



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Determinação do Teor de NaCl, KCl e Glicose em  
Medicamentos Injetáveis por Fotometria Usando  
Exploração do Efeito Schlieren em Sistemas FIA e PLS1**

**Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz**

João Pessoa – PB - Brasil  
Outubro/2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Determinação do Teor de NaCl, Glicose e KCl em  
Medicamentos Injetáveis por Fotometria Usando  
Exploração do Efeito Schlieren em Sistemas FIA e PLS1**

**Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz\***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: **Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo**

2ª Orientadora: **Prof. Dra. Elaine Cristina Lima do Nascimento**

\* Bolsista (Capes)

João Pessoa – PB - Brasil  
Outubro/2010

D585d Diniz, Paulo Henrique Gonçalves Dias.

Determinação do teor de NaCl, Glicose e KCl em medicamentos injetáveis por fotometria usando exploração do efeito Schlieren em Sistemas FIA e PLS1 / Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz.- João Pessoa, 2010.

89f. : il.

Orientadores: Mário César Ugulino de Araújo e Elaine Cristina Lima do Nascimento

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Química Analítica. 2. Efeito Schlieren. 3. Sistema FIA. 4. PLS1. 5. NaCl. 6. Glicose. 7. KCl.

UFPB/BC

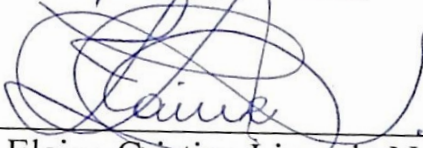
CDU: 543(043)

Dissertação de Mestrado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

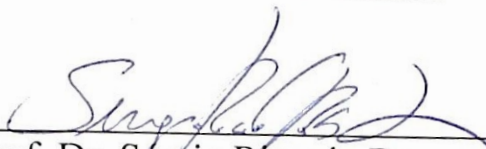
Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo  
Orientador/Presidente



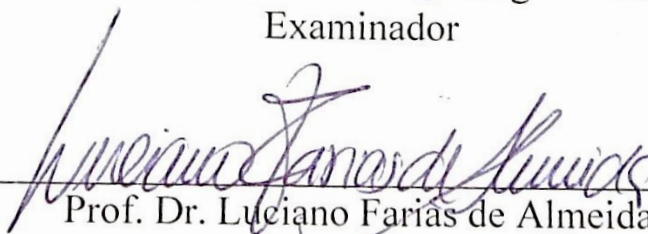
Profa. Dra. Elaine Cristina Lima do Nascimento  
2ª. Orientadora



Prof. Dr. Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos  
Examinador



Prof. Dr. Edvaldo da Nóbrega Gaião  
Examinador



Prof. Dr. Luciano Fariás de Almeida  
Examinador

*“A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.”*

Aristóteles, 350 a.C.

A Deus Todo-Poderoso pela existência das pessoas que amo.

A minha amada mãe, Miriam, pelo amor incondicional.

A todas as pessoas que me amam verdadeiramente.

