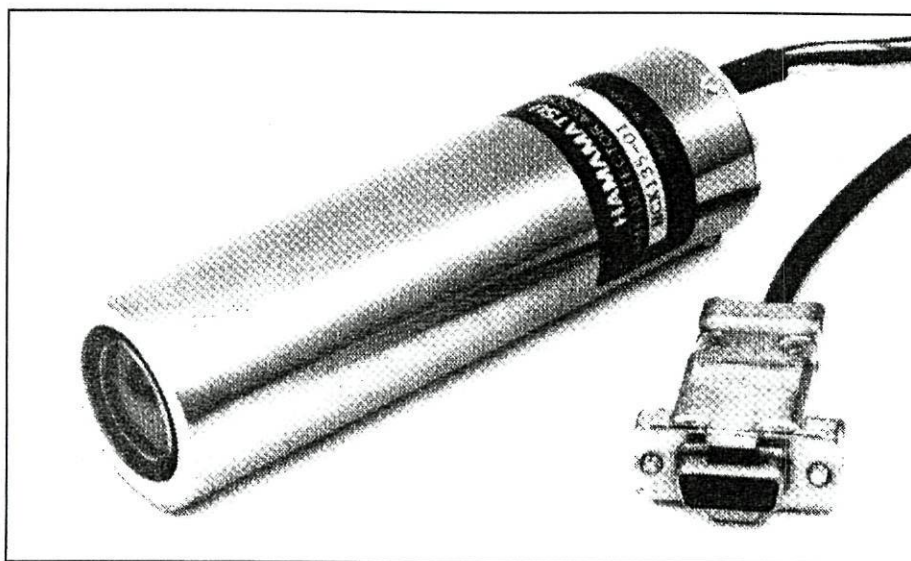


Fig. 3.1 - Imagem do tubo fotomultiplicador usado nos estudos quimioluminescentes.

- Bombas peristálticas: para a propulsão das soluções foram utilizadas bombas peristálticas de marca Gilson, modelo Minipuls 3, com possibilidade de colocação de 4 tubos de fluxo da mesma marca.
- Válvula de injeção: a injeção das amostras foi efectuada através de uma válvula de injeção de marca Reodhyme, referência 5020.
- Tubos de fluxo: para a montagem dos sistemas foram utilizados tubos de Teflon[®] (PTFE) de marca OMNIFIT com 0,8 mm de diâmetro interno.

- Células de quimioluminescência: foram utilizados tubos de TYGON[®] referência R3603 com diâmetro interno de 1 mm e diâmetro externo de cerca de 2 mm, enrolado em forma de serpentina e colocado em frente da janela do tubo fotomultiplicador. O comprimento do tubo que constitui a célula é de 51 cm e encontra-se colada a uma placa plástica branca. Esta célula é denominada de serpentina de tubo TYGON (STY).
- Termómetro de vidro: foi utilizado um termómetro de vidro com escala graduada em graus Célsios (1 e 100 °C).
- Sistema de aquecimento: foi utilizada uma tina com água, aquecida por uma placa de aquecimento de marca Framo, modelo M21/1. A temperatura da água foi monitorizada com o termómetro de vidro.

3.2.2. Equipamento de detecção de luz (Detector)

Foi montado um sistema de detecção de luz, que se encontra esquematizado na Fig. 3.2, tendo por base o TFM alimentado por um transformador (MW108 Universal AC/DC Adaptor) e uma STY fixada numa placa de material plástico branco.

A montagem consistiu em fixar o TFM a uma placa de material plástico presa à base de uma caixa metálica, fixar a placa com a STY em frente à janela do TFM e ligar o TFM à alimentação de um transformador que se liga à rede eléctrica (220 V e 50 Hz) após seleccionar uma diferença de potencial (ddp) de saída de 5 V (500 mA). Para evitar sobrevoltagens que podem estragar o TFM, nomeadamente queimar o fusível que só pode ser substituído na fábrica, foi colocado um circuito integrado (TA 7805S) na alimentação que limita a diferença de potencial a um máximo de 5 V, independente da ddp debitada pelo transformador e um interruptor que corta a alimentação ao TFM. A caixa metálica foi fechada colocando nas fendas vedantes de luz e reforçando exteriormente com fita isoladora preta. A caixa foi ainda colocada dentro de pano preto que por sua vez foi embrulhada em papel de alumínio - esta operação tinha por finalidade evitar ao máximo a entrada de luz no TFM.

A comunicação entre o computador e o TFM é efectuada via uma interface RS-232-C e utilizando o software de demonstração do equipamento "EVAL40.EXE" que é executado em ambiente DOS.

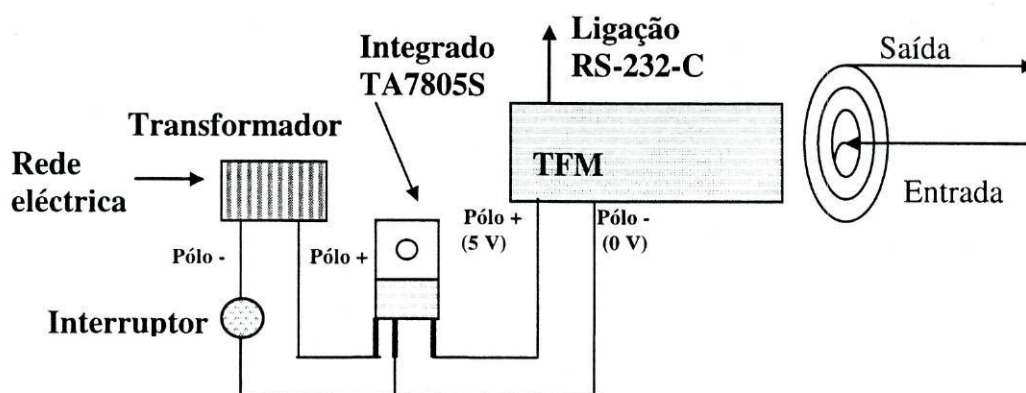


Fig. 3.2 - Representação esquemática do sistema de detecção quimioluminescente
TFM - tubo fotomultiplicador (ver no texto a descrição dos restantes componentes).

O custo aproximado dos componentes deste detector é o seguinte: TFM, 600.000\$; transformador, 1.000\$; integrado, 100\$; interruptor, 200\$; STY, 1.000\$; caixa, 1.000\$. O custo total será de (sem incluir um computador para recolher as leituras do TFM e o sistema de bombagem e injeção das amostras e reagentes) 603.300\$.

Este sistema de detecção pode ser facilmente transformado num sistema portátil por substituição do transformador por uma bateria e acoplado a um computador portátil. Também, seria necessário uma bomba para transportar os reagentes e amostra para a STY e uma válvula de injeção da amostra. Considerando os custos destes componentes uma estimativa do custo global de um sistema portátil de quimioluminescência será de cerca de 1.300.000\$.

3.2.3. Montagem dos Sistemas

- Sistema para análise de catião Cu(II): No sistema para análise de catião Cu(II), que se encontra esquematizado na Fig. 3.3 a amostra é injectada no fluxo de água desionizada (água na Fig. 3.3) que posteriormente se mistura com um fluxo constituído por uma mistura de peróxido de hidrogénio (H_2O_2 na mesma figura) com uma solução indicadora (solução indicadora). Esta mistura foi

homogeneizada ao longo de um reactor (VR) constituído por um tubo de comprimento variável. Neste sistema foram utilizadas duas bombas peristálticas (B1 e B2) para propulsão das soluções.

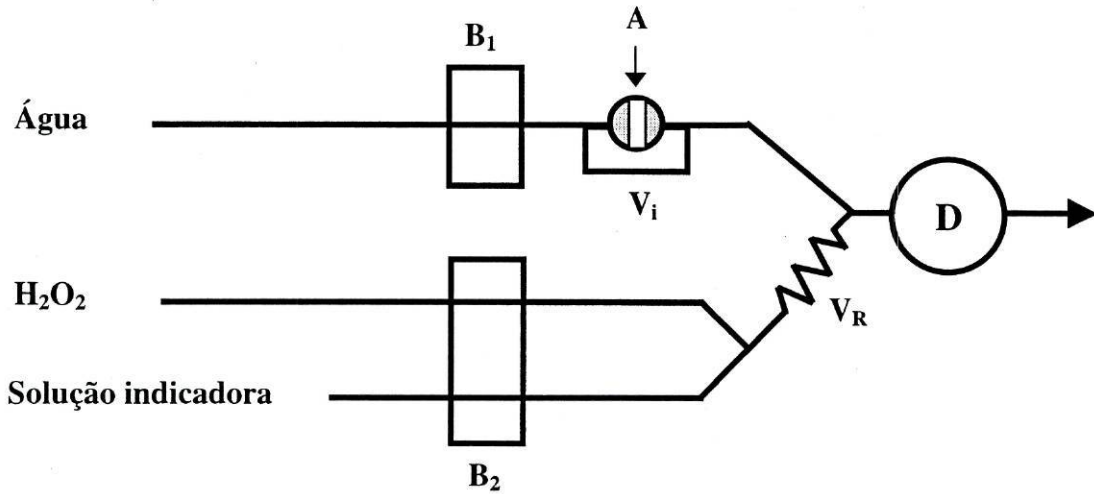


Fig. 3.3 – Representação esquemática do sistema de fluxo utilizado para a análise do catião Cu(II).

- Sistema para análise de cloro livre: No sistema para análise do cloro livre que se encontra esquematizado na Fig. 3.4., a amostra é aquecida no interior de um tubo em serpentina que está imerso numa tina com água quente. Neste sistema a solução indicadora (rodamina 6G ou uma mistura desta com um surfactante) é injectada no fluxo de amostra (sistema de FIA invertido). Para a propulsão das soluções foi utilizada uma bomba peristáltica designada por B na Fig. 3.4.

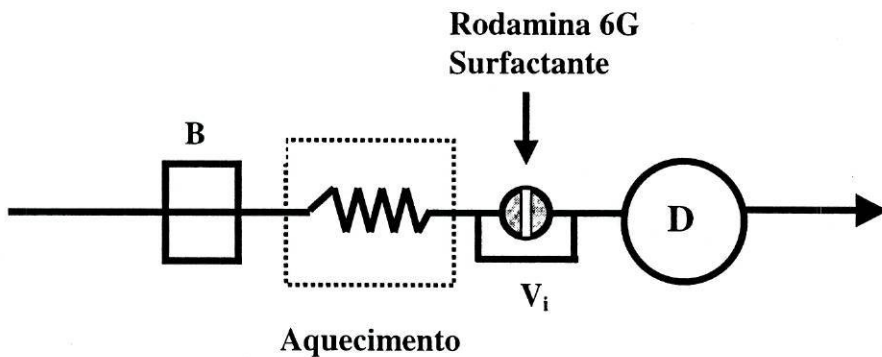


Fig. 3.4 – Representação esquemática do sistema de fluxo utilizado para análise de cloro livre.

- Sistema para análise de anião bromato: no sistema de detecção do ião bromato, esquematizado na Fig. 3.5, a amostra (A na Fig. 3.5) é injectada no fluxo de água desionizada que posteriormente se junta ao fluxo de solução indicadora (constituída por uma mistura de sulfito e hidrocortisona em meio ácido). A reacção ocorre ao longo de um reactor (V_L na Fig 3.5) constituído por um tubo de PTFE de comprimento variável. Neste sistema foram utilizadas duas bombas peristálticas (B1 e B2 na Fig. 3.5).

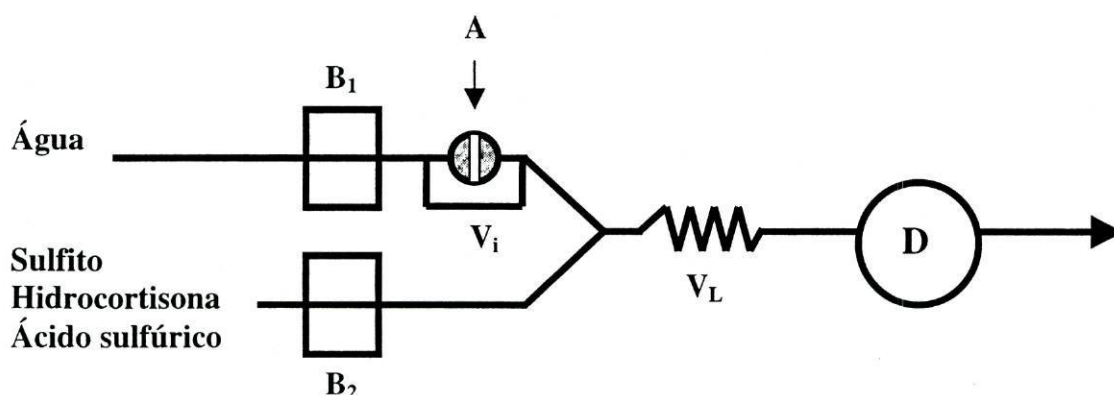


Fig. 3.5 – Representação esquemática do sistema de fluxo utilizado na determinação do ião bromato.

3.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 - Optimização da resposta dos sistemas

A optimização da resposta dos sistemas foi efectuada através de técnicas de análise factorial. As diversas experiências de cada planeamento foram realizadas aleatoriamente e foram efectuados três ensaios consecutivos para cada experiência.

3.3.2. Avaliação da resposta dos sistemas optimizados

As características de resposta dos sistemas optimizados foram avaliadas através do traçado de curvas de calibração, da caracterização da reprodutibilidade da resposta e da avaliação da selectividade da resposta.

- Traçado de curvas de calibração: o traçado de curvas de calibração foi efectuado ensaiando as amostras por ordem crescente da sua concentração. Também neste caso, foram efectuadas três ensaios para cada amostra.
- Reprodutibilidade da resposta: para avaliar a reprodutibilidade da resposta foram efectuadas 15 ensaios sucessivos da mesma amostra no sistema em estudo.
- Selectividade da resposta: para avaliar a selectividade da resposta do sistema para análise de ião bromato foram injectadas soluções constituídas por misturas de anião bromato (5×10^{-6} ou 5×10^{-5} M) com um ião interferente (cloreto, brometo, perclorato, nitrato, nitrito ou fosfato 1×10^{-2} M).

3.4 – CÁLCULOS

Para a construção da matriz do planeamento de experiências e para a análise dos dados obtidos nessas experiências foi utilizado o programa The Unscrambler Designer (versão 7.51 da Camo Asa, Noruega). Alguns cálculos da ANOVA e o ajuste dos dados experimentais a modelos polinomiais foram realizados com o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (versão 10.0 para o Windows da Microsoft).

Os parâmetros de regressão linear das curvas de calibração foram calculados por mínimos quadrados com o programa EXCEL (Microsoft).

4 – SISTEMA DE ANÁLISE DE CATIÃO Cu(II)

4.1 – INTRODUÇÃO

A análise de catiões metálicos em amostras de água natural não poluídas constitui um problema analítico difícil devido aos níveis de concentração muito baixos que caracterizam estas espécies nas amostras ambientais, na gama das nanomoles ou picomoles por litro. Para além da falta de sensibilidade das técnicas analíticas, o que poderá ser resolvido com o uso de instrumentação sofisticada instalada num laboratório, existem um outros problemas particularmente críticos relacionado com a conservação das amostras e operações de pré-concentração.

As técnicas de quimioluminescência são propostas como alternativas particularmente úteis para a análise de catiões metálicos em amostras ambientais porque estas técnicas são das mais sensíveis actualmente existentes à disposição da análise química [1,2]. Também, o tipo de instrumentação necessário para as implementar é reduzido e de muito baixo custo e pode ser facilmente incorporado em sistemas portáteis que podem ser transportados para o local onde se pretende realizar as análises [1,2]. Deste modo, os sistemas quimioluminescentes apresentam a sensibilidade necessária para realizar directamente a análise de amostras ambientais sem a necessidade de efectuar colheita, conservação e pré-concentração de amostras reduzindo, portanto, todos os riscos inerentes a estas operações.

Quanto à selectividade, os métodos baseados em quimioluminescência eram por vezes considerados pouco selectivos embora este problema esteja a ser ultrapassado pelo desenvolvimento de reacções quimioluminescentes mais específicas [1,2]. No caso da determinação de catião Cu(II) por quimioluminescência tem sido utilizada a reacção de oxidação do complexo que se forma entre o Cu(II) e a 1,10-fenantrolina pelo peróxido de hidrogénio em meio alcalino [3-5]. Para aumentar a sensibilidade do método, esta reacção tem sido efectuada em meio micelar (o surfactante que provoca maior aumento no sinal de quimioluminescência é o brometo de cetiltrimetilamónio (CEDAB). As soluções de 1,10-fenantrolina e CEDAB são preparadas com um agente complexante do Cu(II) muito estável (TEPA – tetraetilenopentamina) para mascarar alguma impureza de cobre existente nestes dois compostos [3].

Relativamente à selectividade, esta reacção de quimioluminescência pode ser considerada das mais selectivas para detecção de Cu(II), se não a mais selectiva [3]. De facto, estudos efectuados mostraram que apenas os catiões Pb(II), Zn(II), Fe(II) e Fe(III) (com uma concentração 10^{-4} M) davam origem a sinais de quimioluminescência, respectivamente, 25%, 6% e 2%, mas só quando a concentração destes metais era 10^4 vezes superior à do catião Cu(II) (10^{-8} M). Outros metais, como por exemplo os catiões de Cr(III) e (IV), Mn(II), Al(III), Ni(II) e Co(II), não davam origem a nenhum sinal de quimioluminescência.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver um método expedito de análise de catião Cu(II) em água baseado na reacção de oxidação do complexo de Cu(II) e 1,10-fenantrolina pelo peróxido de hidrogénio. Para o efeito foi montado um sistema de fluxo (ver Fig 3.3) e a sua optimização foi efectuada por análise factorial, considerando os seguintes factores experimentais: volume de injeção (V_i), caudal total (Q_T), volume do reactor (V_L), concentração do surfactante CEDAB (C_{CEDAB}), concentração de peróxido de hidrogénio (C_{PH}), concentração de hidróxido de sódio (C_{HS}) e concentração de 1,10-fenantrolina (C_F). A função de resposta considerada para a optimização foi a altura de pico. Um estudo prévio destes sete factores foi efectuado com um planeamento factorial fraccionado de oito experiências. De seguida, e após selecção dos factores com maior efeito, foi utilizado um planeamento factorial completo com três níveis para os factores para otimizar a resposta do sistema. Por último, foram avaliadas as características de resposta do sistema ao catião Cu(II).

4.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 - Estudo prévio do sistema

Numa primeira fase do trabalho, com base na literatura e no sistema de fluxo esquematizado na Fig. 3.3, foi feito um levantamento dos factores que poderiam interferir com a resposta. Na Tabela 4.1 encontram-se resumidos os factores seleccionados e as abreviaturas utilizadas para os referir ao longo do texto. Como o número de factores a estudar era relativamente elevado, em concreto, sete factores, o primeiro passo foi utilizar um planeamento factorial fraccionado para averiguar quais os factores com maior efeito na resposta do sistema. Na Tabela 4.2 encontra-se a matriz do planeamento factorial fraccionado com dois níveis para cada factor utilizado neste primeiro conjunto de experiências. Na Tabela 4.3 encontram-se resumidos os valores experimentais a que correspondem os níveis dos factores no planeamento da Tabela 4.2.

Tabela 4.1 - Factores estudados e suas abreviaturas.

| Factores | Abreviaturas |
|--|--------------|
| Volume de injeção | V_i |
| Caudal total | Q_T |
| Volume do reactor | V_L |
| Concentração de surfactante CEDAB | C_{CEDAB} |
| Concentração de peróxido de hidrogénio | C_{PH} |
| Concentração de hidróxido de sódio | C_{HS} |
| Concentração de 1,10-fenantrolina | C_F |

Tabela 4.2 – Matriz do planeamento factorial fraccionado com sete factores e dois níveis para cada factor, representados pelos algarismos (0) e (1).

| Experiência | Factores | | | | | | |
|-------------|----------|---|---|---|---|---|---|
| | a | b | c | d | e | f | g |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabela 4.3 - Valores dos factores experimentais correspondentes aos níveis codificados na matriz do planeamento factorial (Tabela 4.2).

| Factores | Unidades | Níveis | |
|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | | 0 | 1 |
| V_i | μL | 65 | 315 |
| Q_T | mL/min | 3,2 | 7,3 |
| V_L | μL | 306 | 840 |
| C_{CEDAB} | M | $2,0 \times 10^{-4}$ | $2,0 \times 10^{-2}$ |
| C_{PH} | % | 5 | 10 |
| C_{HS} | M | 0,05 | 0,15 |
| C_{F} | M | $6,0 \times 10^{-5}$ | $6,0 \times 10^{-4}$ |

Na Tabela 4.4 e na Fig. 4.1 estão resumidas as respostas do sistema nas oito experiências.