Com amor e gratidão,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

*"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu."*  
Eclesiastes 3:1

- A Deus, que sempre tem me abençoado, fortalecido e presenteado com dádivas e vitórias sucessivas.
- Aos meus amados pais, Mirian Gonçalves e Sebastião Diniz, pelo esforço, empenho, ensinamentos, apoio e incentivo para fazer de mim o que sou hoje.
- A minha vó Maria da Penha e a minha tia Isabel Cristina pelos ensinamentos, apoio e incentivo.
- A Sara Regina, Wellington Lyra, Daniel Sarmiento e Leandro Guerreiro pela amizade, sinceridade, paciência, apoio e participação nos momentos importantes.
- A Deise Nunes e Anja Sittner pela amizade, paciência e companheirismo desde a época do intercâmbio na Hochschule Vechta.
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo pela oportunidade de trabalho, confiança e ensinamentos.
- Ao amigo Luciano Farias de Almeida pela oportunidade de aprendizagem, ensinamentos e sugestões acadêmicas e pessoais desde a época de voluntário no LAQA.
- Aos professores Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos, Elaine Cristina Lima do Nascimento e Pablo Nogueira Teles Moreira pelas relevantes contribuições acadêmico-científicas para esta dissertação.
- Aos amigos Yebá Ngoamñ e Karla Daniele pela colaboração na parte experimental.
- A todos os amigos que ganhei durante este período no LAQA.
- A Capes pela bolsa concedida.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>.....</b>
1. Introdução .....	2
1.1 Caracterização geral da problemática.....	2
1.2 Objetivo e Metas .....	3
1.2.1 Objetivo geral.....	3
1.2.2 Metas .....	3
1.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	4
1.3.1 Componentes básicos de um sistema FIA .....	5
1.3.1.1 Sistema de propulsão.....	8
1.3.1.2 Sistema de injeção .....	9
1.3.1.3 Sistema de transporte.....	13
1.3.1.4 Sistema de detecção .....	15
1.4 Detecção fotométrica.....	16
1.4.1 Detectores fotométricos à base de LEDs.....	17
1.5 Efeito Schlieren ou efeito do índice de refração .....	22
1.5.1 Análise por injeção em fluxo e efeito Schlieren.....	23
1.5.2 Metodologias analíticas que exploram o efeito Schlieren.....	32
1.6 Quimiometria.....	34
1.6.1 Calibração multivariada.....	36
1.6.1.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) .....	39
1.6.1.1.1 Procedimento matemático .....	40
1.6.1.1.2 Diagnóstico do modelo.....	41

<b>CAPÍTULO 2</b> .....	
2. Metodologia experimental .....	46
2.1 Reagentes, soluções e amostras.....	46
2.2 Materiais e equipamentos.....	46
2.2.1 Injetor proporcional.....	47
2.2.2 Fotômetro à base de LED e fototransistor.....	48
2.2.3 Interface eletrônica .....	50
2.2.4 Procedimento analítico .....	52
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	
3. Resultados e discussão .....	56
3.1 Ajuste do sistema FIA-Schlieren.....	56
3.1.1 Vazão .....	56
3.1.2 Comprimento do caminho óptico .....	58
3.1.3 Volume de amostra injetada .....	60
3.2 Tratamento dos dados .....	61
3.2.1 Pré-tratamento dos dados .....	61
3.2.2 Detecção de amostras anômalas .....	64
3.2.3 Construção e validação dos modelos de calibração .....	66
3.2.4 Previsão da concentração dos analitos em amostras reais .....	69
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	
4. Conclusão .....	74
4.1 Propostas futuras .....	75
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	
5. Referências bibliográficas .....	78

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1.** A injeção da amostra **(A)** é a primeira etapa, na qual um volume fixo da solução do analito é inserido dentro de um fluido carregador contendo o reagente. Como a zona da amostra (em vermelho) se move através do fluxo **(B)**, o processo de dispersão mistura a amostra com o reagente, formando um produto da reação (em amarelo). A detecção do analito **(C)** é realizada em fluxo. Adaptada da Ref. [4]. ..... 5
- FIGURA 1.2.** Diagrama esquemático de um sistema FIA, mostrando várias opções para introdução de amostras e reagentes, injeção, mistura e detecção. Adaptada da Ref. [5]. ..... 6
- FIGURA 1.3.** Dispositivos comerciais mais utilizados para propulsão de fluidos: (a) bomba peristáltica; (b) bomba seringa. .... 8
- FIGURA 1.4.** Diagrama esquemático do funcionamento de uma válvula rotatória nas posições de (a) amostragem e (b) injeção. ....10
- FIGURA 1.5.** Injetor proporcional nas posições de (a) amostragem e (b) injeção. ....11
- FIGURA 1.6.** Dispositivos de mistura comumente utilizados em FIA: (a) tubo reator de PTFE enrolado em espiral, (b) tubo reator enlaçado e (c) tubo reator serpenteado. ....14
- FIGURA 1.7.** Diagrama esquemático dos constituintes e do funcionamento de um LED comum.....18

**FIGURA 1.8.** Espectros de emissão típicos de uma seleção de LEDs, comercialmente disponíveis, na faixa espectral do UV-vis. Adaptado da Ref. [37]. .....18

**FIGURA 1.9.** Uma cela de fluxo construída no corpo de um LED. **C**, chip emissor; **A**, abertura de entrada/saída; **P**, luva opaca de PEEK (em laranja); **L**, lente (invólucro exterior); **F**, fibra ótica conduzindo ao fotodiodo detector. O detector pode ser referenciado por um fotodiodo colocado sobre o LED. Redesenhado da Ref. [44]. .....21

**FIGURA 1.10.** Representação esquemática dos efeitos do índice de refração em análise de fluxo. As figuras (a) e (b) mostram o efeito esperado de lentes Schlieren quando o IR da zona de amostra,  $\eta_2$ , é maior que a do fluxo transportador,  $\eta_1$ , enquanto a figura (c) ilustra como a heterogeneidade do líquido pode causar ruído adicional ao detector. Ambos os efeitos das lentes Schlieren e estrias dos líquidos podem ser vistos na figura (d). O ponto brilhante no centro da imagem corresponde à abertura da cela de fluxo. Adaptado da Ref. [70]. .....26

**FIGURA 1.11.** Comparação da sensibilidade aos efeitos do índice de refração entre uma cela multirreflexão e uma cela transversal de passagem radial única. Para efeitos comparativos, o sinal da cela transversal foi multiplicado por 20. Em ambos os caso a primeira injeção é de 10 mM de azul de bromotimol alcalino e a segunda injeção é o mesmo analito em uma matriz de 100‰ de NaCl. Adaptado da Ref. [78]. .....32

**FIGURA 1.12.** Representação matricial de um modelo de calibração multivariada linear com  $n$  amostras de calibração.  $y_i$  representa a concentração da  $i$ -ésima amostra de calibração,  $x_{ij}$  denota a resposta medida na  $j$ -ésima resposta instrumental correspondente e  $b_j$  simboliza o coeficiente de calibração. ....37

- Figura 2.1.** Fotografia do sistema FIA-Schlieren automatizado. (a) Microcomputador; (b) fotômetro à base de LED e fototransistor; (c) injetor proporcional; (d) bomba seringa. ....47
- FIGURA 2.2.** Injetor proporcional mecanicamente operado por motor de passos. ....48
- FIGURA 2.3.** Circuito eletrônico do fotômetro de fluxo. ....48
- FIGURA 2.4.** Fotografia do fotômetro desenvolvido. O destaque (em vermelho) mostra a câmara que abriga a cela de fluxo.....49
- FIGURA 2.5.** Fotografia da cela de fluxo que abriga (a) o LED e (b) o fototransistor. ....50
- FIGURA 2.6.** Diagrama esquemático da cela de fluxo construída. ....50
- FIGURA 2.7.** Fotografia da interface PCL-711. ....51
- FIGURA 2.8.** Diagrama esquemático do sistema FIA-Schlieren proposto.....52
- FIGURA 2.9.** Interface gráfica do programa para controle do sistema e aquisição dos dados.....54
- FIGURA 3.1.** Perfis Schlieren obtidos em triplicata para uma solução padrão de NaCl 1,0% m v<sup>-1</sup> a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. No destaque é mostrado um dos perfis obtidos. ....57

**FIGURA 3.2.** Perfis Schlieren obtidos em triplicata para uma solução padrão de NaCl 1,0% m v<sup>-1</sup> a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. No destaque é mostrada a diferença entre as linhas de base dos perfis obtidos. ....58