Tabela 4.4 – Resposta do sistema nas experiências do planeamento factorial fraccionado para sete factores a dois níveis (Tabela 4.2) ao injectar no sistema uma solução de Cu(II) 10^{-8} M.

| Experiência | Altura de pico | | |
|-------------|----------------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 175989 | 179109 | 178285 |
| 2 | 6840 | 7256 | 7736 |
| 3 | 172497 | 165721 | 162489 |
| 4 | 8232 | 8280 | 8132 |
| 5 | 140286 | 139606 | 140538 |
| 6 | 1136312 | 1154276 | 1249420 |
| 7 | 640 | 632 | 572 |
| 8 | 1256453 | 1265805 | 1256253 |

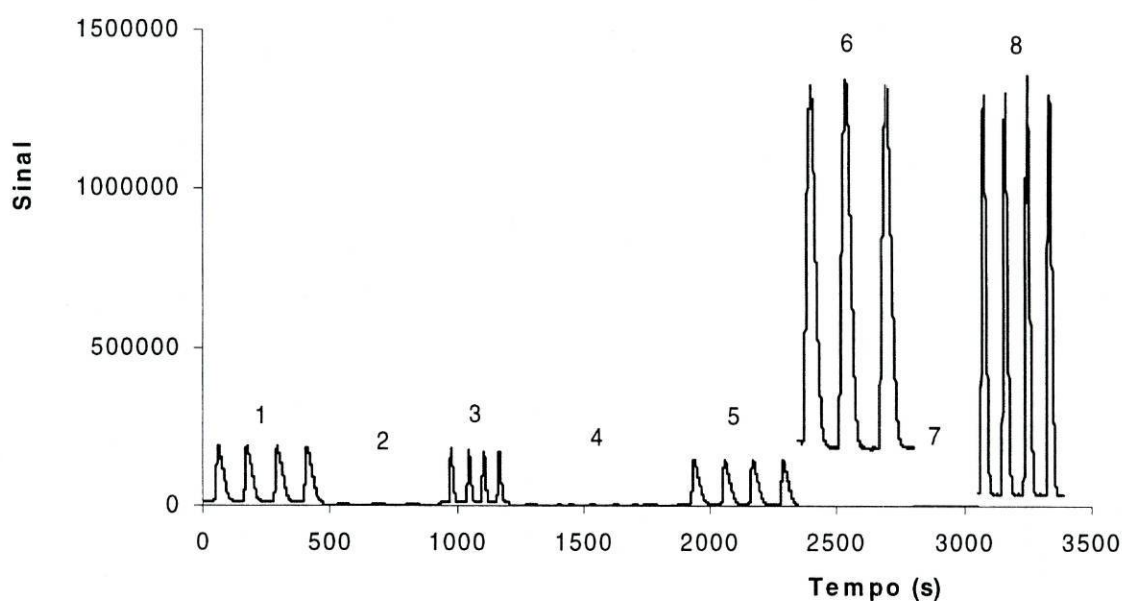


Fig. 4.1 – Resposta do sistema nas oito experiências definidas no planeamento factorial fraccionado (Tabela 4.2) ao injectar solução de Cu(II) 10^{-8} M.

A análise da Fig. 4.1 e da Tabela 4.4 mostra que existe uma grande variação na resposta do sistema em função das condições experimentais. Na Tabela 4.5 encontram-se resumidos os resultados da ANOVA dos dados da Tabela 4.4 e mostram que os factores com maior efeito na resposta do sistema (com valor de F mais elevado) são: a concentração de CEDAB (C_{CEDAB}), o volume do reactor (V_L) e o volume de injeção (V_i).

Tabela 4.5 – ANOVA da resposta do sistema (Tabela 4.4) nas experiências do planeamento factorial fraccionado (Tabela 4.2)*.

| Sumário | SS | df | MS | F |
|----------------|------------------------|----|------------------------|------|
| Modelo | $7,183 \times 10^{12}$ | 7 | $1,026 \times 10^{12}$ | 2162 |
| Erro | $9,965 \times 10^9$ | 21 | $4,745 \times 10^8$ | |
| Total ajustado | $7,193 \times 10^{12}$ | 28 | | |
| Variável | | | | |
| V_i | $1,753 \times 10^{12}$ | 1 | $1,75 \times 10^{12}$ | 3694 |
| Q_T | $1,275 \times 10^9$ | 1 | $1,27 \times 10^9$ | 3 |
| V_L | $2,221 \times 10^{12}$ | 1 | $2,22 \times 10^{12}$ | 4680 |
| C_{CEDAB} | $3,100 \times 10^{12}$ | 1 | $3,10 \times 10^{12}$ | 6534 |
| C_{PH} | $2,618 \times 10^{10}$ | 1 | $2,62 \times 10^{10}$ | 55 |
| C_{HS} | $2,198 \times 10^{10}$ | 1 | $2,20 \times 10^{10}$ | 46 |
| C_F | $5,999 \times 10^8$ | 1 | $6,00 \times 10^8$ | 1 |

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; F – razão de Fisher.

Para analisar o tipo de efeito dos sete factores estudados na resposta do sistema (aumento ou diminuição da resposta) fez-se o ajuste das respostas obtidas nestas experiências a um polinómio de primeiro grau, tendo-se obtido a seguinte expressão:

$$\text{Resposta} = -535617 + 496478 \times V_i - 13390 \times Q_T + 558835 \times V_L + 60678 \times C_{PH} + 660307 \times C_{CEDAB} - 9185 C_F + 55601 C_{HS}$$

Os resultados da ANOVA deste modelo de regressão encontram-se resumidos na Tabela 4.6 e mostram que o polinómio de primeiro grau permite descrever grande parte da variação dos dados.

Tabela 4.6 -ANOVA do ajuste dos dados experimentais a um polinómio de primeiro grau *.

| Modelo | SS | df | MS | F |
|-----------|-----------------------|----|-----------------------|------|
| Regressão | $7,18 \times 10^{12}$ | 7 | $1,03 \times 10^{12}$ | 2163 |
| Residual | $9,97 \times 10^9$ | 21 | $4,75 \times 10^9$ | |
| Total | $7,19 \times 10^{12}$ | 28 | | |

R = 0,999

* ver rodapé da Tabela 4.5.

A análise dos coeficientes do polinómio dá uma estimativa do efeito dos sete factores e mostra que a altura de pico aumenta com os factores concentração de C_{CEDAB} , volume do reactor V_L e volume de injeção V_i . Da mesma forma, os coeficientes do polinómio mostram que o efeito dos outros quatro factores na resposta do sistema é muito menor e que a altura de pico diminui com os níveis dos factores Q_T e C_F e aumenta com os níveis de C_{PH} e C_{HS} . Em face destes resultados, nas etapas seguintes do processo de optimização apenas foram considerados os factores com maior efeito (V_L , V_i e C_{CEDAB}), os níveis dos factores Q_T e C_F foram fixados nos valores correspondentes ao nível designado por 0 na Tabela 4.3 e os níveis dos factores C_{PH} e C_{HS} nos valores correspondentes ao nível máximo designado por 1 na mesma Tabela.

4.2.2 – Estudo dos factores mais significativos

Para se obter mais informação sobre o efeito dos factores V_L , V_i e C_{CEDAB} na resposta do sistema foi utilizado um planeamento factorial completo, com três níveis para cada factor, cuja matriz do planeamento se encontra na Tabela 4.7. Os valores experimentais correspondentes aos níveis indicados nesta Tabela encontram-se resumidos na Tabela 4.8. Na Tabela 4.9 encontram-se os valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 4.7 ao injectar no sistema uma solução de Cu(II) 10^{-8} M.

Após realização dos ensaios analisaram-se os resultados (Tabela 4.10) recorrendo ao programa SPSS. Os dados da Tabela 4.10 mostram que o V_i e o C_{CEDAB} são os factores que possuem contribuições mais importantes e que justificam a maior parte da variância total dos dados. No entanto o efeito do factor V_L não pode ser desprezado. Tal como no caso anterior (ver 4.2.1) os dados foram ajustados a um polinómio de primeiro grau para analisar o efeito dos factores em maior detalhe tendo-se obtido a seguinte expressão:

$$*Resposta = 544783 + 219668 \times V_i - 129194 \times V_L + 557670 \times C_{CEDAB}.$$

Na Tabela 4.11 encontra-se a ANOVA da regressão do modelo traduzido por esta expressão, e os resultados da Tabela mostram que com a utilização destes três factores a resposta do sistema em função dos níveis dos factores em estudo sistema fica praticamente definida.

Por último, na Tabela 4.12 encontram-se resumidos os valores experimentais dos sete factores estudados para o sistema optimizado.

Tabela 4.7 – Matriz do planejamento factorial completo com três factores a três níveis representados pelos algarismos (-1),(0) e (1).

| Experiência | Factores | | |
|-------------|----------|----|----|
| | a | b | c |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | 0 |
| 3 | -1 | -1 | 1 |
| 4 | -1 | 0 | -1 |
| 5 | -1 | 0 | 0 |
| 6 | -1 | 0 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | -1 |
| 8 | -1 | 1 | 0 |
| 9 | -1 | 1 | 1 |
| 10 | 0 | -1 | -1 |
| 11 | 0 | -1 | 0 |
| 12 | 0 | -1 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | -1 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | 0 | 1 | -1 |
| 17 | 0 | 1 | 0 |
| 18 | 0 | 1 | 1 |
| 19 | 1 | -1 | -1 |
| 20 | 1 | -1 | 0 |
| 21 | 1 | -1 | 1 |
| 22 | 1 | 0 | -1 |
| 23 | 1 | 0 | 0 |
| 24 | 1 | 0 | 1 |
| 25 | 1 | 1 | -1 |
| 26 | 1 | 1 | 0 |
| 27 | 1 | 1 | 1 |

Tabela 4.8 - Valores experimentais dos factores correspondentes aos níveis codificados na matriz do planeamento factorial completo (Tabela 4.7).

| Factores | Unidades | Níveis | | |
|--------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | -1 | 0 | 1 |
| V_i | μL | 65 | 190 | 315 |
| V_L | μL | 306 | 570 | 840 |
| C_{CEDAB} | M | $2,00 \times 10^{-4}$ | $2,00 \times 10^{-3}$ | $2,00 \times 10^{-2}$ |
| | | Factores fixos | | |
| Q_T | ml/min | | 3,2 | |
| C_{PH} | % | | 10 | |
| C_{HS} | M | | 0,15 | |
| C_F | M | | $6,0 \times 10^{-5}$ | |

Tabela 4.9 – Valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial completo com três factores a três níveis (Tabela 4.7) ao injectar no sistema uma solução de Cu(II) 10^{-8} M.

| Experiência | Altura do pico | | |
|-------------|----------------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 5748 | 5688 | 5392 |
| 2 | 242590 | 254330 | 244062 |
| 3 | 819978 | 820002 | 807746 |
| 4 | 5473 | 5529 | 5533 |
| 5 | 238079 | 222547 | 213303 |
| 6 | 732890 | 722090 | 721486 |
| 7 | 3523 | 3663 | 3475 |
| 8 | 226973 | 221529 | 223145 |
| 9 | 331790 | 360906 | 358474 |
| 10 | 17947 | 18619 | 18263 |
| 11 | 892285 | 872989 | 877973 |
| 12 | 1347768 | 1315540 | 1300488 |
| 13 | 20082 | 22594 | 21566 |
| 14 | 745356 | 705356 | 720372 |
| 15 | 1178216 | 1169420 | 1141932 |
| 16 | 13325 | 12161 | 11549 |
| 17 | 231105 | 232401 | 234077 |
| 18 | 1183511 | 1186391 | 1162199 |
| 19 | 18598 | 19386 | 19390 |
| 20 | 758941 | 746257 | 731077 |
| 21 | 1985123 | 1967011 | 1982571 |
| 22 | 17832 | 17848 | 17608 |
| 23 | 792250 | 795614 | 798750 |
| 24 | 1303365 | 1298277 | 1279021 |
| 25 | 18072 | 17420 | 16972 |
| 26 | 353681 | 358121 | 353605 |
| 27 | 1328002 | 1331646 | 1341578 |

Tabela 4.10 – ANOVA da resposta do sistema (Tabela 4.9) nas experiências do planeamento factorial completo (Tabela 4.7)*.

| Sumário | SS | df | MS | F |
|-----------------------------------|------------------------|----|------------------------|-------|
| Modelo | $2,395 \times 10^{13}$ | 26 | $9,213 \times 10^{11}$ | 9178 |
| Erro | $5,420 \times 10^9$ | 54 | $1,003 \times 10^8$ | |
| Total ajustado | $2,396 \times 10^{13}$ | 80 | | |
| Variável | | | | |
| V_i | $2,816 \times 10^{12}$ | 2 | $1,41 \times 10^{12}$ | 14026 |
| V_L | $9,036 \times 10^{11}$ | 2 | $4,52 \times 10^{11}$ | 4501 |
| C_{CEDAB} | $1,691 \times 10^{13}$ | 2 | $8,45 \times 10^{12}$ | 84217 |
| $V_i \times V_L$ | $9,853 \times 10^{10}$ | 4 | $2,43 \times 10^{10}$ | 245 |
| $V_i \times C_{CEDAB}$ | $1,897 \times 10^{12}$ | 4 | $4,74 \times 10^{11}$ | 4726 |
| $V_L \times C_{CEDAB}$ | $6,164 \times 10^{11}$ | 4 | $1,54 \times 10^{11}$ | 1535 |
| $V_i \times V_L \times C_{CEDAB}$ | $7,153 \times 10^{11}$ | 8 | $8,94 \times 10^{10}$ | 891 |

* Ver rodapé da Tabela 4.5.

Tabela 4.11 - ANOVA da regressão da resposta do sistema em função dos níveis dos factores V_i , V_L e C_{CEDAB} *.

| Modelo | SS | df | MS | F |
|-----------|-----------------------|----|-----------------------|---------|
| Regressão | $2,03 \times 10^{13}$ | 3 | $6,77 \times 10^{12}$ | 142,449 |
| Residual | $3,66 \times 10^{12}$ | 77 | $4,75 \times 10^{10}$ | |
| Total | $2,40 \times 10^{13}$ | 80 | | |

R = 0,921

* Ver rodapé da Tabela 4.5

Tabela 4.12 – Valores experimentais dos factores estudados para o sistema optimizado

| Factores | Unidades | Valor óptimo |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| V_i | μL | 315 |
| Q_T | mL/min | 3,2 |
| V_L | μL | 840 |
| C_{CEDAB} | M | $2,00 \times 10^{-2}$ |
| C_{PH} | % | 10 % |
| C_{HS} | M | 0,15 |
| C_{F} | M | $6,00 \times 10^{-5}$ |
| TEPA | M | $4,00 \times 10^{-7}$ |

4.2.3 – Características de resposta do sistema otimizado

Para avaliar a sensibilidade do sistema otimizado efectuaram-se medições da resposta a soluções padrão na gama de 1×10^{-11} M a 1×10^{-7} M utilizando dois tempos de contagem (tempos de acumulação ou tempo de abertura da janela) do tubo fotomultiplicador, 30 e 70 ms. Na Fig. 4.2 apresentam-se as respostas típicas do sistema à série de soluções padrão e a água desionizada para um tempo de acumulação de 70 ms. A análise destas duas figuras evidencia a existência de uma resposta significativa à solução utilizada como branco (água desionizada com ácido clorídrico) para ambos o que mostra a existência de Cu(II) na água desionizada usada como branco.

A presença desta quantidade de Cu(II) no branco dará origem a um limite de detecção do método relativamente elevado. Quando se usa um tempo de contagem de 30 ms o limite de detecção encontra-se próximo dos 10^{-10} M. O valor deste limite para um tempo de contagem de 70 ms é próximo de 10^{-11} M.

A análise da Fig. 4.2 mostra que a reprodutibilidade da resposta do sistema é boa. Por exemplo uma solução padrão de 10^{-10} M de Cu(II) dá origem a uma intensidade de resposta (70 ms) de 285921 ± 926 (3 ensaios) enquanto a água desionizada dá origem a uma intensidade de resposta de 149769 ± 5320 (3 ensaios). Uma análise mais pormenorizada da reprodutibilidade da resposta pode ser observada na Fig. 4.3 onde se apresenta uma série de respostas do sistema (70 ms) a Cu(II) 10^{-8} M – o valor obtido foi 1477090 ± 12952 (22 ensaios) a que corresponde um desvio padrão relativo de 0,88%. A análise destas figuras mostra também que o sistema permite efectuar os ensaios com elevada frequência de amostragem, da ordem das 200 amostras/hora.

Por último nas Figuras 4.4. e 4.5 encontram-se representadas respectivamente uma sequência típica de calibração do sistema otimizado com tempo de integração de 70 ms e a respectiva curva de calibração. A análise da Fig. 4.5 mostra que o sistema apresenta resposta linear na gama de concentração de Cu(II) entre 1×10^{-7} e 1×10^{-10} M e que o limite de detecção é $8,26 \times 10^{-11}$.

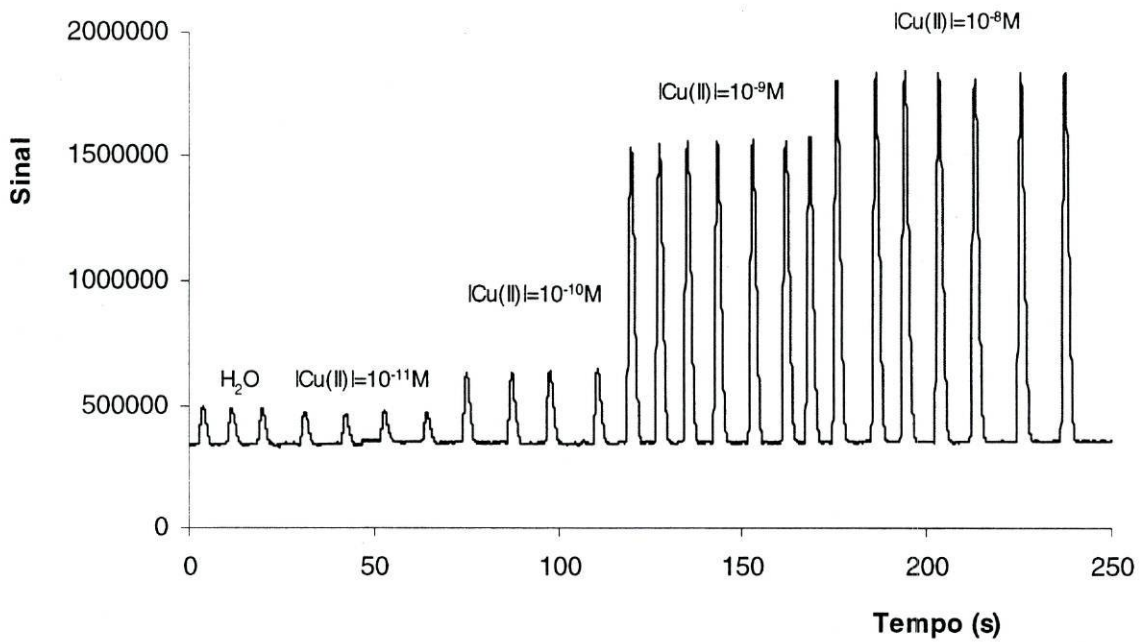


Fig. 4.2 – Sequência de calibração do sistema otimizado com tempo de integração de 70 ms.

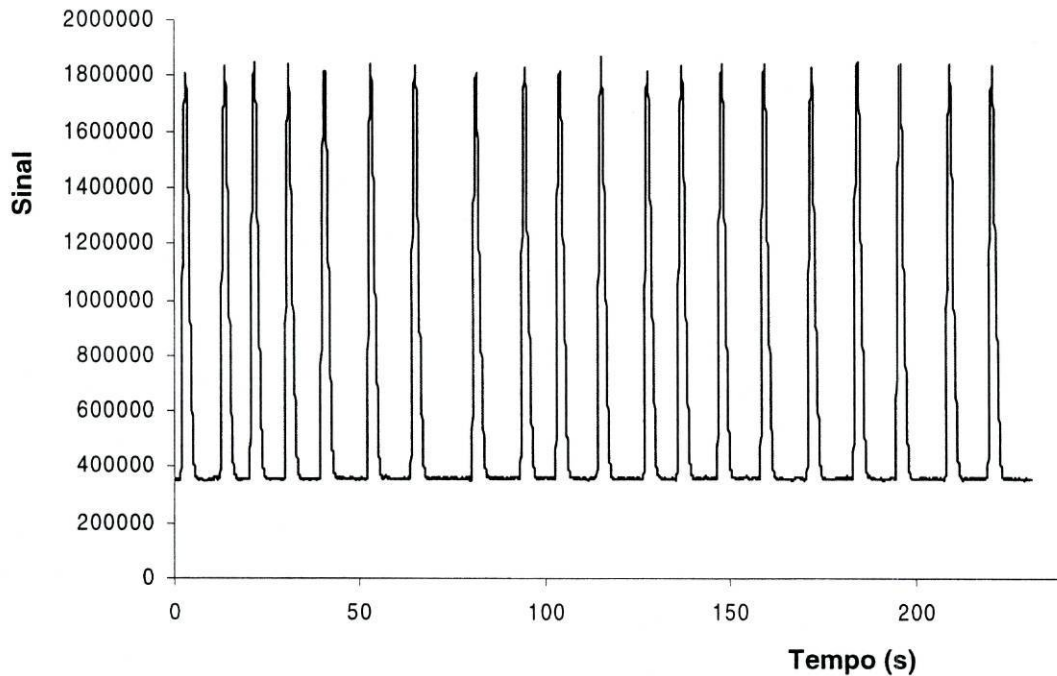


Fig. 4.3 – Reprodutibilidade da resposta do sistema otimizado para um tempo de integração de 70 ms e para uma concentração de 10 nM de Cu(II).

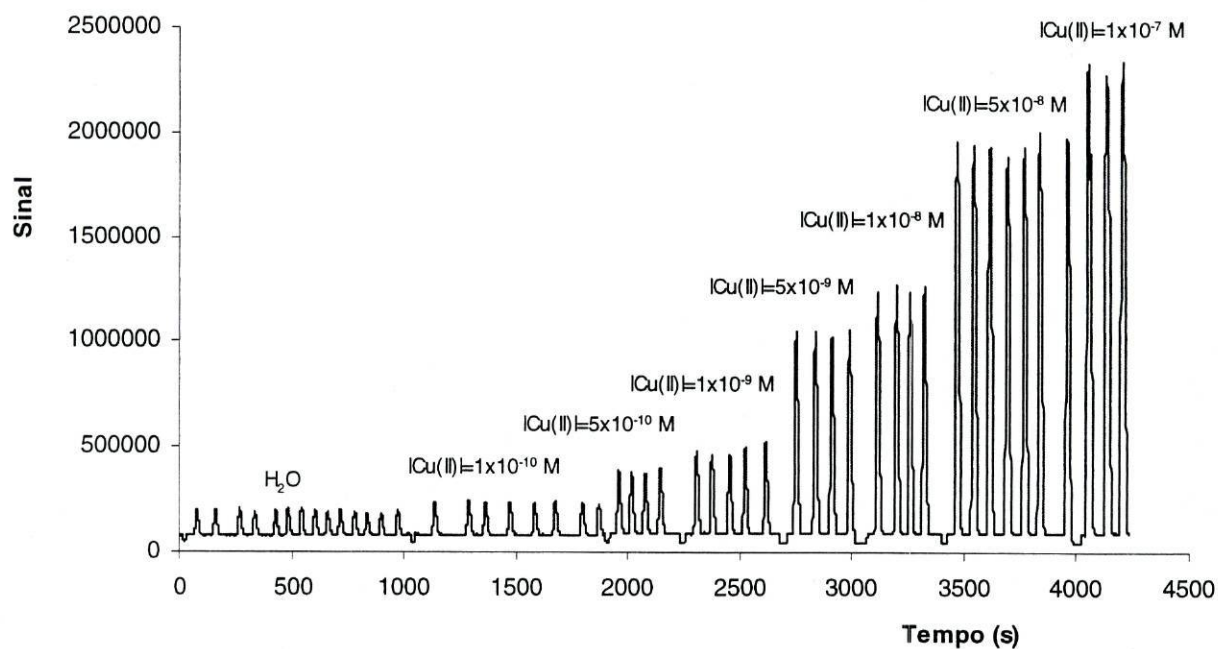


Fig. 4.4 – Sequência de calibração do sistema otimizado com tempo de integração de 70 ms.