**FIGURA 3.3.** Perfis Schlieren para as soluções padrão de NaCl e amostras de soro fisiológico: (a) à esquerda, os perfis brutos; (b) à direita, os perfis pré-tratados. No destaque (em verde) é possível observar a presença de diferentes linhas de base e ruídos aleatórios. ....62

**FIGURA 3.4.** Perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de NaCl e amostras de soro fisiológico. ....62

**FIGURA 3.5.** Perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de KCl e amostras de KCl injetável. ....63

**FIGURA 3.6.** Perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de glicose e amostras de soro glicosado. ....63

**FIGURA 3.7.** Variância residual em X versus leverage das amostras dos modelos PLS1 construídos usando soluções padrão de (a) NaCl, (b) KCl e (c) glicose. A linha vertical tracejada azul representa a média da influência das amostras e a linha vermelha três vezes a média da influência. ....64

**FIGURA 3.8.** Gráfico das concentrações medidas versus concentrações previstas para as soluções de NaCl na construção do modelo de calibração usando o método de validação cruzada. ....67

**FIGURA 3.9.** Gráfico das concentrações medidas versus concentrações previstas para as soluções padrão de KCl na construção do modelo de calibração com validação cruzada. ....67

**FIGURA 3.10.** Gráfico das concentrações medidas versus concentrações previstas para as soluções padrão de glicose na construção do modelo de calibração com validação cruzada. ....68

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 3.1.** Valores de RMSEC, RMSECV e suas respectivas correlações obtidos na construção dos modelos de calibração para as soluções padrão de NaCl, KCl e glicose. ....68
- TABELA 3.2.** Valores previstos, intervalos de confiança e valores de referência para as concentrações das amostras de soro fisiológico e valores de t estimados para cada amostra. ....69
- TABELA 3.3.** Valores previstos, intervalos de confiança e valores de referência para as concentrações das amostras de KCl injetável e valores de t estimados para cada amostra. ....70
- TABELA 3.4.** Valores previstos, intervalos de confiança e valores de referência para as concentrações das amostras de soro glicosado e valores de t estimados para cada amostra. ....70



## LISTA DE ABREVIATURAS

CFA	Continuous Flow Analysis
CI	Circuito integrado
FIA	Flow Injection Analysis
IR	Índice de refração
LED	Light emitting diode
LOOCV	Leave-one-out crossvalidation
MCCV	Monte Carlo crossvalidation
MLR	Multiple Linear Regression
MSFA	Monosegmented Flow Analysis
PCR	Principal Component Regression
PEEK	Poliéter-éter-cetona
PLS	Partial Least Squares
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Cloreto de polivinila
RMSEC	Root mean square error of calibration
RMSECV	Root mean square error of crossvalidation
RMSEP	Root mean square error of prediction
SIA	Sequential Injection Analysis
UV-vis	Ultravioleta-visível

## RESUMO

**Título:** Determinação do Teor de NaCl, KCl e Glicose em Medicamentos Injetáveis por Fotometria Usando Exploração do Efeito Schlieren em Sistemas FIA e PLS1

**Autor:** Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz

Neste trabalho foi avaliada a exploração do efeito Schlieren em sistemas FIA para a implementação de uma nova estratégia para determinar o teor de cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose em amostras de soro fisiológico, KCl injetável e soro glicosado, respectivamente. A metodologia proposta se baseia na diferença entre os índices de refração das zonas da amostra e do fluido carregador. Nesta perspectiva, foi empregada detecção fotométrica baseada em LED e fototransistor para investigar diferentes perfis analíticos associados ao efeito Schlieren em condições de baixa vazão. Estudos para ajuste dos parâmetros e configurações de fluxo mais adequados nos quais os perfis Schlieren podem ser explorados foram realizados. A metodologia proposta gera uma grande quantidade de informações químicas e, por isso, requer a utilização de ferramentas quimiométricas. A avaliação dos resultados foi realizada com a aplicação da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS1), a qual empregou as soluções padrão de cada analito para construção e validação dos modelos. Em seguida, os modelos construídos foram utilizados para a previsão do teor de cada analito em suas respectivas amostras reais. Os resultados obtidos demonstraram a boa capacidade preditiva dos modelos PLS1 construídos, pois os valores das concentrações previstos pelos modelos foram concordantes com os valores de referência, no nível de 95% de confiança. As maiores vantagens da exploração do efeito Schlieren na análise química são que nenhum reagente é empregado, que utiliza baixo volume de amostras e que não emprega caros detectores de radiação.