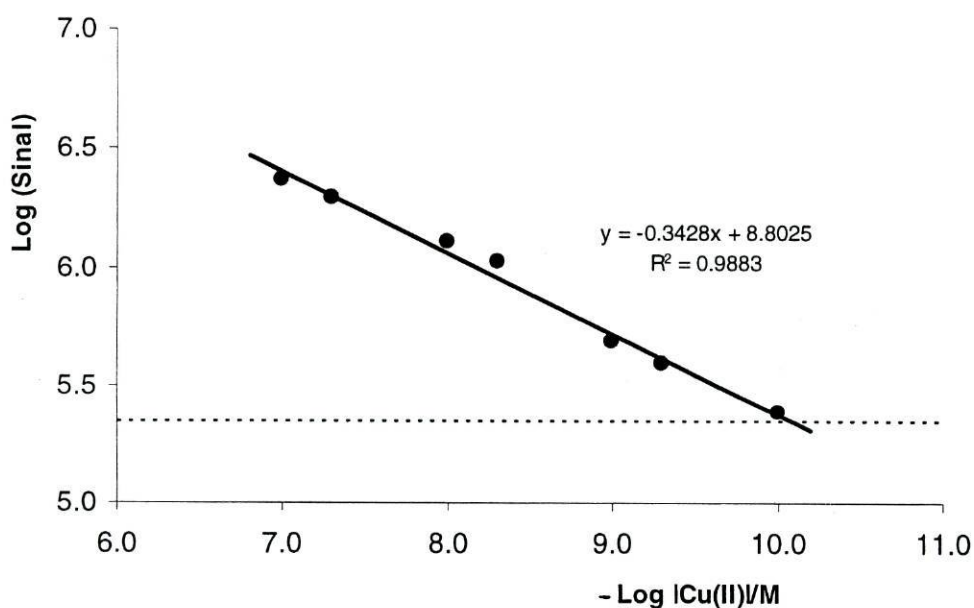


Fig. 4.5- Curva de calibração do sistema otimizado.

4.3 – CONCLUSÕES

O sistema quimioluminescente para detecção e análise de catião Cu(II) baseado na oxidação do complexo que se forma entre o Cu(II) e a 1,10-fenantrolina pelo peróxido de hidrogénio em meio micelar foi implementado e otimizado com sucesso.

O sistema montado e otimizado neste trabalho permite detectar concentrações de catião Cu(II) a níveis vestigiais. Nas condições experimentais utilizadas é difícil diminuir o limite de detecção do método porque para isso seria necessário utilizar procedimentos para análise ultra vestigial, nomeadamente: reagentes ultrapuros, operações de limpeza de material adequadas aos níveis de concentração em estudo, câmaras de fluxo laminar, etc. No entanto, as características de resposta do sistema atribuem-lhe o potencial para a sua incorporação em procedimentos de detecção rápida, particularmente apropriados para ser incluído em instrumentos portáteis.

4.4 – BIBLIOGRAFIA

1. D.B.Paul, *Talanta*, **25**, 377 (1978)
2. L.J.Kricka e G.H. Thorpe, *Analyst*, **108**, 1274 (1983)
3. M. Yamada e S. Suzuki, *Anal. Letters*, **17**, 251 (1984)
4. K.H. Coale, K.S. Johnson, P.M. Stout e C.M. Sakamoto, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 345 (1992)
5. H. Zamzow, K.H. Coale, K.S. Johnson e C.M. Sakamoto, *Anal. Chim. Acta*, **377**, 133 (1998)

5 – SISTEMA DE ANÁLISE DE CLORO LIVRE

5.1 – INTRODUÇÃO

A concentração de cloro livre (Cl_2 , HOCl e OCl^-) na água potável e industrial é um parâmetro de grande importância na avaliação da sua qualidade. O cloro que na água sofre hidrólise originando o ácido hipocloroso e o ião hipoclorito, é o desinfectante químico mais usado para o tratamento de água em todo o mundo. Essa utilização exhaustiva é justificada pelas características intrínsecas desta espécie [1]: grande toxicidade para os microorganismos à temperatura ambiente, alta solubilidade em água, grande capacidade de penetrar através das superfícies, grande tendência para a remoção de odor durante a desinfecção e o seu baixo preço.

Muitos métodos analíticos para a determinação do cloro livre têm sido introduzidos, incluindo titulações volumétricas e técnicas espectrofotométricas em regime de partida e em sistemas de fluxo [2-7]. Diversos métodos quimioluminescentes têm sido apresentados como alternativas analíticas a outros métodos devido aos seus elevados limites de detecção [8-14]. Algumas atenções têm sido dadas à reacção quimioluminescente entre os corantes da classe dos xantenos com o cloro livre [10-14].

A reacção quimioluminescente do hipoclorito com o corante rodamina 6G (da classe dos xantenos) origina luz suficiente para permitir o desenvolvimento de metodologias de detecção sensíveis para a rápida quantificação de hipoclorito em água [12,14]. Contudo, a optimização multivariável de um sistema de injeção em fluxo com este tipo de procedimento não foi ainda executada. Por outro lado, também não foi ainda avaliado o efeito da presença de espécies surfactantes na produção de quimioluminescência.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver um método expedito de análise do cloro livre em água baseado na reacção entre o hipoclorito e a rodamina 6G. Para o efeito foi montado um sistema de fluxo (ver Fig 3.4) e a sua optimização foi efectuada por análise factorial, considerando os seguintes factores experimentais: caudal total (Q_T), concentração de rodamina 6G (C_R), volume de injeção (V_i) e temperatura (T). A função de resposta considerada para a optimização foi a altura de pico. Um estudo prévio destes quatro factores foi efectuada com um planeamento factorial completo com

dois níveis para cada factor. De seguida, e após selecção dos factores com maior efeito, foi utilizado um planeamento factorial constituído pela sobreposição de um planeamento factorial com dois níveis e um planeamento em estrela [15] – este planeamento permite estudar três níveis para os factores. Após a optimização do sistema de análise de cloro livre estudou-se o efeito da presença de surfactantes no sinal de quimioluminescência. Para o efeito foi utilizado um planeamento de experiências factorial para os factores concentração do surfactante cloreto de cetilpiridina CPC (C_{CPC}), concentração de rodamina 6G e caudal total utilizando três níveis para cada factor. Por último, foram avaliadas as características de resposta do sistema ao cloro livre.

5.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 – Estudo prévio do sistema

Com base numa análise prévia do sistema de fluxo (Fig. 3.4) e da literatura foram seleccionados os factores apresentados na Tabela 5.1.

Uma vez que, o número de factores seleccionados não é muito elevado, a sua análise foi feita utilizando um planeamento factorial completo com dois níveis (Tabela 5.2). Desta forma pretendeu-se verificar quais os factores mais significativos e detectar interacções para posteriormente efectuar um estudo mais pormenorizado.

Tabela 5.1 - Factores estudados e suas abreviaturas.

| Factores | Abreviatura |
|-----------------------------|-------------|
| Caudal total | Q_T |
| Volume de injeção | V_i |
| Temperatura | T |
| Concentração de rodamina 6G | C_R |

Tabela 5.2 – Matriz do planejamento factorial completo com quatro factores a dois níveis representados pelos algarismos (0) e (1).

| Experiência | Factores | | | |
|-------------|----------|---|---|---|
| | a | b | c | d |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 6 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 7 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 8 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 12 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 14 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 5.3- Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planejamento da Tabela 5.2.

| Factores | Unidades | Níveis | |
|----------------|----------|----------------------|----------------------|
| | | 0 | 1 |
| Q _T | mL/min | 2.6 | 5.1 |
| V _i | µL | 50 | 100 |
| T | °C | 45 | 75 |
| C _R | M | 3 x 10 ⁻³ | 1 x 10 ⁻² |

Na Fig. 5.1 encontram-se representados alguns dos picos obtidos nessas experiências. Os picos Fig 5.1 mostram que a resposta do sistema é rápida sendo necessário apenas 30 segundos por cada injeção

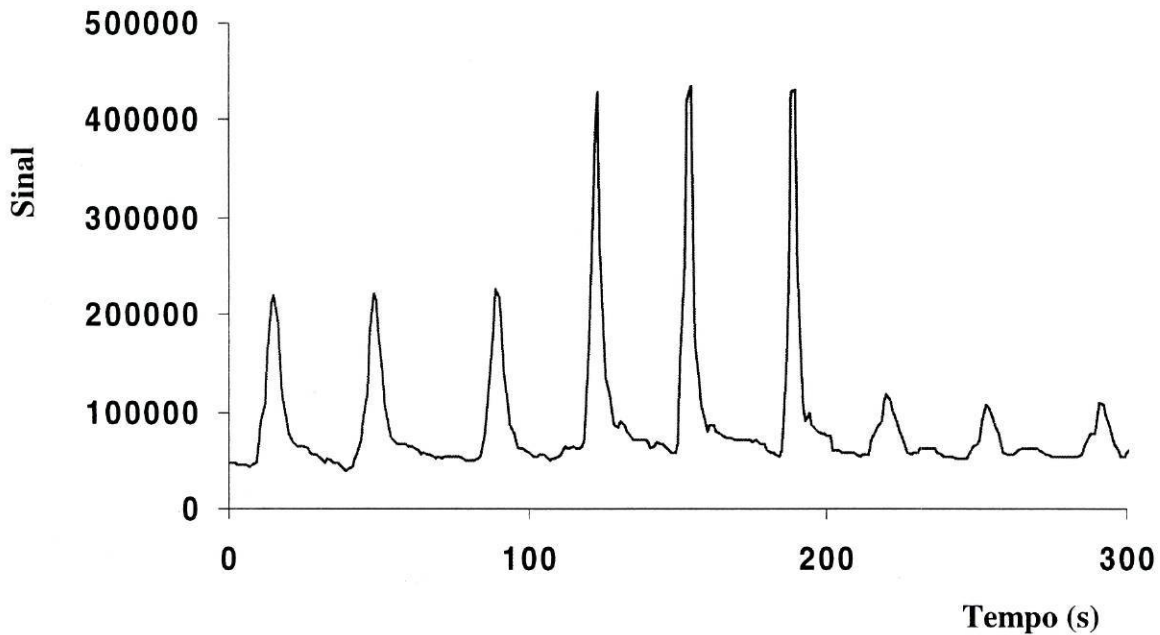


Fig. 5.1 – Resposta do sistema obtida em algumas experiências do planeamento da Tabela 5.2.

Os valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 5.2 encontram-se na Tabela 5.4. Estes valores, correspondentes a cada uma das 16 experiências (Tabela 5.4), foram sujeitas a análise de variância (ANOVA) e os resultados estão desta encontram-se resumidos na Tabela 5.5. A análise da tabela, em particular os valores da coluna de MS e os valores de F , permite fazer as seguintes interpretações: o volume de injeção (V_i) tem um pequeno efeito na resposta ($F \approx 24$), a temperatura (T) tem uma grande importância ($F \approx 6488$) e os outros dois factores caudal total (Q_t) e concentração de rodamina 6G (C_R), têm igualmente um efeito significativo ($F \approx 3789$ e $F \approx 3661$ respectivamente). No que se refere às interações entre factores a mesma Tabela mostra que as interações entre os três factores com maior efeito são as mais significativas, com valores de F entre 197 e 2121.

Tabela 5.4 – Resultados obtidos nas experiências do planejamento factorial da Tabela 5.2 para uma solução de hipoclorito $6,35 \times 10^{-4}$ M.

| Experiência | Altura de pico | | |
|-------------|----------------|--------|--------|
| | a | b | c |
| 1 | 196173 | 204305 | 189917 |
| 2 | 371989 | 377653 | 373057 |
| 3 | 36896 | 39672 | 45492 |
| 4 | 127522 | 112862 | 128962 |
| 5 | 186725 | 206837 | 201469 |
| 6 | 430636 | 412596 | 416436 |
| 7 | 62944 | 65804 | 69128 |
| 8 | 93816 | 91380 | 97244 |
| 9 | 55779 | 58903 | 55607 |
| 10 | 170889 | 173129 | 177365 |
| 11 | 36851 | 35423 | 32251 |
| 12 | 53862 | 57914 | 63406 |
| 13 | 54077 | 46021 | 52649 |
| 14 | 173325 | 166597 | 176889 |
| 15 | 39516 | 31132 | 33024 |
| 16 | 84102 | 100158 | 86238 |

Tabela 5.5 – ANOVA da resposta do sistema (Tabela 5.4) nas experiências do planeamento da Tabela 5.2*.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _b |
|--|--------------------------|----|--------------------------|--------------------------------------|--------|-----------------|
| Modelo | 1,512 x 10 ¹² | 16 | 9,452 x 10 ¹⁰ | 2697,520 | 0 | 0 |
| Erro | 1,121 x 10 ⁹ | 32 | 3,504 x 10 ⁷ | | | |
| Ajuste total | 6,184 x 10 ¹¹ | 47 | | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | | | | | | |
| Q _T | 1,328 x 10 ¹¹ | 1 | 1,328 x 10 ¹¹ | 3789,022 | ,151 | 0,000 |
| V _i | 8,574 x 10 ⁸ | 1 | 8,574 x 10 ⁸ | 24,470 | -0,023 | 0,214 |
| T | 2,273 x 10 ¹¹ | 1 | 2,273 x 10 ¹¹ | 6488,355 | ,435 | 0,000 |
| C _R | 1,283 x 10 ¹¹ | 1 | 1,283 x 10 ¹¹ | 3661,086 | -,174 | 0,000 |
| Q _T *V _i | 7,04 x 10 ⁷ | 1 | 7,049 x 10 ⁷ | 2,012 | | |
| Q _T *T | 7,432 x 10 ¹⁰ | 1 | 7,432 x 10 ¹⁰ | 2121,005 | | |
| V _i *T | 2,718 x 10 ⁷ | 1 | 2,718 x 10 ⁷ | 0,776 | | |
| Q _T *V _i *T | 1,511 x 10 ⁹ | 1 | 1,511 x 10 ⁹ | 43,112 | | |
| Q _T *C _R | 6,916 x 10 ⁹ | 1 | 6,916 x 10 ⁹ | 197,369 | | |
| V _i *C _R | 1,292 x 10 ⁸ | 1 | 1,292 x 10 ⁸ | 3,687 | | |
| Q _T *V _i *C _R | 4,056 x 10 ⁸ | 1 | 4,056 x 10 ⁸ | 11,575 | | |
| T*C _R | 3,756 x 10 ¹⁰ | 1 | 3,756 x 10 ¹⁰ | 1072,036 | | |
| Q _T *T*C _R | 3,127 x 10 ⁹ | 1 | 3,127 x 10 ⁹ | 89,240 | | |
| V _i *T*C _R | 9,351 x 10 ⁸ | 1 | 9,351 x 10 ⁸ | 26,686 | | |
| Q _T *V _i *T*C _R | 2,981 x 10 ⁹ | 1 | 2,981 x 10 ⁹ | 85,072 | | |
| | R ² =0,999 | | | R _{aj} ² = 0,999 | | |

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; F – razão de Fisher; b – coeficiente beta; DP_b – desvio padrão de b.

A análise dos coeficientes de correlação (R aproximadamente igual a 1) mostra que os dados experimentais ajustam-se ao modelo. A Tabela 5.6 mostra a ANOVA para o mesmo conjunto de dados na Tabela 5.4, mas neste caso, apenas foram considerados os factores Q, T e C_R e as interações de segunda ordem.

Tabela 5.6- ANOVA dos dados da Tabela 5.4 de dados considerando apenas os factores caudal total (Q_T), temperatura (T) e concentração de rodamina 6G (C_R) *.

| Efeito | SS | df | MS | F |
|-----------------|------------------------|------------------|------------------------|-------|
| Modelo | $1,502 \times 10^{12}$ | 7 | $2,146 \times 10^{10}$ | 788,1 |
| Q_t | $1,328 \times 10^{11}$ | 1 | $1,328 \times 10^{11}$ | 487,6 |
| T | $2,273 \times 10^{11}$ | 1 | $2,273 \times 10^{11}$ | 834,9 |
| C_R | $1,283 \times 10^{11}$ | 1 | $1,283 \times 10^{11}$ | 471,1 |
| $Q_t * T$ | $7,432 \times 10^{10}$ | 1 | $7,432 \times 10^{10}$ | 272,9 |
| $Q_t * C_R$ | $6,916 \times 10^9$ | 1 | $6,916 \times 10^9$ | 25,4 |
| $T * C_R$ | $3,756 \times 10^{10}$ | 1 | $3,756 \times 10^{10}$ | 137,9 |
| Falta de ajuste | $3,127 \times 10^9$ | 1 | $3,127 \times 10^9$ | 15,6 |
| Erro | $1,116 \times 10^{10}$ | 32 | $2,723 \times 10^9$ | |
| Total | $1,513 \times 10^{12}$ | 48 | | |
| Total corrigido | $6,184 \times 10^{11}$ | 47 | | |
| | $R^2=0,993$ | $R_{aj}^2=0,991$ | | |

* Ver rodapé da Tabela 5.5

Os resultados desta tabela confirmam que estes três factores são na realidade suficientes para descrever a variação dos dados obtidos. Para além dos valores dos coeficientes de correlação elevados (próximo de 1), a falta de ajuste é pequena quando comparada com a contribuição dos efeitos do modelo.

A análise dos coeficientes do modelo linear (coeficientes beta padronizados, B, Tabela 5.5), usados para ajustar os dados experimentais mostra que quando T ($B=0,435$) e Q_t ($B=0,151$) aumentam, o sinal quimioluminescente também aumenta, mas quando o C_R ($B=-0,174$) aumenta o sinal diminui. Pelo facto do volume de injeção não apresentar nenhum efeito de realce na resposta, foi utilizado um $V_i=50\mu\text{l}$ (escolhido com base na economia de reagente) durante o restante estudo.

5.2.2 - Estudo dos factores mais significativos

Para obter informação sobre possíveis efeitos não lineares dos três factores (T , Q_T e C_R) na resposta do sistema foi utilizado um planeamento de experiências (ver Tabela 5.7) que corresponde á sobreposição de um planeamento factorial completo com três factores a dois níveis (8 experiências que definem os vértices de um cubo) com mais 6 experiências correspondentes ao centro das faces do cubo. Na Tabela 5.8 encontram-se os valores experimentais a que correspondem os níveis dos factores do planeamento da Tabela 5.7. Os dados desta Tabela, quando comparados com os da Tabela 5.3, mostram que as gamas dos valores experimentais dos factores em estudo foram reajustadas: os valores do caudal total e da temperatura foram incrementados, enquanto a gama de valores da concentração de rodamina 6G em investigação diminuiu.

Tabela 5.7 – Matriz do planeamento de experiências utilizado para detectar efeitos não lineares dos três factores usando três níveis representados pelos algarismos (-1),(0) e (1).

| Experiência | Níveis dos factores | | |
|-------------|---------------------|----|----|
| | a | b | c |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | 1 | -1 | 1 |
| 4 | -1 | -1 | 1 |
| 5 | -1 | 1 | -1 |
| 6 | 1 | 1 | -1 |
| 7 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | -1 | 1 | 1 |
| 9 | 0 | 0 | -1 |
| 10 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | -1 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 1 | 0 |
| 14 | 0 | -1 | 0 |

Tabela 5.8 - Factores e respectivos níveis utilizados no planeamento experimental da Tabela 5.7.

| Factores | Unidades | Níveis | | |
|----------------|----------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| | | -1 | 0 | 1 |
| Q _T | mL/min | 2,6 | 5,1 | 7,6 |
| C _R | M | 1 x 10 ⁻³ | 7 x 10 ⁻³ | 1,4 x 10 ⁻² |
| T | °C | 60 | 70 | 80 |
| | | Factores fixos | | |
| V _i | µL | 50 | | |

Os resultados obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 5.7 encontram-se na Tabela 5.9 e os resultados da sua ANOVA estão resumidos na Tabela 5.10.

Tabela 5.9 – Valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 5.7 para uma solução 6,35 x 10⁻⁴ M de hipoclorito.

| Experiência | Altura de pico | | |
|-------------|----------------|--------|--------|
| | a | b | c |
| 1 | 161516 | 172688 | 168572 |
| 2 | 281641 | 276617 | 277597 |
| 3 | 208207 | 211359 | 209971 |
| 4 | 76817 | 85509 | 84021 |
| 5 | 458662 | 436458 | 466150 |
| 6 | 516770 | 532538 | 520570 |
| 7 | 534822 | 519054 | 522854 |
| 8 | 139118 | 131026 | 126586 |
| 9 | 356076 | 371356 | 366860 |
| 10 | 437550 | 436578 | 447158 |
| 11 | 270156 | 253460 | 269428 |
| 12 | 143702 | 153774 | 162290 |
| 13 | 443125 | 447073 | 438537 |
| 14 | 273134 | 270454 | 285282 |

Tabela 5.10 - ANOVA dos resultados da Tabela 5.9 *.

| Efeito | SS | df | MS | F | b | DP _b |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------|-------|-----------------|
| Modelo | 4,869 x 10 ¹² | 14 | 3,478 x 10 ¹¹ | 5868,850 | | |
| Q _t | 3,083 x 10 ¹¹ | 1 | 3,083 x 10 ¹¹ | 5202,737 | ,577 | 0,000 |
| T | 3,052 x 10 ¹¹ | 1 | 3,052 x 10 ¹¹ | 5151,328 | ,621 | 0,000 |
| C _R | 9,089 x 10 ¹⁰ | 1 | 9,089 x 10 ¹⁰ | 1533,854 | -,335 | 0,000 |
| Q _t *T*C _R | 3,536 x 10 ¹⁰ | 1 | 3,536 x 10 ¹⁰ | 596,83 | ,200 | 0,000 |
| Q _t *T | 1,884 x 10 ¹⁰ | 1 | 1,884 x 10 ¹⁰ | 317,87 | ,146 | 0,000 |
| Q _t *C _R | 4,348 x 10 ¹⁰ | 1 | 4,348 x 10 ¹⁰ | 733,76 | ,222 | 0,000 |
| T*C _R | 1,021 x 10 ¹⁰ | 1 | 1,021 x 10 ¹⁰ | 172,26 | -,108 | 0,006 |
| Erro puro | 1,659 x 10 ⁹ | 28 | 5,925 x 10 ⁷ | | | |
| Total | 4,870 x 10 ¹² | 42 | | | | |
| | R ² =1,000 | R _{aj} ² =0,9 | | | | |

* Ver rodapé da Tabela 5.5.

A análise da Tabela 5.10, mostra que a variância dos dados é descrita em grande extensão com um modelo linear completo em que se incluem os efeitos principais e as correspondentes interações de segunda e de terceira ordem. As Figuras 5.2 e 5.3. mostram, como exemplo, duas superfícies de resposta em que se representa a altura de pico em função, respectivamente, dos níveis de T e de Q_t (Fig. 5.2) e dos níveis de T e de C_R (Fig. 5.3).

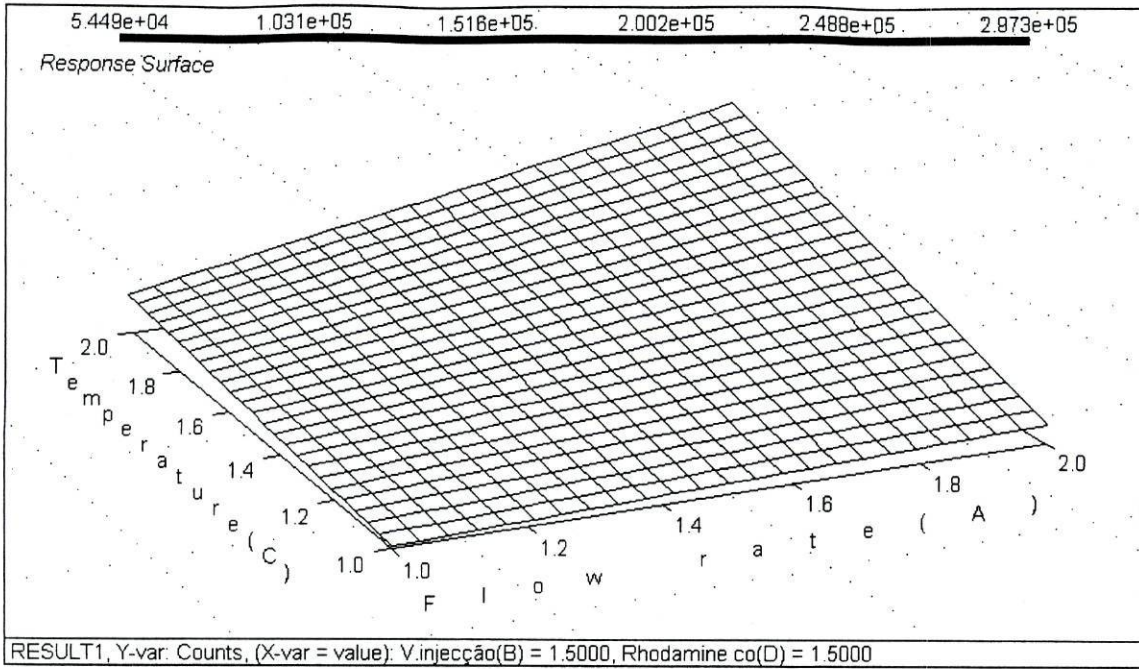


Fig. 5.2 - Representação de uma superfície de resposta do sistema: altura de pico em função da temperatura e do caudal.

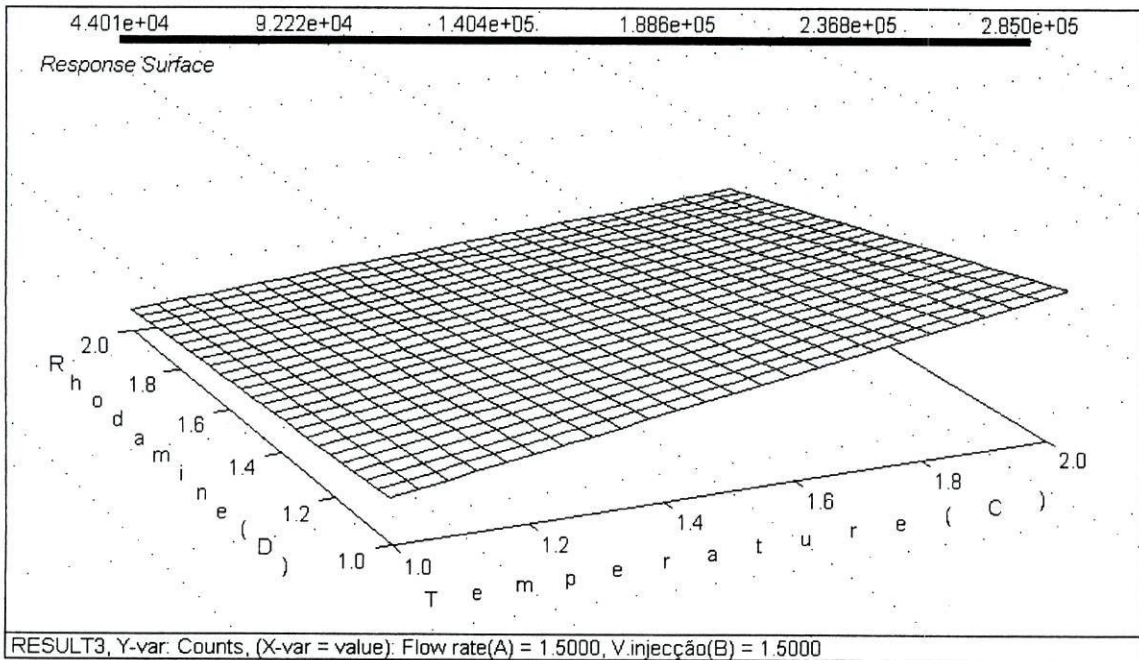


Fig. 5.3 - Representação de uma superfície de resposta do sistema: altura de pico em função da temperatura e do caudal.

Tomando em consideração que as interações têm uma contribuição relativamente pequena para o modelo quando comparadas com as restantes contribuições dos efeitos principais (ver Tabela 5.10) e para tentar avaliar melhor o efeito da rodamina 6G no sistema foi feito um estudo univariável deste factor. Todos os restantes factores foram mantidos nos seus valores óptimos (Tabela 5.10) e foi analisado o sinal quimioluminescente de uma solução $6,20 \times 10^{-4}$ M de hipoclorito em função da concentração de rodamina na gama de valores entre $1,31 \times 10^{-2}$ e $1,41 \times 10^{-4}$ M (Fig 5.4). a análise da figura mostra que o ponto óptimo para a concentração de rodamina 6G fica situado em $1,41 \times 10^{-3}$ M.

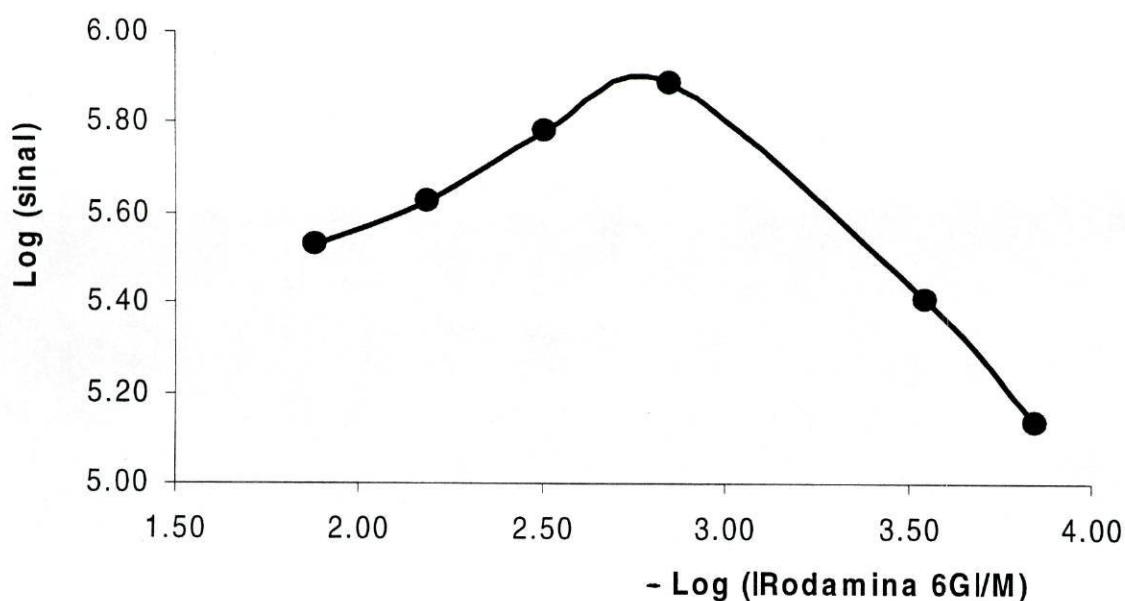


Fig. 5.4 - Representação da variação do sinal com a concentração de rodamina.

Em face dos resultados obtidos, as condições óptimas para o sistema foram determinadas e encontram-se resumidas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11- Factores e respectivos níveis otimizados para o sistema.

| Factores | Unidades | Valores óptimos |
|----------------|----------|-----------------|
| T | °C | 80 |
| V _i | μL | 50 |
| C _R | mM | 1,41 |
| Q _t | ml/min. | 7,6 |

5.2.3 – Características de resposta do sistema otimizado

Utilizando as condições ótimas determinadas no estudo anterior (Tabela 5.11), que maximizaram a resposta do sistema, passou-se à avaliação dos parâmetros de calibração.

A Fig. 5.6 mostra uma sequência de calibração típica para o sistema de hipoclorito com concentrações compreendidas entre $1,55 \times 10^{-5}$ M e $3,10 \times 10^{-4}$, enquanto a Fig. 5.7 mostra a curva do logaritmo da altura de pico em função do logaritmo da concentração de hipoclorito. Pode-se verificar na Fig. 5.7 que existem duas regiões com relação linear entre o logaritmo da altura de pico e o logaritmo da concentração de hipoclorito. Deste modo, podemos observar uma região de resposta linear na gama de valores de concentração entre $1,55 \times 10^{-5}$ e $6,20 \times 10^{-5}$ M, e outra na gama de valores $9,30 \times 10^{-5}$ a $3,10 \times 10^{-4}$ M. O valor do coeficiente de correlação para a primeira região (entre $1,55 \times 10^{-5}$ e $6,20 \times 10^{-5}$ M) é de 0,9996 e os valores do declive e da intercepção da recta de regressão são respectivamente $-1,57$ e $11,458$. Para a segunda região (entre $9,30 \times 10^{-5}$ e $3,10 \times 10^{-4}$ M) o coeficiente de correlação é de 0,96 e os valores do declive e da intercepção da recta de regressão são respectivamente $-0,867$ e $8,483$.

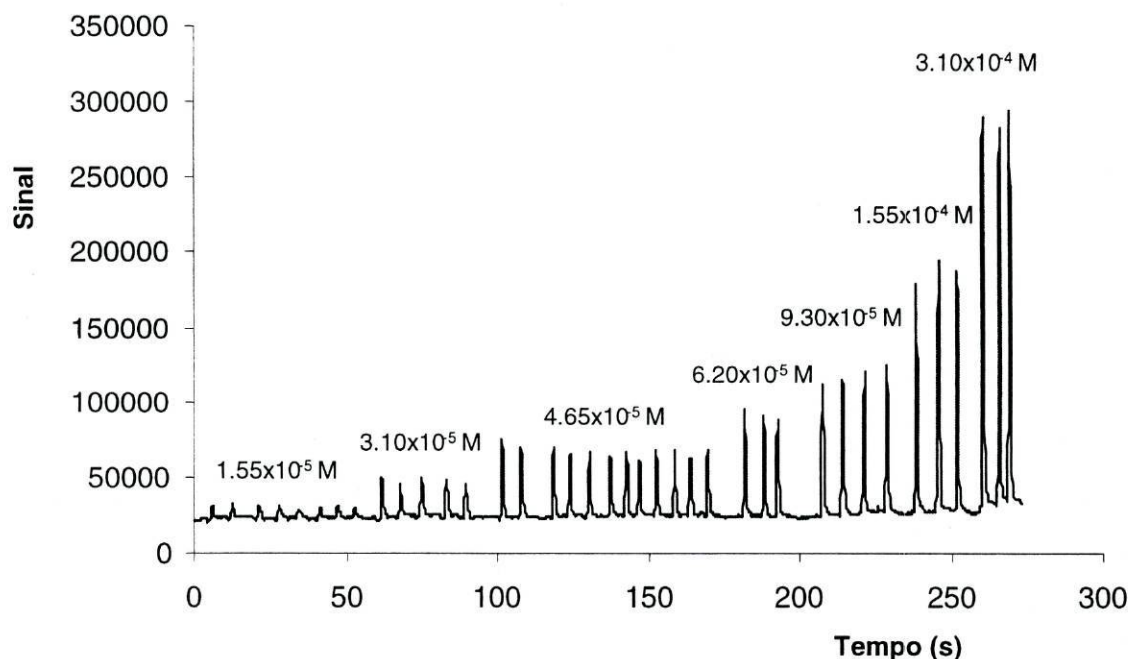


Fig. 5.5 - Representação de uma sequência de calibração típica para o sistema nas condições ótimas.

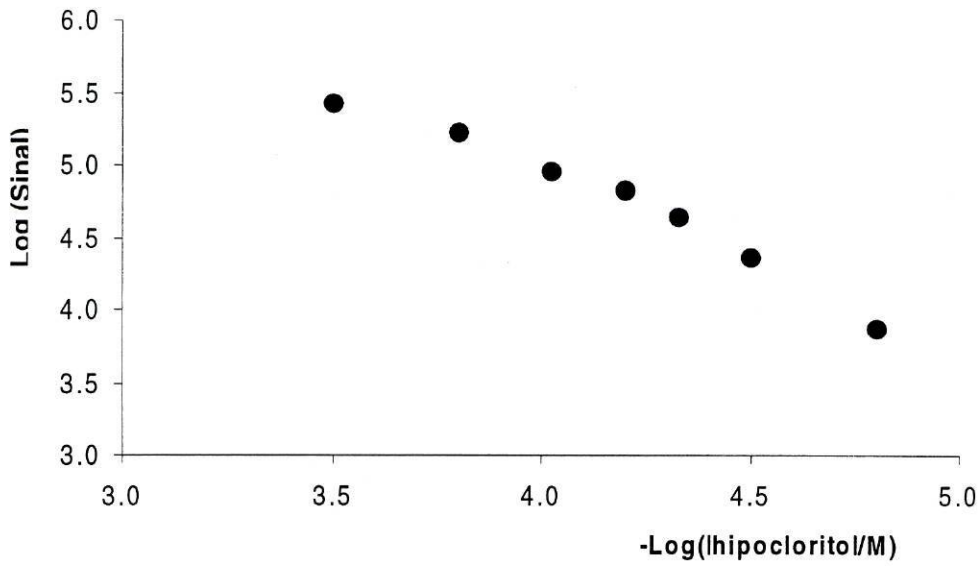


Fig. 5.6 - Representação do logaritmo do sinal quimioluminescente em função do logaritmo da concentração de hipoclorito

A partir do desvio padrão da linha de base do sistema obteve-se o limite de detecção (LD) de $6,60 \times 10^{-5}$ M, calculado como três vezes o referido valor.

5.2.4 – Estudo do efeito dos surfactantes

Segundo a literatura, o sinal quimioluminescente resultante da reacção com a rodamina 6G aumenta na presença de um agente tensioactivo (surfactante). Contudo, este efeito apenas foi observado em experiências efectuadas em regime de partida, não tendo sido detectado em sistemas de fluxo. Para avaliar o efeito do surfactante no sinal quimioluminescente (Fig. 5.7) do sistema optimizado foram efectuados alguns ensaios com dois surfactantes catiónicos: cloreto de cetilpiridina (CPC) e brometo de cetilpiridina (CPB). Foi observado que a altura de pico aumentou nos dois casos, mas o CPC foi o que originou o maior incremento.

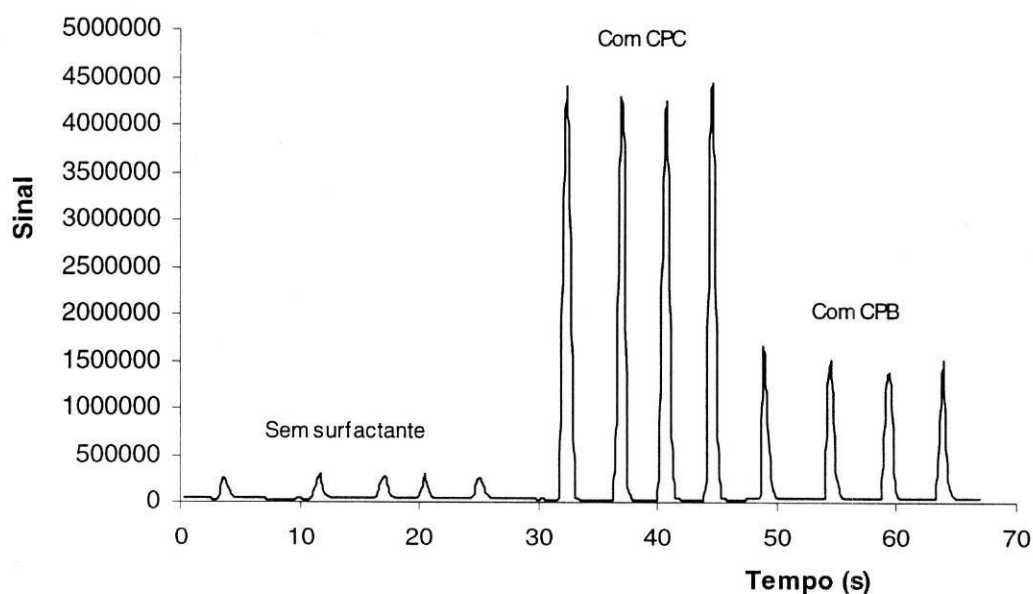


Fig. 5.7 - Efeito de dois surfactantes no sinal de do sistema para uma concentração de hipoclorito de $3,10 \times 10^{-4}$ M.

Para investigar o efeito da concentração de CPC na resposta do sistema foi efectuado um estudo em que foram avaliados em simultâneo o efeito da concentração de CPC (C_{CPC}) e dos factores concentração de rodamina 6G (C_R) e caudal (Q_T). Neste estudo o volume de injeção e a temperatura foram mantidos nos seus valores óptimos

determinados anteriormente, respectivamente de 50 μL e 80 $^{\circ}\text{C}$. Este estudo dos três factores em simultâneo é necessário porque são possíveis interacções químicas e cinéticas da reacção quimioluminescente com o surfactante. Para levar a efeito o estudo foi usado um planeamento factorial completo com três factores a três níveis (Tabela 5.12). Na Tabela 5.13 encontram-se resumidos os valores experimentais a que correspondem os níveis da Tabela 5.12. Por último, nas Tabelas 5.14 e 5.15 encontram-se respectivamente os valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 5.12. e a ANOVA desses valores.