Palavras-chaves: Efeito Schlieren; FIA; NaCl; KCl; Glicose; PLS1.

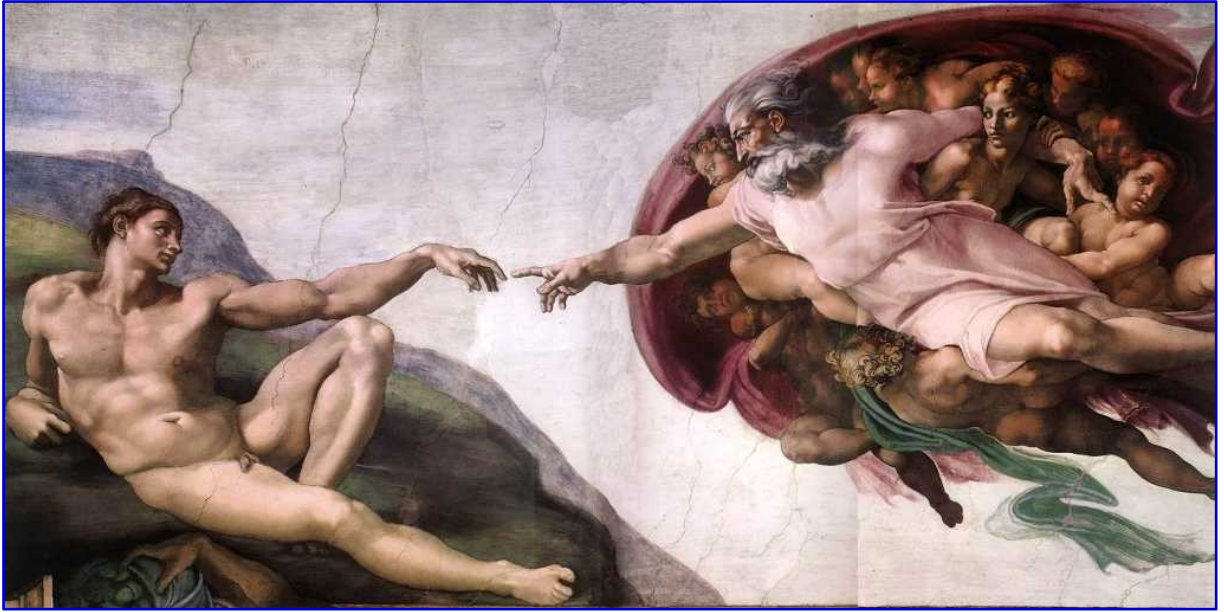
## ABSTRACT

**Title:** Determination of NaCl, KCl and Glucose Content in Injectable Pharmaceuticals by Photometry Exploring the Schlieren Effect in FIA Systems and PLS1

**Author:** Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz

This study evaluated using the Schlieren effect in FIA systems as a new strategy to determine the amounts of sodium chloride, potassium chloride and glucose, each respectively in intravenous drugs. The proposed methodology was based on the difference between the refractive indices of sample zones and the carrier stream. With this perspective, photometric detection was used based on an LED and a phototransistor to investigate the different analytical profiles related to the Schlieren effect in low flow rate conditions. Adjustment studies of the parameters and flow settings (which were most suitable to exploit Schlieren profiles), were performed. The proposed methodology generates a large amount of chemical information and therefore requires the use of chemometric tools. Data evaluation was performed with the application of a partial least squares regression (PLS1), employing the standard solutions of each analyte to construct and validate the models. The models were then used to predict the content of each analyte in their real samples. The results demonstrated the predictive ability of the constructed PLS1 models, and the predicted concentration values were in agreement with the reference values, with 95% of confidence. The main advantages of using the Schlieren effect in the chemical analysis is that no reagent is employed, low volumes of samples are used and no expensive radiation detectors are used.