Tabela 5.12 - Matriz do planejamento factorial, com três factores a três níveis representados pelos algarismos (-1), (0) e (1).

| Experiência | Factores | | |
|-------------|----------|----|----|
| | A | b | c |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 0 | -1 | -1 |
| 3 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | -1 | 0 | -1 |
| 5 | 0 | 0 | -1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | -1 |
| 8 | 0 | 1 | -1 |
| 9 | 1 | 1 | -1 |
| 10 | -1 | -1 | 0 |
| 11 | 0 | -1 | 0 |
| 12 | 1 | -1 | 0 |
| 13 | -1 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 1 | 0 | 0 |
| 16 | -1 | 1 | 0 |
| 17 | 0 | 1 | 0 |
| 18 | 1 | 1 | 0 |
| 19 | -1 | -1 | 1 |
| 20 | 0 | -1 | 1 |
| 21 | 1 | -1 | 1 |
| 22 | -1 | 0 | 1 |
| 23 | 0 | 0 | 1 |
| 24 | 1 | 0 | 1 |
| 25 | -1 | 1 | 1 |
| 26 | 0 | 1 | 1 |
| 27 | 1 | 1 | 1 |

Tabela 5.13 - Valores a que correspondem os níveis dos factores no planeamento da Tabela 5.12.

| Factores | Unidades | Níveis | | |
|-----------------------|----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | -1 | 0 | 1 |
| Q _T | mL/min | 5,2 | 6,4 | 7,6 |
| C _R | M | 1 x 10 ⁻³ | 7 x 10 ⁻³ | 1,4 x 10 ⁻² |
| C _{CPC} | M | 2,52 x 10 ⁻³ | 3,76 x 10 ⁻³ | 5 x 10 ⁻³ |
| Factores fixos | | | | |
| V _i | µL | 50 | | |
| T | °C | 80 | | |

Tabela 5.14 – Resultados obtidos nas experiências do planejamento experimental da Tabela 5.12 para uma solução de hipoclorito $6,35 \times 10^{-4}$ M.

| Experiência | Altura de pico | | |
|-------------|----------------|----------|----------|
| | a | b | c |
| 1 | 1222214 | 1313566 | 1378746 |
| 2 | 1293642 | 1126566 | 1369178 |
| 3 | 792375 | 1001263 | 964739.4 |
| 4 | 1496162 | 1530350 | 1565702 |
| 5 | 952756 | 1030772 | 951940 |
| 6 | 1827237 | 1829717 | 1841565 |
| 7 | 1729384 | 1784880 | 1696132 |
| 8 | 2026574 | 2275254 | 2230774 |
| 9 | 2565723 | 2585731 | 2594303 |
| 10 | 1123040 | 1200080 | 1183616 |
| 11 | 1341166 | 1249502 | 1274222 |
| 12 | 871847 | 861595 | 805247 |
| 13 | 1396546 | 1529574 | 1511442 |
| 14 | 2202689 | 2130469 | 2117029 |
| 15 | 1986478 | 1986994 | 1958838 |
| 16 | 1696535 | 1886027 | 1801331 |
| 17 | 2080140 | 2166796 | 2116996 |
| 18 | 2557315 | 2840235 | 2855135 |
| 19 | 1102116 | 1076868 | 1099772 |
| 20 | 1663000 | 1453524 | 1283156 |
| 21 | 834075 | 961094.9 | 813246.9 |
| 22 | 1424776 | 1584768 | 1442864 |
| 23 | 2174569 | 2391609 | 2335809 |
| 24 | 1487166 | 1519306 | 1673066 |
| 25 | 1784933 | 1751645 | 1624401 |
| 26 | 2259668 | 2050784 | 2156572 |
| 27 | 2279222 | 2338022 | 2614070 |

Tabela 5.15 – ANOVA dos resultados da Tabela 5.14.

| Effect | SS | df | MS | F |
|---|------------------------|----|-------------------------------------|----------|
| Modelo | $2,473 \times 10^{14}$ | 27 | $9,158 \times 10^{12}$ | 1065,386 |
| Q _T | $2,635 \times 10^{11}$ | 2 | $1,318 \times 10^{11}$ | 15,329 |
| C _R | $1,407 \times 10^{12}$ | 2 | $7,122 \times 10^{12}$ | 81,830 |
| C _{CPC} | $1,424 \times 10^{13}$ | 2 | $7,122 \times 10^{12}$ | 828,531 |
| Q _T * C _R | $1,286 \times 10^{12}$ | 4 | $3,216 \times 10^{11}$ | 37,410 |
| Q _T *C _{CPC} | $7,178 \times 10^{11}$ | 4 | $1,794 \times 10^{11}$ | 20,874 |
| C _R * C _{CPC} | $3,241 \times 10^{12}$ | 4 | $8,103 \times 10^{11}$ | 94,260 |
| C _{CPC} *C _R * Q _T | $1,490 \times 10^{12}$ | 8 | $1,862 \times 10^{11}$ | 21,660 |
| Erro | $1,121 \times 10^9$ | 32 | $3,504 \times 10^7$ | |
| Total | $1,513 \times 10^{12}$ | 48 | | |
| Total corrigido | $6,184 \times 10^{11}$ | 47 | | |
| Erro puro | $4,642 \times 10^{11}$ | 54 | $8,596 \times 10^9$ | |
| | R ² =0,998 | | R _{aj} ² =0,997 | |

* Ver rodapé da Tabela 5.5

A análise dos resultados da Tabela 5.15 mostra que a concentração de CPC é o factor com maior efeito na resposta do sistema e que as suas interações com outros factores representam uma pequena contribuição para a variância total dos dados. Nestas condições a optimização da concentração de surfactante pode ser efectuada de forma univariável. O valor óptimo da concentração de CPC neste estudo corresponde ao valor máximo utilizado, 5×10^{-3} M.

As características de resposta dos sistema com rodamina 6G e CPC na solução indicadora foram também avaliadas. A Fig. 5.8, mostra respostas típicas do sistema a uma série de injeções da solução indicadora em duas soluções de hipoclorito com valores de concentração de $3,10 \times 10^{-4}$ M e $6,20 \times 10^{-5}$ M. A análise da precisão da altura de pico dos dois conjuntos mostra um desvio padrão relativo de 3% e 6% respectivamente para o maior e menor nível de concentração. Estes valores reflectem uma boa precisão da resposta do sistema.

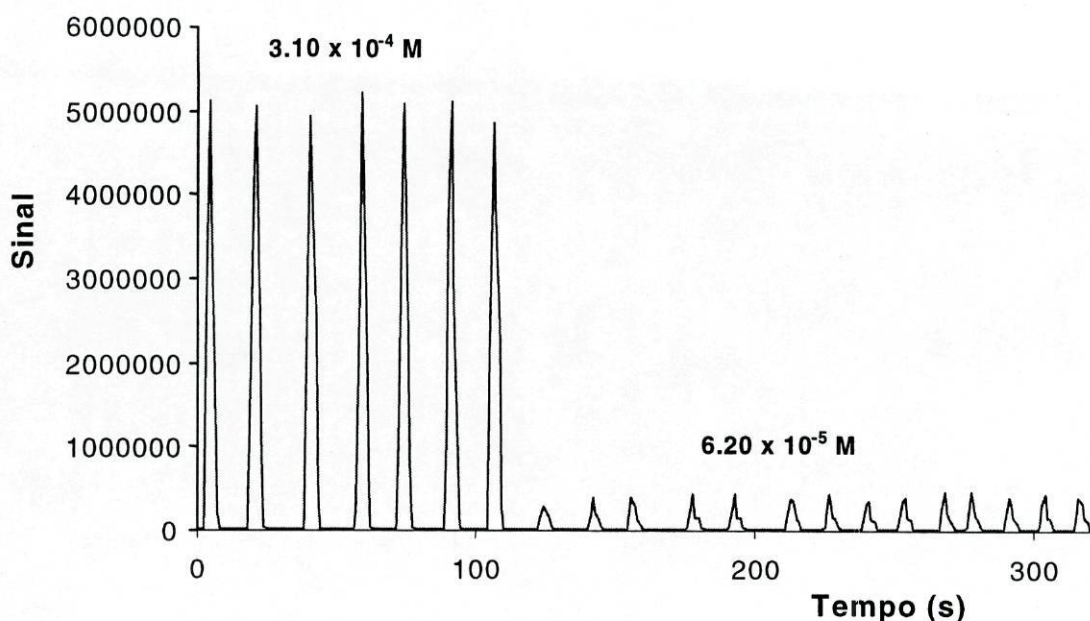


Fig. 5.8 – Resposta do sistema com solução indicadora com rodamina 6G e CPC para amostras de hipoclorito com a concentração indicada.

A Fig. 5.9 mostra uma sequência de calibração típica para o sistema de hipoclorito com concentrações compreendidas entre $6,20 \times 10^{-5}$ M e $3,10 \times 10^{-4}$ M, enquanto a Fig. 5.10 mostra a curva do logaritmo da altura de pico em função do logaritmo da concentração de hipoclorito. Pode-se verificar que existe uma relação linear na gama de valores de concentração de hipoclorito entre $6,2 \times 10^{-6}$ e $6,2 \times 10^{-5}$ M, com um coeficiente de correlação de 0,995, e os valores do declive e da intercepção da recta de regressão são respectivamente de -1,285 e de 12,635.

A partir do desvio padrão da linha de base do sistema obteve-se um limite de detecção (LD) de cerca de 5×10^{-8} M, calculado como três vezes o referido valor.

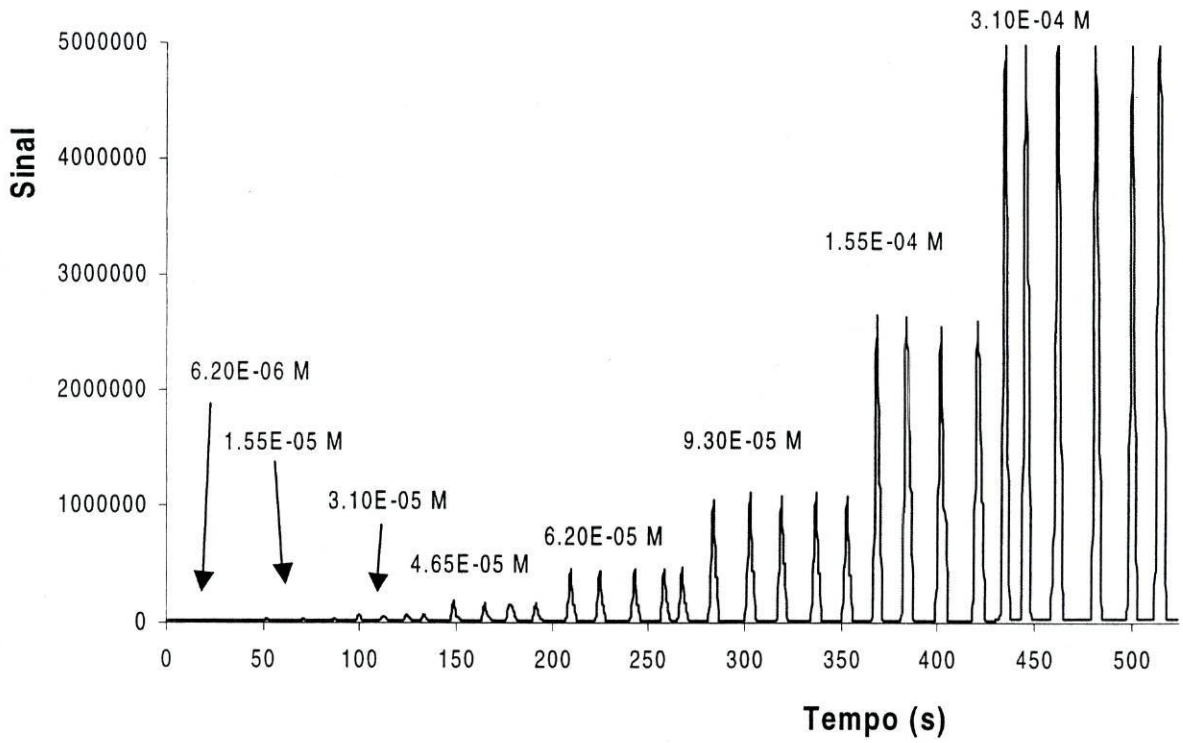


Fig. 5.9 - Representação de uma sequência de calibração típica para o sistema de análise de hipoclorito na presença de CPC.

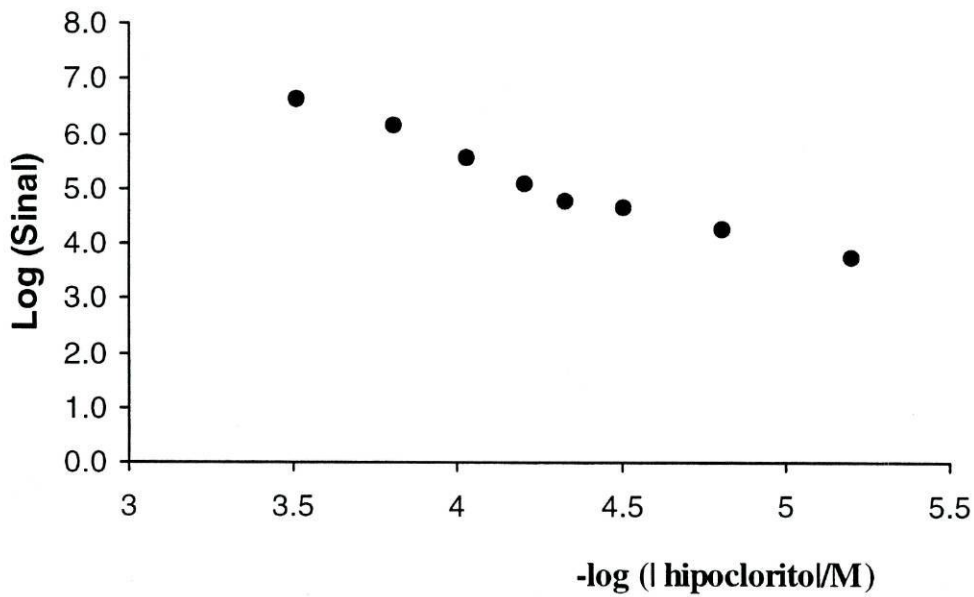


Fig. 5.10 - Representação do logaritmo da altura de pico em função do logaritmo da concentração de rodamina 6G.

5.3 – CONCLUSÕES

O sistema quimioluminescente para detecção e análise de cloro livre baseado na oxidação da rodamina 6G pelo hipoclorito em meio micelar foi implementado e otimizado com sucesso.

As características de resposta do sistema atribuem-lhe o potencial para a sua incorporação em procedimentos de detecção rápida, particularmente apropriados para ser incluído em instrumentos portáteis.

Este sistema é particularmente simples e económico. De facto, como é baseado num sistema de fluxo invertido (o reagente de desenvolvimento da quimioluminescência é injectado no transportador, que é a amostra), a quantidade de reagentes gasto em cada análise é muito pequena. De uma maneira geral a quantidade de amostras de água tratada, como por exemplo água potável ou águas residuais, não constitui uma limitação pelo que o sistema de fluxo invertido é a solução apropriada.

5.4 – BIBLIOGRAFIA

1. Metcalf & Eddy, Inc., Wastewater Engineering - Treatment, Disposal and Reuse, McGraw-Hill International Editions, Civil Engineering Series, 1991, pp. 324-344.
2. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 16 Ed., American Public Health Association, Washington DC, 1985, p.294.
3. M. Trojanowicz, W.Matuszewski, A. Hulanicki, Anal. Chim. Acta, **136**, 85(1982).
4. T. Aoki, M. Munemori, Anal. Chem., **55**, 209 (1983).
5. A.N. Tsaousis, C.O. Huber, Anal. Chim. Acta, **178**, 319 (1985).
6. M. Zenki, H. Komatsubara, K. Toei, Anal. Chim. Acta, **208**, 317 (1988).
7. H.Ge, G.G. Wallace, R.A. O'Halloran, Anal. Chim. Acta, **237**, 149 (1990).
8. D.F. Marino, J.D. Ingle, Anal. Chim. Acta, **123**, 247 (1981) 247.
9. D.F. Marino, J.D. Ingle, Anal. Chem, **53**, 455 (1981) 455.
10. M. Yamada, T.Hobo, S. Suzuki, Anal. Letters, **21**, 1887 (1988).
11. J.R. Gord, G. Gordon, G.E. Pacey, Anal. Chem., **60**, 2 (1988).
12. T. Nakagama, M. Yamada, T.Hobo, Analyst, **114**, 1275 (1989).
13. T. Nakagama, M. Yamada, T.Hobo, Anal. Chim. Acta, **231**, 7 (1990).
14. G.P. Irons, G.M. Greenway, Analyst, **120**, 477 (1995).
15. S.N.Deming e S.L.Morgan, Experimental design: A chemometric approach, 2 Ed., Elsevier, Amsterdam, 1993.

6 – SISTEMA DE ANÁLISE DE ANIÃO BROMATO

6.1 –INTRODUÇÃO

O anião bromato aparece na água potável como produto secundário da desinfecção com ozono [1]. Devido à toxicidade do ião bromato, que foi classificado como potencialmente carcinogénico [1-4], os níveis deste ião na água depurada com ozono devem ser monitorizados. Os valores máximos admissíveis de bromato na água para consumo humano variam entre 10 µg/L (directiva europeia e americana) e 25 µg/L (directivas da Organização Mundial de Saúde, OMS) [3,4]. As preocupações sobre o impacto deste ião na saúde humana têm originado a procura e o desenvolvimento de novas tecnologias para a sua eliminação [2-4]. Consequentemente são necessários métodos analíticos com limites de detecção na ordem dos ppb para a sua monitorização o que é facilmente implementado se estivermos na presença de um método sensível, rápido e com baixos custos de aquisição e manutenção.

Os métodos existentes para a detecção de bromato em água potável estão restringidos à cromatografia iónica [5-10], cromatografia gasosa [11] e espectroscopia de massa [12]. Embora alguns destes métodos permitam detectar o bromato em quantidades perto do décimo de ppb geralmente exigem grandes tempos de análise por amostra e têm que ser realizados em laboratórios com custos elevados de funcionamento. No caso da cromatografia iónica, para que se atingirem limites de detecção baixos [5], o processo de separação na coluna é seguido de uma reacção do ião bromato (na maioria das vezes com cloropromazina [13]) o que inevitavelmente torna o processo de análise mais complexo.

Na pesquisa de novos métodos, verificou-se que a oxidação em meio ácido do sulfito pelo bromato na presença de esteróides, que agem como amplificadores, produz luminescência suficiente para se desenvolver um método para a detecção de bromato [14]. Na verdade os sistemas quimioluminescentes possuem propriedades que fazem deles métodos muito atractivos em processos de monitorização [15,16] das quais se destacam: fácil implementação em equipamentos portáteis, permitindo efectuar análises em campo, com baixo custo de operação, com grande sensibilidade e com elevada frequência de análise.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver um método expedito de análise do bromato em água baseado na reacção em meio ácido entre o ião bromato e o sulfito, na presença de hidrocortisona. Para o efeito foi montado um sistema de fluxo (ver Fig. 3.5) e a sua optimização foi efectuada por análise factorial, considerando os seguintes factores experimentais: caudal da solução indicadora (sulfito, hidrocortisona e ácido sulfúrico) (Q_1), concentração de sulfito (C_S), concentração de hidrocortisona (C_H) e concentração de ácido (C_A), caudal do fluxo de água (Q_2), volume de injeção (V_i) e volume do reactor (V_L). A função de resposta considerada para a optimização foi a altura de pico. Dado o número relativamente elevado de factores experimentais (sete factores) a estudar, a primeira etapa da estratégia de optimização consistiu em efectuar um “*screening*” dos factores utilizando um planeamento experimental de Plackett-Burman. Seguidamente, considerando apenas os factores com maior influencia na altura de pico, foram realizadas experiências planeadas segundo três desenhos factoriais completos. A análise dos resultados obtidos permitiu otimizar a resposta do sistema. Por último, foram avaliadas as características de resposta do sistema ao ião bromato e a selectividade do método desenvolvido foi investigada.

6.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 - Estudo prévio do sistema

O número de factores potencialmente importantes para o sistema estudado, que se encontra esquematizado na Fig. 3.5, é sete. Na Tabela 6.1 encontra-se a lista desses factores e as respectivas abreviaturas utilizadas para os referir ao longo do texto. Devido ao elevado numero de factores apresentado recorreu-se ao planeamento experimental de Plackett-Burman que permite o estudo de 7 variáveis a 2 níveis.

Tabela 6.1 - Factores estudados e suas abreviaturas.

| Factor | Abreviatura |
|---------------------------------|-------------|
| Caudal da solução indicadora | Q_1 |
| Caudal do fluxo de água | Q_2 |
| Volume de injeção | V_i |
| Volume do reactor | V_L |
| Concentração de sulfito | C_S |
| Concentração de hidrocortisona | C_H |
| Concentração de ácido sulfúrico | C_A |

A sequência de experiências foi repetida para duas concentrações de bromato ($4,97 \times 10^{-5}$ e $4,97 \times 10^{-4}$ M). Nas Tabelas 6.2 e 6.3 encontram-se respectivamente a matriz do planeamento de Plackett-Burman utilizado e os valores a que correspondem os níveis dos factores experimentais da Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Matriz do planeamento de experiências de Plackett-Burman com sete factores a dois níveis representados pelos algarismos (0) e (1).

| Experiência | Factores | | | | | | |
|-------------|----------|---|---|---|---|---|---|
| | a | b | c | d | e | f | g |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 7 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 6.3- Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planeamento da Tabela 6.2.

| Factores | Unidades | Níveis | |
|----------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| | | 0 | 1 |
| Q ₁ | mL/min | 2,5 | 4,5 |
| Q ₂ | mL/min | 3,0 | 5,0 |
| V _i | μL | 236 | 387 |
| V _L | μL | 140 | 195 |
| C _S | M | 5,00 x 10 ⁻³ | 5,00 x 10 ⁻⁴ |
| C _H | M | 7,53 x 10 ⁻⁶ | 5,57 x 10 ⁻⁵ |
| C _A | M | 0,1878 | 0,3756 |

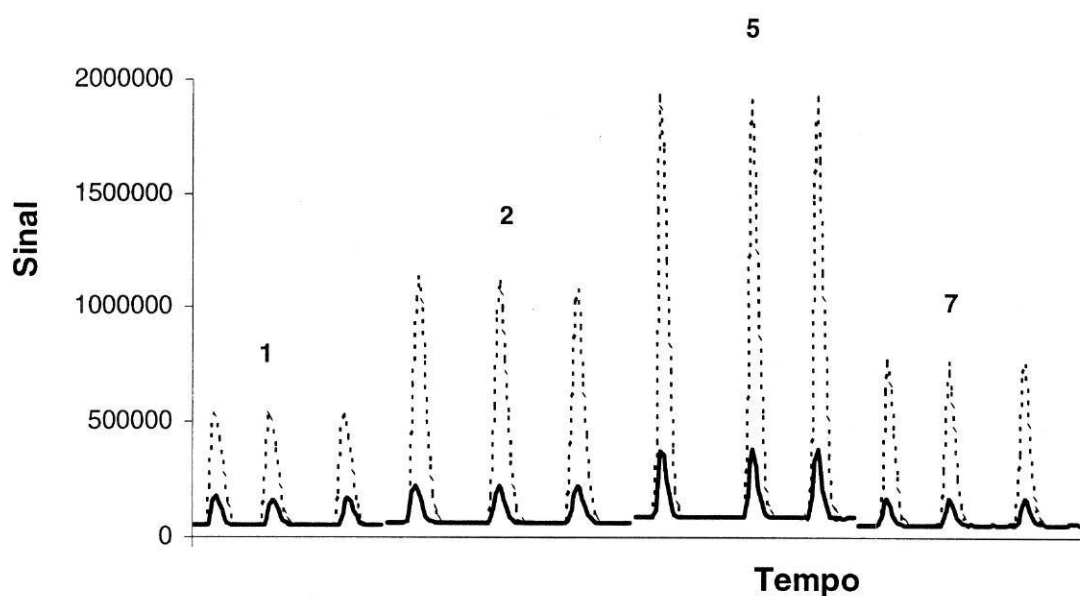


Fig. 6.1 - Resposta do sistema às variações impostas, para as duas concentrações de bromato: $4,97 \times 10^{-4}$ (----) e $4,97 \times 10^{-5}$ M (—).

Na Figura 6.1. encontram-se alguns diagramas obtidos na realização destas experiências. Nas Tabelas 6.4 e 6.5 encontram-se resumidos os valores da altura de pico obtidos nas experiências ao injectar respectivamente soluções de bromato $4,97 \times 10^{-5}$ e $4,97 \times 10^{-4}$ M

Tabela 6.4 – Resultados obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman com sete factores a dois níveis, ao injectar solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-5}$ M.

| Experiência | Altura do pico | | |
|-------------|----------------|--------|--------|
| | 1º | 2º | 3º |
| 1 | 122739 | 110503 | 119883 |
| 2 | 158706 | 156718 | 158714 |
| 3 | 78797 | 77925 | 77157 |
| 4 | 128857 | 131049 | 129801 |
| 5 | 286338 | 294506 | 296042 |
| 6 | 191174 | 198978 | 192082 |
| 7 | 107459 | 112043 | 115835 |
| 8 | 106983 | 104647 | 105111 |

Tabela 6.5 – Resultados obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman com sete factores a dois níveis, ao injectar solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-4}$ M.

| Experiência | Altura do pico | | |
|-------------|----------------|----------|---------|
| | 1° | 2° | 3° |
| 1 | 470421 | 466133 | 468561 |
| 2 | 1073881 | 1049641 | 1016701 |
| 3 | 169312 | 167320 | 170248 |
| 4 | 994962 | 10755358 | 1078914 |
| 5 | 1849995 | 1722507 | 1840259 |
| 6 | 1444819 | 1452443 | 1439103 |
| 7 | 708146 | 703282 | 716322 |
| 8 | 688972 | 689676 | 631988 |

O tratamento dos dados foi efectuado para os sinais obtidos com as duas concentrações de bromato (Tabelas 6.6 e 6.7) e também para a diferença existente entre eles (Tabela 6.8). A análise das Tabelas 6.6 a 6.8 mostra que os factores C_H e V_r são os que possuem maior valor de razão F nos três estudos de ANOVA. Da análise dos coeficientes correspondentes ao modelo linear (coeficientes beta nas Tabelas 6.6, 6.7, 6.8) podemos verificar que o aumento da concentração de hidrocortisona provoca um aumento no sinal quimioluminescente enquanto que o volume do reactor provoca um efeito contrário. Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado uma vez que, o efeito amplificador aumenta com o incremento da concentração da espécie amplificadora, a hidrocortisona. Por outro lado, o aumento do volume do reactor provoca uma maior dispersão da zona da amostra no sistema de fluxo o que provoca a diminuição do máximo do sinal quimioluminescente. Pode acontecer também que a reacção termine antecipadamente, não coincidindo com o momento de detecção quando o volume do reactor aumenta.

Uma análise detalhada dos resultados para os outros factores mostra que o volume de injeção tem um efeito relativamente grande na resposta do sistema para a solução $4,97 \times 10^{-4}$ M de ião bromato (Tabela 6.7) e na sensibilidade (diferença entre o sinal de resposta obtido para os dois níveis utilizados) (Tabela 6.8). Verifica-se também que para a concentração mais baixa de ião bromato os factores Q_2 e C_A têm uma

Tabela 6.6 - ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planejamento de Plackett-Burman para a solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-5}$ M.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _B |
|--------------------|------------------------|----|------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Modelo | $9,69 \times 10^{10}$ | 7 | $1,385 \times 10^{10}$ | $1,019 \times 10^3$ | | |
| Erro | $2,174 \times 10^8$ | 16 | $1,359 \times 10^7$ | | | |
| Total ajustado | $9,714 \times 10^{10}$ | 23 | $4,223 \times 10^9$ | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | $5,287 \times 10^{11}$ | 1 | $5,287 \times 10^{11}$ | $3,890 \times 10^4$ | $1,48 \times 10^5$ | 752,508 |
| Q ₁ (A) | $2,425 \times 10^9$ | 1 | $2,425 \times 10^9$ | 178,426 | $-2,01 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |
| Q ₂ (B) | $1,113 \times 10^{10}$ | 1 | $1,113 \times 10^{10}$ | 819,238 | $4,31 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |
| V _i (C) | $3,158 \times 10^9$ | 1 | $3,158 \times 10^9$ | 232,355 | $-2,29 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |
| V _r (D) | $2,018 \times 10^{10}$ | 1 | $2,018 \times 10^{10}$ | $1,485 \times 10^3$ | $-5,80 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |
| C _S (E) | $8,778 \times 10^8$ | 1 | $8,778 \times 10^8$ | 64,591 | $1,21 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |
| C _H (F) | $4,895 \times 10^{10}$ | 1 | $4,895 \times 10^{10}$ | $3,602 \times 10^3$ | $9,03 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |
| C _A (G) | $1,019 \times 10^{10}$ | 1 | $1,019 \times 10^{10}$ | 750,079 | $4,12 \times 10^4$ | $1,51 \times 10^3$ |

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; F – razão de Fisher; b – coeficientes de regressão; DP_B – desvio padrão de b.

Tabela 6.7 - ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planejamento de Plackett-Burman para a solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-4}$ M*.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _B |
|--------------------|------------------------|----|------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|
| Modelo | $5,897 \times 10^{12}$ | 7 | $8,425 \times 10^{11}$ | | | |
| Erro | $1,861 \times 10^{10}$ | 16 | $1,163 \times 10^9$ | 724,362 | | |
| Total ajustado | $5,916 \times 10^{12}$ | 23 | $2,572 \times 10^{11}$ | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | $2,033 \times 10^{13}$ | 1 | $2,033 \times 10^{13}$ | $1,748 \times 10^4$ | $9,20 \times 10^5$ | $6,96 \times 10^3$ |
| Q ₁ (A) | $1,128 \times 10^8$ | 1 | $1,128 \times 10^8$ | $9,701 \times 10^{-2}$ | $-4,34 \times 10^3$ | $1,39 \times 10^4$ |
| Q ₂ (B) | $1,807 \times 10^{11}$ | 1 | $1,807 \times 10^{11}$ | 155,404 | $1,74 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^4$ |
| V _i (C) | $4,570 \times 10^{11}$ | 1 | $4,570 \times 10^{11}$ | 392,937 | $-2,76 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^4$ |
| V _r (D) | $7,493 \times 10^{11}$ | 1 | $7,493 \times 10^{11}$ | 644,301 | $-3,53 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^4$ |
| C _S (E) | $5,424 \times 10^{10}$ | 1 | $5,424 \times 10^{10}$ | 46,640 | $-9,51 \times 10^4$ | $1,39 \times 10^4$ |
| C _H (F) | $4,157 \times 10^{12}$ | 1 | $4,157 \times 10^{12}$ | $3,574 \times 10^3$ | $8,32 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^4$ |
| C _A (G) | $2,989 \times 10^{11}$ | 1 | $2,898 \times 10^{11}$ | 257,036 | $2,23 \times 10^5$ | $1,39 \times 10^4$ |

* Ver rodapé da Tabela 6.6.

Tabela 6.8 - ANOVA da diferença dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman *.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _B |
|--------------------|-----------------------|----|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Modelo | 4,58x10 ¹² | 7 | 6,55x10 ¹¹ | 550,099 | | |
| Erro | 1,90x10 ¹⁰ | 16 | 1,19x10 ⁹ | | | |
| Total ajustado | 4,60x10 ¹² | 23 | 2,00x10 ¹¹ | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | 1,43x10 ¹³ | 1 | 1,43x10 ¹³ | 1,20x10 ⁴ | 7,72x10 ⁵ | 7,04x10 ³ |
| Q ₁ (A) | 1,49x10 ⁹ | 1 | 1,49x10 ⁹ | 1,250 | 1,58x10 ⁴ | 1,41x10 ⁴ |
| Q ₂ (B) | 1,02x10 ¹¹ | 1 | 1,02x10 ¹¹ | 85,839 | 1,31x10 ⁵ | 1,41x10 ⁴ |
| V _i (C) | 3,84x10 ¹¹ | 1 | 3,84x10 ¹¹ | 322,816 | -2,53x10 ⁵ | 1,41x10 ⁴ |
| V _L (D) | 5,24x10 ¹¹ | 1 | 5,24x10 ¹¹ | 439,953 | -2,95x10 ⁵ | 1,41x10 ⁴ |
| C _S (E) | 6,89x10 ¹⁰ | 1 | 6,89x10 ¹⁰ | 57,913 | -1,07x10 ⁵ | 1,41x10 ⁴ |
| C _H (F) | 3,30x10 ¹² | 1 | 3,30x10 ¹² | 2,78x10 ³ | 7,42x10 ⁵ | 1,41x10 ⁴ |
| C _A (G) | 1,99x10 ¹¹ | 1 | 1,99x10 ¹¹ | 166,987 | 1,82x10 ⁵ | 1,41x10 ⁴ |

* Ver rodapé da Tabela 6.6.

importância que não é observada para concentrações mais elevadas de bromato, nem para a sensibilidade (Tabela 6.7 e 6.8). Por esta razão estes dois factores não foram considerados no subsequente processo de análise e passaram a factores fixos com os valores que originavam o maior sinal de resposta (Q₂ = 5,0 ml/min.; C_A = 0,38 M). Da mesma forma, no resto do estudo efectuado, os níveis dos factores Q₁ e C_S passaram aos seguintes valores fixos: Q₁ = 2,5 ml/min.; C_S = 1,0 mM.

Em conclusão, depois de analisados os dados obtidos nas experiências deste estudo prévio do sistema verificou-se que os factores com maior efeito na resposta do sistema são apenas três, designadamente: o volume do reactor (V_L), o volume de injeção (V_i) e a concentração de hidrocortisona (C_H).

6.2.2 – Estudo dos factores mais significativos

Para se obter mais informação sobre o efeito dos factores V_L , V_i e C_H na resposta do sistema foi utilizado um planeamento factorial completo, com três níveis para cada factor, cuja matriz do planeamento se encontra na Tabela 6.9. O intervalo dos valores experimentais dos três factores foi ajustado em função dos resultados obtidos nos estudos preliminares. Com efeito, os valores experimentais correspondentes aos níveis indicados na Tabela 6.9 que se encontram na Tabela 6.10, mostram que a concentração de hidrocortisona (C_H) aumentou e que o volume do reactor (V_L) e o volume de injeção (V_i) diminuíram. As experiências deste planeamento foram efectuadas para três níveis de concentração de ião bromato ($5,0 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ M), e os valores da altura de pico obtidos encontram-se resumidos nas Tabelas 6.11 a 6.13.

Nas Tabelas 6.14, 6.15 e 6.16 estão resumidos os resultados da ANOVA dos resultados das experiências para os três níveis de concentração de ião bromato usados. Estas tabelas também incluem os coeficientes beta e o correspondente desvio padrão resultantes do ajuste da resposta do sistema a um modelo linear.

Tabela 6.9- Matriz do planejamento de experiências factorial completo com três factores e três níveis representados pelos algarismos (-1), (0) e (1).

| Experiência | Factores | | |
|-------------|----------|----|----|
| | a | b | c |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 0 | -1 | -1 |
| 3 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | -1 | 0 | -1 |
| 5 | 0 | 0 | -1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | -1 |
| 8 | 0 | 1 | -1 |
| 9 | 1 | 1 | -1 |
| 10 | -1 | -1 | 0 |
| 11 | 0 | -1 | 0 |
| 12 | 1 | -1 | 0 |
| 13 | -1 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 1 | 0 | 0 |
| 16 | -1 | 1 | 0 |
| 17 | 0 | 1 | 0 |
| 18 | 1 | 1 | 0 |
| 19 | -1 | -1 | 1 |
| 20 | 0 | -1 | 1 |
| 21 | 1 | -1 | 1 |
| 22 | -1 | 0 | 1 |
| 23 | 0 | 0 | 1 |
| 24 | 1 | 0 | 1 |
| 25 | -1 | 1 | 1 |
| 26 | 0 | 1 | 1 |
| 27 | 1 | 1 | 1 |

Tabela 6.10 - Factores experimentais e valores a que correspondem os factores fixos e os níveis no planeamento da Tabela 6.9.

| Factores | Unidades | Níveis | | |
|-----------------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | -1 | 0 | 1 |
| V _L | μL | 125 | 180 | 236 |
| V _i | μL | 70 | 105 | 141 |
| C _H | M | 3,31x10 ⁻⁵ | 1,08x10 ⁻⁴ | 7,26x10 ⁻⁴ |
| Factores fixos | | | | |
| Q ₁ | ml/min | | 2,5 | |
| Q ₂ | ml/min | | 5,0 | |
| C _S | M | | 1,04x10 ⁻³ | |
| C _A | M | | 0,3756 | |

Tabela 6.11- Resultados obtidos nas experiências do planeamento de factorial com três factores a três níveis, ao injectar solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-6}$ M.

| Experiência | Altura do pico | | |
|-------------|----------------|-------|-------|
| | 1º | 2º | 3 |
| 1 | 13611 | 13803 | 14503 |
| 2 | 18386 | 17246 | 17170 |
| 3 | 8655 | 8791 | 8535 |
| 4 | 16800 | 15332 | 15688 |
| 5 | 17501 | 16857 | 17385 |
| 6 | 9393 | 9285 | 9405 |
| 7 | 16824 | 16724 | 17628 |
| 8 | 16264 | 16064 | 15136 |
| 9 | 10180 | 10244 | 10624 |
| 10 | 25783 | 24559 | 26347 |
| 11 | 19738 | 19714 | 20186 |
| 12 | 15870 | 15850 | 15666 |
| 13 | 21542 | 20922 | 21226 |
| 14 | 22671 | 23359 | 23771 |
| 15 | 12295 | 13051 | 12083 |
| 16 | 23043 | 23879 | 23043 |
| 17 | 16668 | 16556 | 16760 |
| 18 | 14243 | 14407 | 14183 |
| 19 | 27895 | 26223 | 27451 |
| 20 | 28563 | 27575 | 28203 |
| 21 | 19807 | 17911 | 18967 |
| 22 | 30889 | 30409 | 30489 |
| 23 | 28975 | 27499 | 26751 |
| 24 | 17380 | 17736 | 17300 |
| 25 | 27198 | 26994 | 29505 |
| 26 | 30099 | 31163 | 31299 |
| 27 | 20324 | 20904 | 20604 |

Tabela 6.12 - Resultados obtidos nas experiências do planejamento de factorial com três factores a três níveis, ao injectar solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-5}$ M

| Experiência | Altura do pico | | |
|-------------|----------------|--------|--------|
| | 1° | 2° | 3 |
| 1 | 160311 | 149223 | 152431 |
| 2 | 166726 | 173878 | 176282 |
| 3 | 109799 | 112967 | 115791 |
| 4 | 151028 | 154444 | 150088 |
| 5 | 165657 | 170465 | 169097 |
| 6 | 110657 | 113293 | 113561 |
| 7 | 167948 | 170420 | 166320 |
| 8 | 156548 | 157772 | 155480 |
| 9 | 115616 | 117792 | 121168 |
| 10 | 230583 | 246147 | 227155 |
| 11 | 202634 | 209686 | 201218 |
| 12 | 179978 | 182114 | 170978 |
| 13 | 201410 | 204114 | 194818 |
| 14 | 223671 | 227051 | 222771 |
| 15 | 146939 | 136439 | 131291 |
| 16 | 227879 | 230143 | 217023 |
| 17 | 205524 | 200916 | 206428 |
| 18 | 167567 | 166043 | 166879 |
| 19 | 273499 | 267931 | 274063 |
| 20 | 268723 | 270775 | 275995 |
| 21 | 217719 | 222551 | 214427 |
| 22 | 258145 | 281909 | 286461 |
| 23 | 274311 | 277143 | 275499 |
| 24 | 197560 | 187180 | 198208 |
| 25 | 278741 | 267889 | 260873 |
| 26 | 282091 | 291079 | 278631 |
| 27 | 223048 | 221524 | 215788 |

Tabela 6.13- Resultados obtidos nas experiências do planeamento de factorial com três factores a três níveis, ao injectar solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-4}$ M

| Experiência | Altura do pico | | |
|-------------|----------------|---------|---------|
| | 1º | 2º | 3 |
| 1 | 1276335 | 1273499 | 1247963 |
| 2 | 1539150 | 1467550 | 1539498 |
| 3 | 1106919 | 1094891 | 1120751 |
| 4 | 1266996 | 1216172 | 1281780 |
| 5 | 1440953 | 1482961 | 1503093 |
| 6 | 1126513 | 1132405 | 1130885 |
| 7 | 1321300 | 1317312 | 1298636 |
| 8 | 1299324 | 1286528 | 1370228 |
| 9 | 1154168 | 1172564 | 1190520 |
| 10 | 1899063 | 1851131 | 1875775 |
| 11 | 1775478 | 1723938 | 1812394 |
| 12 | 1729758 | 1623290 | 1563326 |
| 13 | 1536476 | 1574826 | 1546758 |
| 14 | 1875739 | 1781575 | 1881987 |
| 15 | 1516391 | 1470875 | 1463571 |
| 16 | 1638939 | 1635031 | 1643907 |
| 17 | 1756780 | 1717788 | 1765528 |
| 18 | 1567951 | 1533671 | 1545779 |
| 19 | 2038339 | 2025203 | 1964087 |
| 20 | 2304999 | 2215279 | 2240815 |
| 21 | 2102631 | 2033975 | 1916979 |
| 22 | 2041113 | 2055453 | 1995993 |
| 23 | 2178131 | 2260851 | 2095075 |
| 24 | 1872520 | 1825428 | 1776592 |
| 25 | 1883653 | 1843409 | 1772693 |
| 26 | 2345827 | 2372235 | 2247071 |
| 27 | 2027328 | 2012400 | 2050724 |

Tabela 6.14 – ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial para a solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-6}$ M *.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _B |
|---------------------------------|--------------------|----|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|
| Modelo | $2,97 \times 10^9$ | 9 | $3,30 \times 10^8$ | 89,621 | | |
| Erro | $2,62 \times 10^8$ | 71 | $3,69 \times 10^6$ | | | |
| Total ajustado | $3,24 \times 10^9$ | 80 | $4,04 \times 10^7$ | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | $5,33 \times 10^9$ | 1 | $5,33 \times 10^9$ | $1,45 \times 10^3$ | $2,15 \times 10^4$ | 564,439 |
| C _H | $9,34 \times 10^8$ | 1 | $9,34 \times 10^8$ | 253,437 | $-4,16 \times 10^3$ | 261,284 |
| V _L | $2,34 \times 10^5$ | 1 | $2,34 \times 10^5$ | $6,34 \times 10^{-2}$ | 65,778 | 261,284 |
| V _i | $1,78 \times 10^9$ | 1 | $1,78 \times 10^9$ | 482,981 | $5,74 \times 10^3$ | 261,284 |
| C _H x V _L | $2,77 \times 10^4$ | 1 | $2,77 \times 10^4$ | $7,51 \times 10^{-3}$ | 18,713 | 216,005 |
| C _H x V _i | $2,55 \times 10^7$ | 1 | $2,55 \times 10^7$ | 6,926 | -568,481 | 216,005 |
| V _L x V _i | $1,18 \times 10^6$ | 1 | $1,18 \times 10^6$ | 0,319 | 122,006 | 216,005 |
| C _H x C _H | $2,26 \times 10^8$ | 1 | $2,26 \times 10^8$ | 61,158 | $-2,39 \times 10^3$ | 305,477 |
| V _L x V _L | $1,92 \times 10^5$ | 1 | $1,92 \times 10^5$ | $5,21 \times 10^{-2}$ | 69,75 | 305,477 |
| V _i x V _i | $6,05 \times 10^6$ | 1 | $6,05 \times 10^6$ | 1,642 | 391,463 | 305,477 |
| Verificação do modelo | | | | | | |
| Efeitos principais | $2,72 \times 10^9$ | 3 | $9,05 \times 10^8$ | | | |
| Interacções (Int) | $2,67 \times 10^7$ | 3 | $8,91 \times 10^6$ | 2,418 | 0,0734 | 0,0734 |
| Int+Termos quadráticos | $2,32 \times 10^8$ | 3 | $7,72 \times 10^7$ | 20,951 | | |
| Termos quadráticos | $2,32 \times 10^8$ | 3 | $7,72 \times 10^7$ | 20,951 | | |
| Erro | $2,62 \times 10^8$ | 71 | $3,69 \times 10^6$ | | | |
| Falta de ajuste (LOF) | | | | | | |
| LOF | $2,42 \times 10^8$ | 17 | $1,43 \times 10^7$ | 39,775 | | |
| Erro puro | $1,94 \times 10^7$ | 54 | $3,59 \times 10^5$ | | | |
| Erro total | $2,62 \times 10^8$ | 71 | $3,69 \times 10^6$ | | | |

* Ver rodapé da Tabela 6.6.

Tabela 6.15 – ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial para a solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}^*$.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _B |
|---------------------------------|-----------------------|----|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| Modelo | $2,97 \times 10^9$ | 9 | $3,30 \times 10^8$ | 89,621 | | |
| Erro | $2,62 \times 10^8$ | 71 | $3,69 \times 10^6$ | | | |
| Total ajustado | $3,24 \times 10^9$ | 80 | $4,04 \times 10^7$ | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | $5,15 \times 10^{11}$ | 1 | $5,15 \times 10^{11}$ | $4,09 \times 10^3$ | $2,11 \times 10^5$ | $3,30 \times 10^3$ |
| C _H | $4,02 \times 10^{10}$ | 1 | $4,02 \times 10^{10}$ | 319,549 | $-2,73 \times 10^4$ | $1,53 \times 10^3$ |
| V _L | $5,01 \times 10^6$ | 1 | $5,01 \times 10^6$ | $3,98 \times 10^{-2}$ | -304,704 | $1,53 \times 10^3$ |
| V _i | $1,55 \times 10^{11}$ | 1 | $1,55 \times 10^{11}$ | $1,23 \times 10^3$ | $5,37 \times 10^4$ | $1,53 \times 10^3$ |
| C _H x V _L | $7,83 \times 10^6$ | 1 | $7,83 \times 10^6$ | $6,22 \times 10^{-2}$ | -314,85 | $1,26 \times 10^3$ |
| C _H x V _i | $7,11 \times 10^8$ | 1 | $7,11 \times 10^8$ | 5,642 | $-3,00 \times 10^3$ | $1,26 \times 10^3$ |
| V _L x V _i | $1,38 \times 10^7$ | 1 | $1,38 \times 10^7$ | 0,11 | 418,594 | $1,26 \times 10^3$ |
| C _H x C _H | $1,47 \times 10^{10}$ | 1 | $1,47 \times 10^{10}$ | 116,889 | $-1,93 \times 10^4$ | $1,79 \times 10^3$ |
| V _L x V _L | $1,22 \times 10^9$ | 1 | $1,22 \times 10^9$ | 9,68 | $5,55 \times 10^3$ | $1,79 \times 10^3$ |
| V _i x V _i | $1,07 \times 10^8$ | 1 | $1,07 \times 10^8$ | 0,851 | $1,65 \times 10^3$ | $1,79 \times 10^3$ |
| Verificação do modelo | | | | | | |
| Efeitos principais | $1,96 \times 10^{11}$ | 3 | $6,52 \times 10^{10}$ | | | |
| Interações (Int) | $7,32 \times 10^8$ | 3 | $2,44 \times 10^8$ | 1,938 | 0,1312 | 0,1312 |
| Int+Termos quadráticos | $1,61 \times 10^{10}$ | 3 | $5,35 \times 10^9$ | 42,472 | | |
| Termos quadráticos | $1,61 \times 10^{10}$ | 3 | $5,35 \times 10^9$ | 42,472 | | |
| Erro | $8,94 \times 10^9$ | 71 | $1,26 \times 10^8$ | | | |
| Falta de ajuste (LOF) | | | | | | |
| LOF | $7,24 \times 10^9$ | 17 | $4,26 \times 10^8$ | 13,483 | | |
| Erro puro | $1,71 \times 10^9$ | 54 | $3,16 \times 10^7$ | | | |
| Erro total | $8,94 \times 10^9$ | 71 | $1,26 \times 10^8$ | | | |

* Ver rodapé da Tabela 6.6.