**Keywords:** Schlieren effect; FIA; NaCl; KCl; Glucose; PLS1.



*A criação de Adão.* Michelangelo, 1511.

"A alma humana é como a água: ela vem do Céu e volta para o Céu,  
e depois retorna à Terra, num eterno ir e vir." – Goethe

# INTRODUÇÃO

## Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Caracterização geral da problemática

A análise química é um elemento indispensável em todos os setores da atividade humana. A crescente demanda por determinações analíticas resulta da necessidade em analisar um número cada vez maior de diferentes amostras. Além disso, há também a necessidade de melhoramento da qualidade das determinações analíticas. Dependendo da área de aplicação, é imprescindível encurtar o tempo de análise, minimizar a quantidade de amostra por análise, alcançar limites de detecção mais baixos e/ou melhor seletividade em determinações multicomponentes com maiores precisão e/ou exatidão<sup>[1]</sup>.

A crescente competitividade no ramo industrial tem proporcionado uma contínua procura por novas metodologias analíticas que sejam menos dispendiosas e não poluam o meio ambiente. Neste contexto, o controle de qualidade é uma etapa indispensável na maioria dos processos industriais, os quais requerem normalmente um grande número de análises que são, geralmente, realizadas empregando instrumentos caros e de grande porte.

As metodologias mais comumente utilizadas no controle de qualidade industrial são lentas e laboriosas, pois envolvem muita manipulação analítica, tais como extração/dissolução da amostra, preparação frequente de soluções e padrões de calibração, entre outros. Além disso, são métodos que requerem grandes quantidades de solventes e reagentes caros, pessoal qualificado para a manipulação analítica e produzem resíduos prejudiciais ao meio ambiente.

Assim, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de uma metodologia multianálise usando um analisador por injeção em fluxo com detecção fotométrica baseada em LED e fototransistor para estudo e caracterização de diferentes perfis analíticos associados ao efeito Schlieren em condições de baixa vazão. Os perfis obtidos serão utilizados

para determinar a concentração de cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose em amostras de soro fisiológico, KCl injetável e soro glicosado, respectivamente.

Para tanto, é necessário um estudo crítico e detalhado das características e condições nos quais os perfis Schlieren podem ser explorados e das configurações de fluxo mais adequadas para isso. A metodologia proposta gera uma grande quantidade de informações químicas e, por isso, requer a utilização de ferramentas quimiométricas de análise multivariada.

As maiores vantagens da exploração do efeito Schlieren na análise química são que nenhum reagente é empregado, que utiliza baixo volume de amostras e que não utiliza detectores de radiação caros.

## **1.2 Objetivo e Metas**

### **1.2.1 Objetivo geral**

- Desenvolver um fotômetro à base de LED e fototransistor associado a um sistema automático de análises por injeção em fluxo para investigar as propriedades dos sinais analíticos gerados por efeito Schlieren, em condições de baixa vazão. Os perfis gerados serão empregados na determinação do teor de NaCl, KCl e glicose em soros fisiológico, KCl injetável e soro glicosado, respectivamente.