Tabela 6.16 – ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial para a solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-4}$ M *.

| Sumário | SS | df | MS | F | b | DP _B |
|---------------------------------|-----------------------|----|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| Modelo | 9.26×10^{12} | 9 | 1.03×10^{12} | 138.417 | | |
| Erro | 5.28×10^{11} | 71 | 7.44×10^9 | | | |
| Total ajustado | 9.79×10^{12} | 80 | 1.22×10^{11} | | | |
| Variável | | | | | | |
| Intercepção | 3.75×10^3 | 1 | 3.75×10^{13} | 5.05×10^3 | 1.80×10^6 | 2.54×10^4 |
| C _H | 1.12×10^{11} | 1 | 1.12×10^{11} | 15.061 | -4.55×10^4 | 1.17×10^4 |
| V _L | 4.69×10^{10} | 1 | 4.69×10^{10} | 6.31 | -2.95×10^4 | 1.17×10^4 |
| V _i | 8.04×10^{12} | 1 | 8.04×10^{12} | 1.08×10^3 | 3.86×10^5 | 1.17×10^4 |
| C _H x V _L | 3.12×10^{10} | 1 | 3.12×10^{10} | 4.19 | 1.99×10^4 | 9.70×10^4 |
| C _H x V _i | 4.47×10^{10} | 1 | 4.47×10^{10} | 6.017 | 2.38×10^4 | 9.70×10^4 |
| V _L x V _i | 2.67×10^7 | 1 | 2.67×10^7 | 3.59×10^{-3} | -581.081 | 9.70×10^4 |
| C _H x C _H | 9.46×10^{11} | 1 | 9.46×10^{11} | 127.184 | -1.88×10^5 | 1.37×10^4 |
| V _L x V _L | 3.77×10^{10} | 1 | 3.77×10^{10} | 5.07 | 3.09×10^4 | 1.37×10^4 |
| V _i x V _i | 1.29×10^9 | 1 | 1.29×10^9 | 0.174 | -5.72×10^3 | 1.37×10^4 |
| Verificação do modelo | | | | | | |
| Efeitos principais | 8.20×10^{12} | 3 | 2.73×10^{12} | | | |
| Interacções (Int) | 7.59×10^{10} | 3 | 2.53×10^{10} | 3.404 | 0.0222 | 0.0222 |
| Int+Termos quadráticos | 9.85×10^{11} | 3 | 3.28×10^{11} | 44.144 | | |
| Termos quadráticos | 9.85×10^{11} | 3 | 3.28×10^{11} | 44.144 | | |
| Erro | 5.28×10^{11} | 71 | 7.44×10^9 | | | |
| Falta de ajuste (LOF) | | | | | | |
| LOF | 4.23×10^{11} | 17 | 2.49×10^{10} | 12.832 | | |
| Erro puro | 1.05×10^{11} | 54 | 1.94×10^9 | | | |
| Erro total | 5.28×10^{11} | 71 | 7.44×10^9 | | | |

* Ver rodapé da Tabela 6.6.

A análise dos resultados das Tabelas 6.14 a 6.16 mostra claramente que o volume do reactor (V_L) não tem influência sobre o sistema (valor de F entre 0,04 e 6). Por outro lado, o volume de injeção (V_i) tem um grande efeito (valor de F entre 480 e 1200) tal como a concentração de hidrocortisona (C_H) (valor de F entre 15 e 320) e os seus termos quadráticos (valor de F entre 62 e 127). Na verdade, para além da intercepção, os termos $C_H \times V_L$ e $C_H \times C_H$ são os únicos com peso estatístico. A falta de ajuste tem um valor de F relativamente alto (valor de F entre 13 e 40). Contudo este valor deverá estar provavelmente relacionado com a elevada precisão das medições experimentais e não com uma falta de ajuste ao modelo.

A Fig. 6.2 mostra a superfície de resposta em função dos dois factores com maior efeito na resposta, o volume do reactor e a concentração de hidrocortisona, para o nível de concentração de bromato intermédio ($5,0 \times 10^{-5}$ M). Através da observação desta figura podemos verificar que a resposta tem uma dependência quadrática em relação à concentração de hidrocortisona e que para $C_H = 6 \times 10^{-5}$ M (correspondente ao nível 0), o máximo de superfície de resposta corresponde ao máximo experimentalmente exequível de V_L . Na Tabela 6.17 estão resumidas as condições óptimas para o sistema investigado.

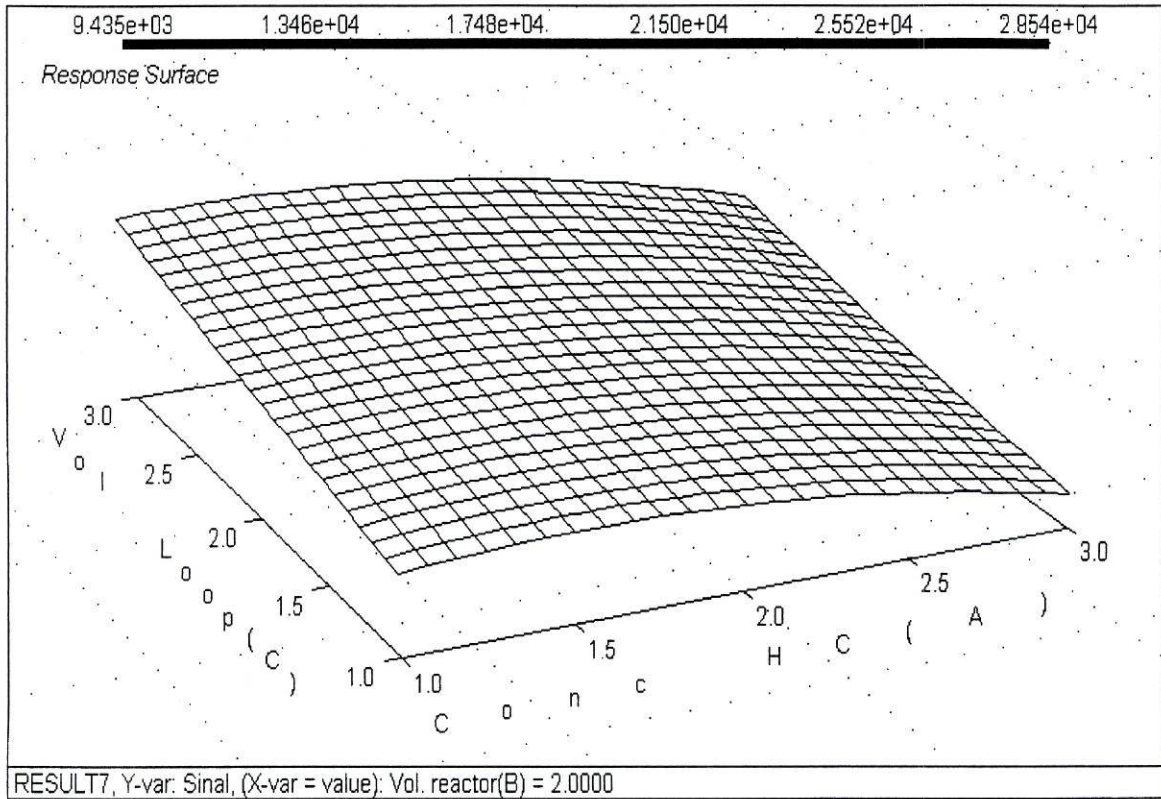


Fig. 6.2 – Superfície de resposta do sistema em função do volume de injeção e da concentração de hidrocortisona.

Tabela 6.17- Factores e respectivos níveis otimizados para o sistema.

| Factores | Unidades | Valores óptimos |
|----------|---------------|-----------------|
| V_L | μL | 180 |
| V_i | μL | 141 |
| C_H | mM | 0,060 |
| Q_1 | ml/min. | 2,5 |
| Q_2 | ml/min. | 5,0 |
| C_S | mM | 1,0 |
| C_A | M | 0,38 |

6.2.3 – Características de resposta do sistema otimizado

Na Fig. 6.3 está representada uma resposta típica de uma série de injeções no sistema para duas soluções de ião bromato ($9,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-4}$ M). A análise da precisão para o máximo de sinal dos dois conjuntos, mostra um desvio padrão do sinal quimioluminescente é de cerca de 2 % para a concentração mais alta e de 3 % para a mais baixa. Estes resultados mostram que o sistema otimizado possui uma boa precisão da resposta ao anião bromato.

A análise da resposta do sistema quimioluminescente permite verificar que esta é bastante rápida e conseguem-se obter velocidades de medição superiores a três amostras por minuto.

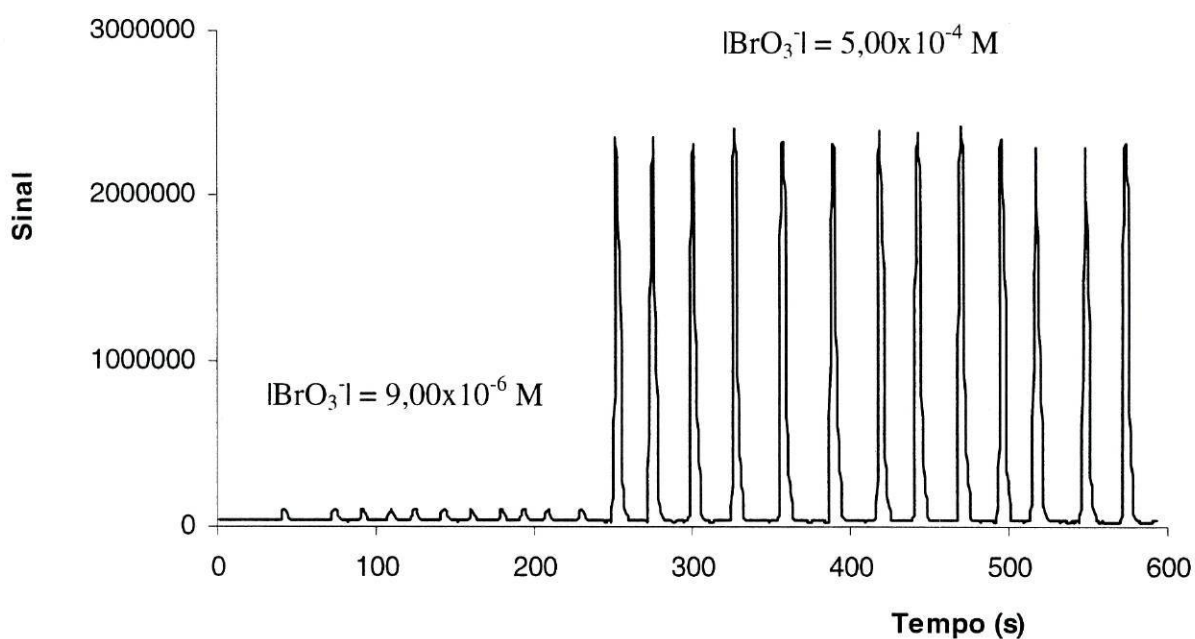


Fig. 6.3 - Representação de uma resposta típica de uma série de injeções no sistema.

Na Fig. 6.4 está representada uma sequência de calibração típica do sistema para concentrações de bromato num intervalo de $3,6 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M e na Fig. 6.5 está representada uma curva do logaritmo do sinal quimioluminescente em função do logaritmo da concentração de bromato. A observação desta curva de calibração mostra uma resposta linear em todo o intervalo de concentrações estudado, que abrange mais de três décadas de concentração com um declive de $-0,96$, intercepção de $9,6$ e um coeficiente de correlação de $0,998$.

A partir do desvio padrão do sinal da linha de base o limite de detecção (LD), calculado como três vezes esse sinal, foi obtido um $LD = 8,20 \times 10^{-8}$ M (equivalente a $11 \mu\text{g/l}$). Este valor de LD está dentro do nível máximo de contaminação da água potável para consumo humano, sendo comparável a limites de detecção atingidos pela cromatografia iônica com detecção condutimétrica.

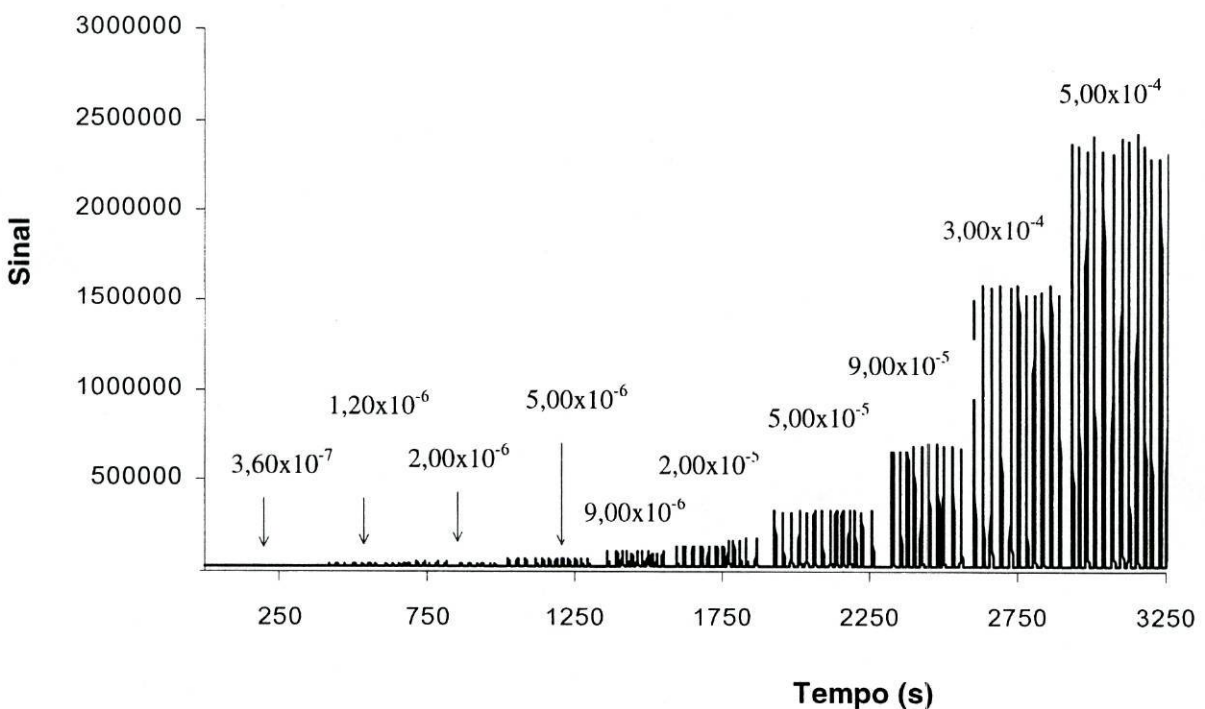


Fig. 6.4 - Representação de uma sequência de calibração típica.

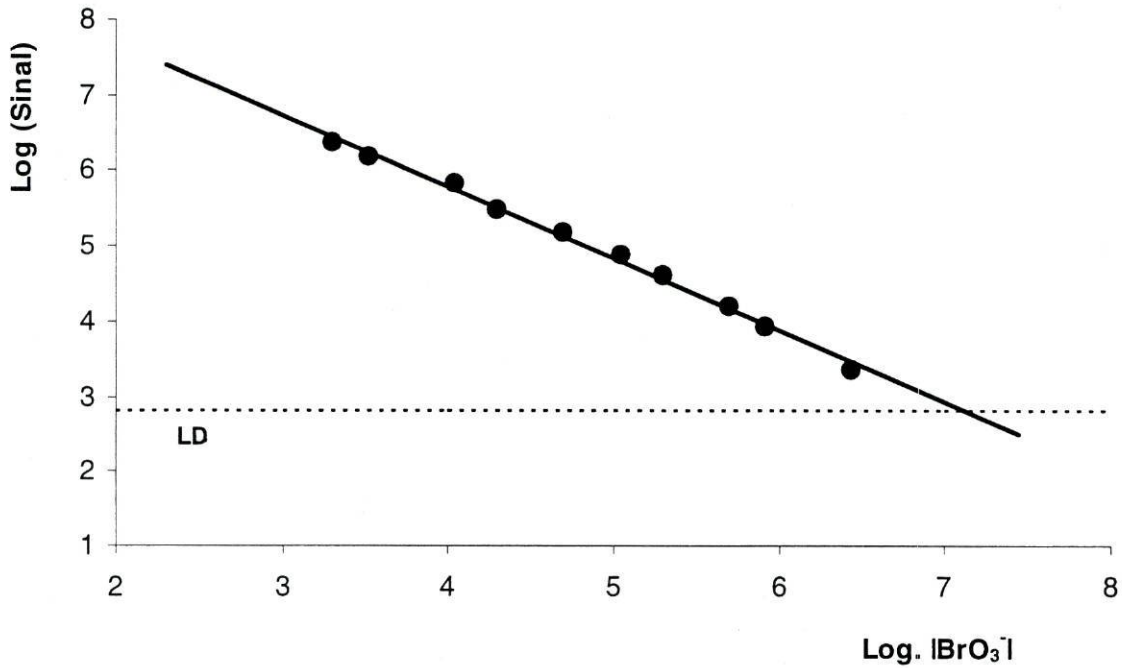


Fig. 6.5 – Representação da curva do logaritmo do sinal quimioluminescente como função do logaritmo da concentração de bromato.

6.2.4 – Características de selectividade da resposta do sistema

Neste estudo avaliaram-se possíveis efeitos no sinal quimioluminescente provocados por alguns interferentes químicos. Deste modo, foram preparadas soluções aquosas $5,00 \times 10^{-5}$ e $5,00 \times 10^{-6}$ M de bromato, contendo os iões cloreto, brometo, perclorato, nitrato, nitrito e fosfato ($1,00 \times 10^{-2}$ M de cada um dos iões). O sinal de quimioluminescência foi medido nestas soluções (Fig. 6.6) e comparado com o sinal obtido em soluções de anião bromato com a mesma concentração mas sem os iões eventualmente interferentes (coluna da Fig. 6.6 denominada de inicial).

A análise dos resultados obtidos (Fig. 6.6) revelou que os iões perclorato, nitrato, e fosfato não provocavam nenhum efeito na amplitude de sinal do sistema de

bromato. A presença dos íons brometo, cloreto e nitrito traduziu-se numa redução de sinal demonstrando a existência de interferência.

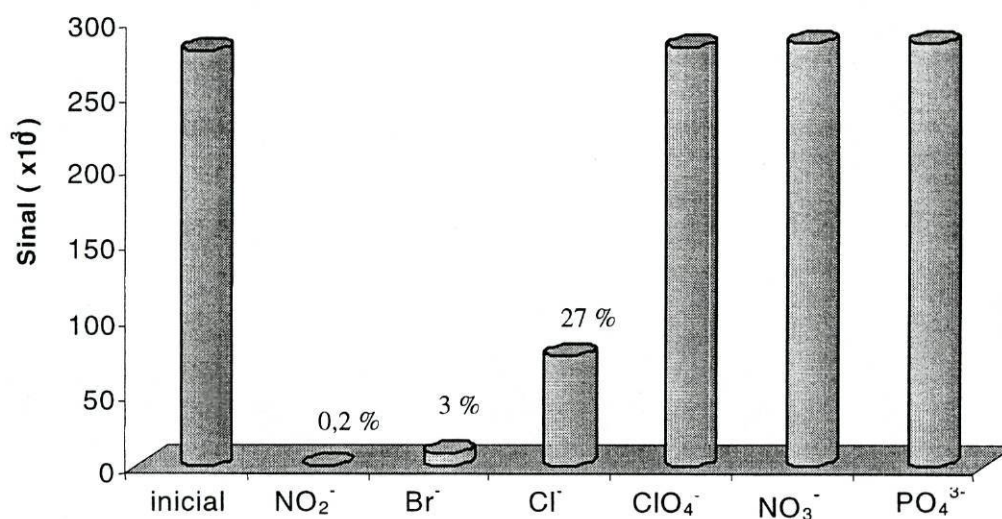


Fig. 6.6 – Interferência dos íons ($1,00 \times 10^{-2}$ M) no sinal do sistema para uma concentração de bromato de $5,00 \times 10^{-5}$ M.

Foi realizado um estudo mais detalhado do efeito no sinal quimioluminescente dos três íons interferentes. Partindo de uma solução $5,00 \times 10^{-5}$ M de bromato foram preparadas misturas com quantidades crescentes destes três íons ($5,00 \times 10^{-6}$ a $5,00 \times 10^{-3}$ M). A Fig.6.7 mostra a evolução do sinal obtido com a variação da concentração das espécies interferentes. Para o íon nitrito, o efeito negativo no sistema inicia-se para concentrações equimolares às do bromato, com uma redução de sinal perto dos 3 %. Contudo, acima desse valor o efeito provocado é de tal forma marcante que para concentrações na ordem dos $5,00 \times 10^{-4}$ M a redução chega a ser de 92 %. Este efeito está principalmente relacionado com a redução do nitrito pelo bromato, transformando-o em espécies químicas inertes. Os íons cloreto e brometo quando em concentrações 10 vezes superiores em relação ao bromato começam a reduzir o sinal de quimioluminescência.

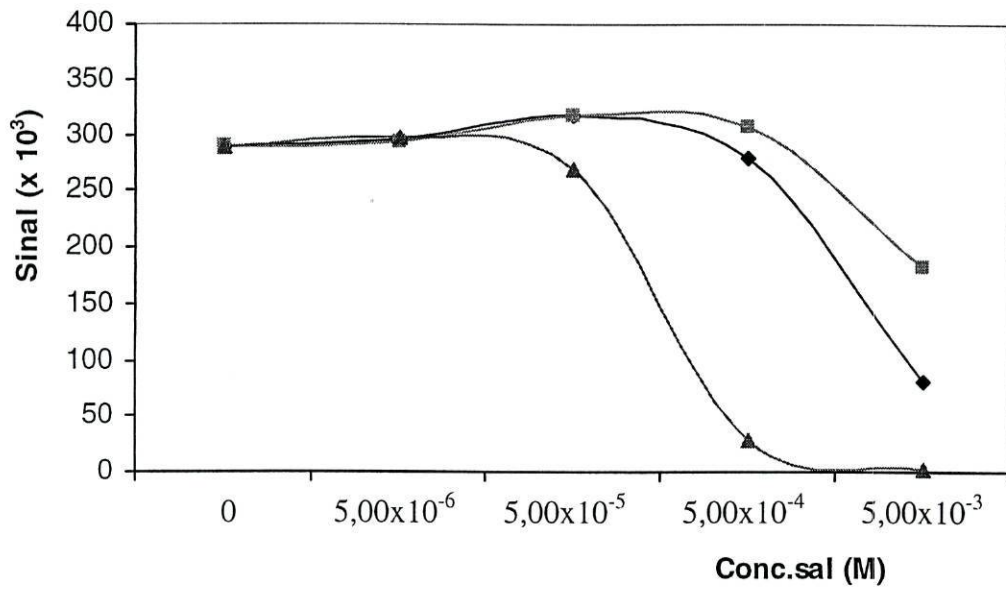


Fig. 6.7 – Variação do sinal com a concentração dos principais interferentes para uma concentração de bromato de $5,00 \times 10^{-5}$ M (■ - cloreto; ◆ - brometo; ▲ – nitrito).

6.3 – CONCLUSÕES

O sistema quimioluminescente para detecção e análise de bromato baseado na oxidação do anião sulfito pelo bromato usando a hidrocortisona como amplificador foi implementado e otimizado com sucesso.

As características de resposta do sistema atribuem-lhe o potencial para a sua incorporação em procedimentos de detecção rápida, particularmente apropriados para ser incluído em instrumentos portáteis. No entanto, o pré-tratamento de amostras com o objectivo de eliminar alguns interferentes poderá ser necessário em algumas aplicações reais.

A configuração do sistema estudado permite a fácil inserção de dispositivos de tratamento das amostras. De facto, a amostra é injectada num transportador que no sistema estudado é a água mas que pode ser substituído por uma solução contendo reagentes para eliminação de interferentes. Por outro lado, unidades de pré-tratamento de amostras podem ser facilmente incluídas no sistema em fluxo após o local de injeção da amostra. Deste modo, a eliminação dos interferentes é efectuada em fluxo o que não compromete a versatilidade deste sistema.

6.4 – BIBLIOGRAFIA

1. U.Gunten and J.Hoigné. *Environ. Sci. Technol.* **28**. 1234 (1994).
2. W.A. Hijnen. R. Jong and D.V. Kooij. *Wat. Res.* **33**. 1049 (1999).
3. M. Bao. O. Griffini. D. Santianni. K. Barbieri. D. Burrini and F. Pantani. *Wat. Res.* **33**. 2959 (1999).
4. M.Asami. T. Aizawa. T. Morioka. W. Nishijima. A. Tabata and Y. Magara. *Wat. Res.* **33**. 2797 (1999).
5. B.D.Walters. G.Gordon and B.Bubnis. *Anal. Chem.* **69**. 4275 (1997).
6. L.K. Jackson. R.J. Joyce. M. Laikhtman and P.E. Jackson. *J. Chromatography A* **829**. 187 (1999).
7. H.P. Wagner. B.V. Pepich. D.P. Hautman and D.J. Munch. *J. Chromatography A* **850**. 119 (1999).
8. J.T. Creed and C.A. Brockhoff. *Anal. Chem.* **71**. 722 (1999).
9. M.C. Bruzzoniti. E. Mentasti and C. Sarzanini. *Anal. Chim. Acta* **382**. 291 (1999).
10. E. Salhi and U.V. Gunten. *Wat. Res.* **33**. 3239 (1999).
11. M.L. Magnuson. *Anal. Chim. Acta* **377**. 53 (1998).
12. D.A. Barnett. R. Guevremont and R.W. Purves. *Appl. Spectrosc.* **53**. 1367 (1999).
13. A. Kojlo and H.P. Tarasiewicz. *Anal. Letters* **26**. 593 (1993).
14. A.B.Syropoulos. E.G. Sarantonis and A.C. Calorkerinos. *Anal. Chim. Acta* **239**. 195 (1990).
15. D.B. Paul. *Talanta* **25**. 377 (1978).
16. L.J. Kricka and G.H.Thorpe. *Analyst* **108**. 1274 (1983).
17. N.A. Armstrong and K.C. James. *Understanding experimental design and interpretation in pharmaceuticals*. Ellis Horwood. New York. 1990. Chp. 4.
18. J.Ruzika and E.H. Hansen. *Flow Injection Analysis*. Wiley. New York. 1987. Chp.2.
19. S.N. Deming and S.L. Morgan. *Experimental design: a chemometric approach*. Elsevier. Amsterdam. 1987. Chp. 9.

20. D.L. Massart. B.G.M. Vandeginste. L.M.C. Buydens. S. De Jong. P.J. Lewi and J.Smeyers-Verbeke. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A. Elsevier. Amsterdam. 1997. pp.422-423.

7 – CONCLUSÕES

Neste dissertação descreve-se a montagem de um sistema para detecção de quimioluminescência. Assim, foi possível a integração de diversos componentes comerciais com outros construídos no laboratório, tendo resultado num sistema de detecção ultra-sensível de luz na zona do visível.

Foram construídos três sistemas com interesse em monitorização ambiental para a análise de catião Cu(II), cloro livre e anião bromato em águas. A estratégia usada no estudo do efeito dos factores experimentais na resposta dos sistemas e na sua optimização envolveu técnicas de planeamento de experiências que se mostraram adequadas ao estudo. Em concreto, foram aplicados planeamentos factoriais completos e fraccionados e de Plackett-Burman.

As respostas dos três sistemas desenvolvidos permite desenvolver metodologias de análise química quantitativa para catião Cu(II), cloro livre e anião bromato em águas com tempos por análise muito curtos (da ordem de algumas dezenas de segundos por análise). As características de resposta dos três sistemas torna-os compatíveis com os níveis de sensibilidade necessária para as análises com interesse em química ambiental.

Um dos aspectos mais interessantes do tipos e sistemas de análise desenvolvidos é a facilidade com que podem ser transformados em equipamentos portáteis. Este tipo de detectores possibilitam a execução de análises químicas quantitativas nos locais de amostragem por injeção directa de amostra nos sistemas.

APÊNDICE A – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DO TRABALHO DE MESTRADO

A.1 – Artigos

1.1 – Factorial analysis of a chemiluminescence system for bromate detection in water

Joaquim C.G.Esteves da Silva, José R.M. Dias e Júlia M.C.S. Magalhães, **Anal. Chim. Acta**, 2001, Em processo de revisão.

1.2 – Factorial analysis of a chemiluminescence system for free chlorine detection in water

Joaquim C.G.Esteves da Silva, José R.M. Dias e Júlia M.C.S. Magalhães, **Em preparação**.

A.2 - Comunicações

2.1 – Optimização de um sistema para a determinação de Cu(II) a níveis picomolares por quimioluminescência

Joaquim C.G. Esteves da Silva, J.R.M. Dias e J.M.C.S. Magalhães, **SPQ-ANALÍTICA'99, Hotel Meliá, Coimbra**, 21-22 Outubro de 1999, Comunicação P-3.

2.2 – Optimização de um sistema de quimioluminescência para a determinação de anião bromato em água potável

Joaquim C.G. Esteves da Silva, J.R.M. Dias e J.M.C.S. Magalhães, **XIV Encontro Luso-Galego de Química**, Livro de Resumos, Universidade do Minho, Braga, 22 a 24 de Novembro de 2000, Comunicação P3.06.

2.3 – Optimization of a chemiluminescent method for free chlorine detection in water

Joaquim C.G. Esteves da Silva, J.R.M. Dias and J.M.C.S. Magalhães, **CAC-2000, 7th Internation Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry**, Book of Abstracts, Antwerp (Belgica), 16 a 20 de Outubro de 2000, p. 76.

APÊNDICE B - ÍNDICE DE TABELAS E DE FIGURAS

B 1 - ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1 - Valores de concentração micelar crítica (CMC), expressos em M, para os surfactantes utilizados neste trabalho, retirados da literatura [8,19]. | 11 |
| Tabela 2.1 – Planeamento das quatro experiências num planeamento experimental completo com dois factores e dois níveis. | 33 |
| Tabela 2.2 – Tabela da ANOVA de uma via [1]*. | 35 |
| Tabela 2.3 – Contrastes para a construção de planeamentos de Plackett-Burman com o número de experiências indicado [6]. | 37 |
| Tabela 2.4 – Exemplo de cálculo de desvios normais para um conjunto de dados ordenados [1]. | 43 |
| Tabela 2.5 – Tabela da ANOVA para regressão múltipla [1]*. | 48 |
| Tabela 4.1 - Factores estudados e suas abreviaturas | 67 |
| Tabela 4.2 – Matriz do planeamento factorial fraccionado com sete factores e dois níveis para cada factor, representados pelos algarismos (0) e (1). | 68 |
| Tabela 4.3- Valores dos factores experimentais correspondentes aos níveis codificados na matriz do planeamento factorial (Tabela 4.2). | 68 |
| Tabela 4.4 – Resposta do sistema nas experiências do planeamento factorial fraccionado para sete factores a dois níveis (Tabela 4.2) ao injectar no sistema uma solução de Cu(II) 10^{-8} M. | 69 |
| Tabela 4.5 – ANOVA da resposta do sistema (Tabela 4.4) nas experiências do planeamento factorial fraccionado (Tabela 4.2)*. | 70 |
| Tabela 4.6 – ANOVA do ajuste dos dados experimentais a um polinómio de primeiro grau*. | 71 |
| Tabela 4.7 - Matriz do planeamento factorial completo com três factores a três níveis representados pelos algarismos (-1), (0) e (1). | 73 |
| Tabela 4.8 - Valores experimentais dos factores correspondentes aos níveis codificados na matriz do planeamento factorial completo (Tabela 4.7). | 74 |
| Tabela 4.9 - Valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial completo com três factores a três níveis (Tabela 4.7) ao injectar no sistema uma solução de Cu(II) 10^{-8} M. | 75 |
| Tabela 4.10 – ANOVA da resposta do sistema (Tabela 4.9) nas experiências do planeamento factorial completo (Tabela 4.7)*. | 76 |
| Tabela 4.11 - ANOVA da regressão da resposta do sistema em função dos níveis dos factores V_i , V_L e C_{CEDAB} *. | 76 |
| Tabela 4.12 - Valores experimentais dos factores estudados para o sistema optimizado. | 77 |
| Tabela 5.1 - Factores estudados e suas abreviaturas. | 85 |
| Tabela 5.2 – Matriz do planeamento factorial completo com quatro factores a dois níveis representados pelos algarismos (0) e (1). | 86 |
| Tabela 5.3- Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planeamento da Tabela 5.2. | 86 |
| Tabela 5.4- Resultados obtidos nas experiências do planeamento factorial da Tabela 5.2 para uma solução de hipoclorito $6,35 \times 10^{-4}$ M. | 88 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 5.5 – ANOVA da resposta do sistema (Tabela 5.4) nas experiências do planeamento da Tabela 5.2*. | 89 |
| Tabela 5.6 – ANOVA dos dados da Tabela 5.4 de dados considerando apenas os factores caudal total (Q_T), temperatura (T) e concentração de rodamina 6G (C_R) *. | 90 |
| Tabela 5.7- Matriz do planeamento de experiências utilizado para detectar efeitos não-lineares dos três factores usando três níveis representados pelos algarismos (-1),(0) e (1). | 91 |
| Tabela 5.8- Factores e respectivos níveis utilizados no planeamento experimental da Tabela 5.7. | 92 |
| Tabela 5.9 – Valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 5.7 para uma solução $6,35 \times 10^{-4}$ M de hipoclorito. | 92 |
| Tabela 5.10 - ANOVA dos resultados da Tabela 5.9*. | 93 |
| Tabela 5.11 – Factores e respectivos níveis otimizados para o sistema | 96 |
| Tabela 5.12 - Matriz do planeamento de experiências utilizado para detectar efeitos não-lineares dos três factores usando três níveis representados pelos algarismos (-1),(0) e (1). | 101 |
| Tabela 5.13 – Valores a que correspondem os níveis dos factores no planeamento da Tabela 5.12 | 102 |
| Tabela 5.14 – Resultados obtidos nas experiências do planeamento experimental da Tabela 5.12 para uma solução de hipoclorito 6.35×10^{-4} M. | 103 |
| Tabela 5.15 - ANOVA dos resultados da Tabela 5.14. | 104 |
| Tabela 6.1 - Factores estudados e suas abreviaturas. | 111 |
| Tabela 6.2 – Matriz do planeamento de experiências de Plackett-Burman com sete factores a dois níveis representados pelos algarismos (0) e (1). | 112 |
| Tabela 6.3- Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planeamento da Tabela 6.2. | 112 |
| Tabela 6.4 – Resultados obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman com sete factores a dois níveis, ao injectar solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-5}$ M. | 113 |
| Tabela 6.5 – Resultados obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman com sete factores a dois níveis, ao injectar solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-4}$ M. | 114 |
| Tabela 6.6 - ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman para a solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-5}$ M. | 115 |
| Tabela 6.7 - ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman para a solução de ião bromato $4,97 \times 10^{-4}$ M. | 115 |
| Tabela 6.8 - ANOVA da diferença dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento de Plackett-Burman *. | 116 |
| Tabela 6.9- Matriz do planeamento de experiências factorial completo com três factores e três níveis representados pelos algarismos (-1), (0) e (1). | 118 |
| Tabela 6.10 - Factores experimentais e valores a que correspondem os factores fixos e os níveis no planeamento da Tabela 6.9. | 119 |
| Tabela 6.11- Resultados obtidos nas experiências do planeamento de factorial com três factores a três níveis, ao injectar solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-6}$ M. | 120 |
| Tabela 6.12 - Resultados obtidos nas experiências do planeamento de factorial com três factores a três níveis, ao injectar solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-5}$ M | 121 |
| Tabela 6.13- Resultados obtidos nas experiências do planeamento de factorial com três factores a três níveis, ao injectar solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-4}$ M. | 122 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 6.14 – ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial para a solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-6}$ M. | 123 |
| Tabela 6.15 – ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial para a solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-5}$ M. | 124 |
| Tabela 6.16 – ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento factorial para a solução de ião bromato $5,0 \times 10^{-4}$ M. | 125 |
| Tabela 6.17- Factores e respectivos níveis otimizados para o sistema. | 127 |

B 2 - ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig.1.1 - Alguns compostos orgânicos que mostram reacções quimioluminescentes:(a) luminol; (b) 1,2-dioxetano; e, (c) 1,2-dioxetanodiona. | 3 |
| Fig. 1.2 - Mecanismo esquemático da oxidação de luminol pelo peróxido de hidrogénio em meio aquoso, catalisada por um metal de transição. | 3 |
| Fig. 1.3 - Esquema do mecanismo de emissão luminosa de quimioluminescência. | 4 |
| Fig. 1.4 - Curva de decaimento do sinal de quimioluminescência com o tempo. | 6 |
| Fig. 1.5 - Estrutura da 1,10-fenantrolina. | 8 |
| Fig. 1.6 - Estrutura do CEDAB. | 8 |
| Fig. 1.7 - Estrutura da rodamina 6G. | 9 |
| Fig. 1.8 - Estrutura da hidrocortisona. | 9 |
| Fig. 1.9 - Representação esquemática da origem e formação de micelas. | 11 |
| Fig. 1.10 - Ilustração esquemática da variação de algumas propriedades (condutividade, κ ; turbidância, τ ; pressão osmótica, π ; e a condutividade molar, Λ) com a concentração de surfactante. | 12 |
| Fig. 1.11 - Estruturas de alguns surfactantes: (a) triton; (b) dodecilsulfato de sódio; (c) cloreto de cetilpiridina (CPC); e (d) brometo de cetilpiridina (CPB). | 13 |
| Fig. 2.1 – Os passos principais num planeamento experimental [1]. | 21 |
| Fig. 2.2 - Superfície de resposta que mostra que o ponto B é mais robusto do que o ponto A[1]. | 23 |
| Fig. 2.3 – Optimização de um factor de cada vez por análise das curvas de nível [1]: (a) não há interacção entre os factores; (b) há interacção entre os factores; (c)há interacção entre os factores mas o efeito de x_2 é diferente para os dois níveis d_{x_1} . | 25 |
| Fig. 2.4 – Exemplo de uma optimização sequencial com o método Simplex [1]. | 26 |
| Fig. 2.5 – Possíveis movimentos do Simplex modificado – ver no texto o significado das letras da figura. | 28 |
| Fig. 2.6 – Esquema de um planeamento factorial completo com dois (a) e três (b) factores com dois níveis. | 32 |
| Fig. 2.7 – Exemplos de gráficos de resíduos. | 42 |
| Fig. 2.8 – Método de “rankit” aplicado aos dados da Tabela 2.4. | 44 |
| Fig. 2.9 – Método de “rankit” aplicado a um conjunto de dados antes (a) e depois (b) de retirar dois pontos anormais do cálculo [1]. | 44 |
| Fig. 2.10 –Superfície de resposta para um modelo de primeira ordem sem interacção [3]. | 51 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 2.11–Superfície de resposta para um modelo de primeira ordem com interacção [3]. | 51 |
| Fig. 2.12 – Superfície de resposta com uma parábola a abrir para baixo [3]. | 52 |
| Fig. 2.13 – Superfície de resposta curva com um cume [3]. | 53 |
| Fig. 2.14 – Superfície de resposta curva com a forma de uma sela [3]. | 53 |
| Fig. 3.1 - Imagem do tubo fotomultiplicador usado nos estudos quimioluminescentes. | 58 |
| Fig. 3.2 - Representação esquemática do sistema de detecção quimioluminescente TFM - tubo fotomultiplicador (ver no texto a descrição dos restantes componentes). | 60 |
| Figura 3.3 – Representação esquemática do sistema de fluxo utilizado para a análise do catião Cu(II). | 61 |
| Fig. 3.4 – Representação esquemática do sistema de fluxo utilizado para análise de cloro livre. | 61 |
| Fig. 3.5 – Representação esquemática do sistema de fluxo utilizado na determinação do ião bromato. | 62 |
| Fig. 4.1 – Resposta do sistema nas oito experiências definidas no planeamento factorial fraccionado (Tabela 4.2) ao injectar solução de Cu(II) 10^{-8} M. | 69 |
| Fig. 4.2 – Sequência de calibração do sistema optimizado com tempo de integração de 70 ms | 79 |
| Fig. 4.3 – Reprodutibilidade da resposta do sistema optimizado para um tempo de integração de 70 ms e para uma concentração de 10 nM de Cu(II). | 79 |
| Fig. 4.4 – Sequência de calibração do sistema optimizado com tempo de integração de 70 ms. | 80 |
| Fig. 4.5- Curva de calibração do sistema optimizado. | 80 |
| Fig. 5.1 – Resposta do sistema obtido em algumas experiências do planeamento da Tabela 5.2. | 87 |
| Fig. 5.2 – Representação de uma superfície de resposta do sistema: altura de pico em função da temperatura e do caudal. | 94 |
| Fig. 5.3 – Representação de uma superfície de resposta do sistema: altura de pico em função da temperatura e do caudal. | 94 |
| Fig. 5.4 – Representação da variação do sinal com a concentração de rodamina | 95 |
| Fig. 5.5 – Representação de uma superfície de resposta do sistema: altura de pico em função da temperatura e do caudal. | 97 |
| Fig. 5.6 – Representação do logaritmo do sinal quimioluminescente em função do logaritmo da concentração de hipoclorito. | 98 |
| Fig. 5.7 – Efeito de dois surfactantes no sinal do sistema para uma concentração de hipoclorito de $3,10 \times 10^{-4}$ M. | 99 |
| Fig. 5.8 – Resposta do sistema com solução indicadora com rodamina 6G e CPC para amostras de hipoclorito com a concentração indicada. | 105 |
| Fig. 5.9 – Representação de uma sequência de calibração típica para o sistema de análise de hipoclorito na presença de CPC. | 106 |
| Fig. 5.10 – Representação do logaritmo da altura de pico em função do logaritmo da concentração de rodamina 6G. | 106 |
| Fig. 6.1 - Resposta do sistema às variações impostas, para as duas concentrações de bromato: $4,97 \times 10^{-4}$ (----) e $4,97 \times 10^{-5}$ M (—). | 113 |
| Fig. 6.2 – Superfície de resposta do sistema em função do volume de injeção e da concentração de hidrocortisona. | 127 |
| Fig. 6.3 - Representação de uma resposta típica de uma série de injeções no sistema. | 128 |
| Fig. 6.4 - Representação de uma sequência de calibração típica. | 129 |

Fig. 6.5 – Representação da curva do logaritmo do sinal quimioluminescente comofunção do 130
logaritmo da concentração de bromato.

Fig. 6.6 – Interferência dos iões ($1,00 \times 10^{-2}$ M) no sinal do sistema para uma concentração de 131
bromato de $5,00 \times 10^{-5}$ M.

Fig. 6.7 – Variação do sinal com a concentração dos principais interferentes para uma concentração 132
de bromato de $5,00 \times 10^{-5}$ M (■ - cloreto; ♦ - brometo; ▲ – nitrito).