### **1.2.2 Metas**

- Desenvolver um fotômetro à base de LED e fototransistor;
- Desenvolver um sistema de análise por injeção em fluxo acoplado ao fotômetro;

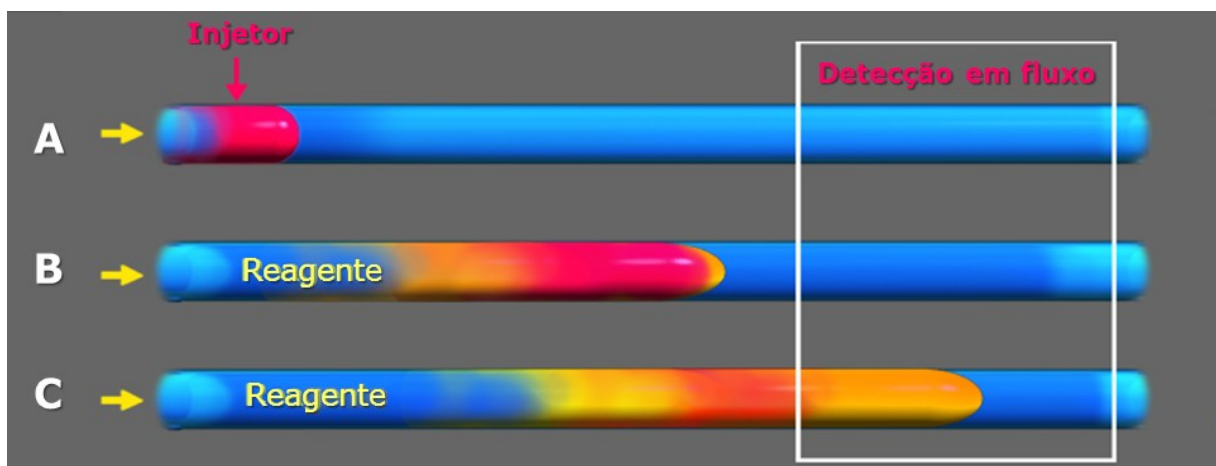
- Registrar os perfis analíticos gerados por efeito Schlieren de soluções padrão de cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose;
- Aplicar o sistema desenvolvido na determinação da concentração de cloreto de sódio e glicose em amostras de soros fisiológicos, respectivamente, e de cloreto de potássio em injetáveis;
- Avaliar a correlação existente entre os perfis Schlieren e a concentração de analitos presentes nas amostras empregando a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).

### 1.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Em meados da década de 70, um impulso crucial foi dado para promover o desenvolvimento da análise em fluxo<sup>[1]</sup>. Este novo tipo de sistema de análise em fluxo foi caracterizado por RŮŽIČKA e HANSEN<sup>[2]</sup> com o nome de Análise por Injeção em Fluxo (do inglês, *Flow Injection Analysis* – FIA) e minimiza as dificuldades operacionais associadas às análises e parte dos custos associados com a quantidade de reagentes utilizados.

Em FIA, um pequeno volume fixo de amostra é injetado como uma zona discreta dentro de um líquido carregador não segmentado e é transportada em direção ao detector. Enquanto é transportada, a zona da amostra é progressivamente dispersa dentro do carregador por convecção e por difusão axial e radial sob condições de fluxo laminar. Entretanto, algumas configurações de sistemas FIA podem trabalhar sob condições de fluxo turbulento quando se deseja uma mistura mais eficiente entre amostra e reagente(s)<sup>[3]</sup>. Os reagentes, quando requeridos, podem ser adicionados em pontos de confluência e se misturam com a zona da amostra sob a influência de dispersão radial ou fluxo turbulento para produzir espécies reativas e detectáveis por uma das variedades de dispositivos de detecção em fluxo. A extensão da mistura ou reação e o

tempo de reação são controlados pela vazão, pelo volume e pela geometria do canal. Assim, o intervalo de tempo entre a injeção da amostra e a detecção do analito pode ser reprodutível. A altura ou área do sinal em forma de pico assim obtido pode ser usada para quantificar o analito através do uso da técnica da curva analítica. Todo o processo acima descrito pode ser rapidamente realizado usando quantidades mínimas de amostra e reagentes, com grande precisão e pode ser resumido em três etapas fundamentais, conforme pode ser visto na **FIGURA 1.1**.

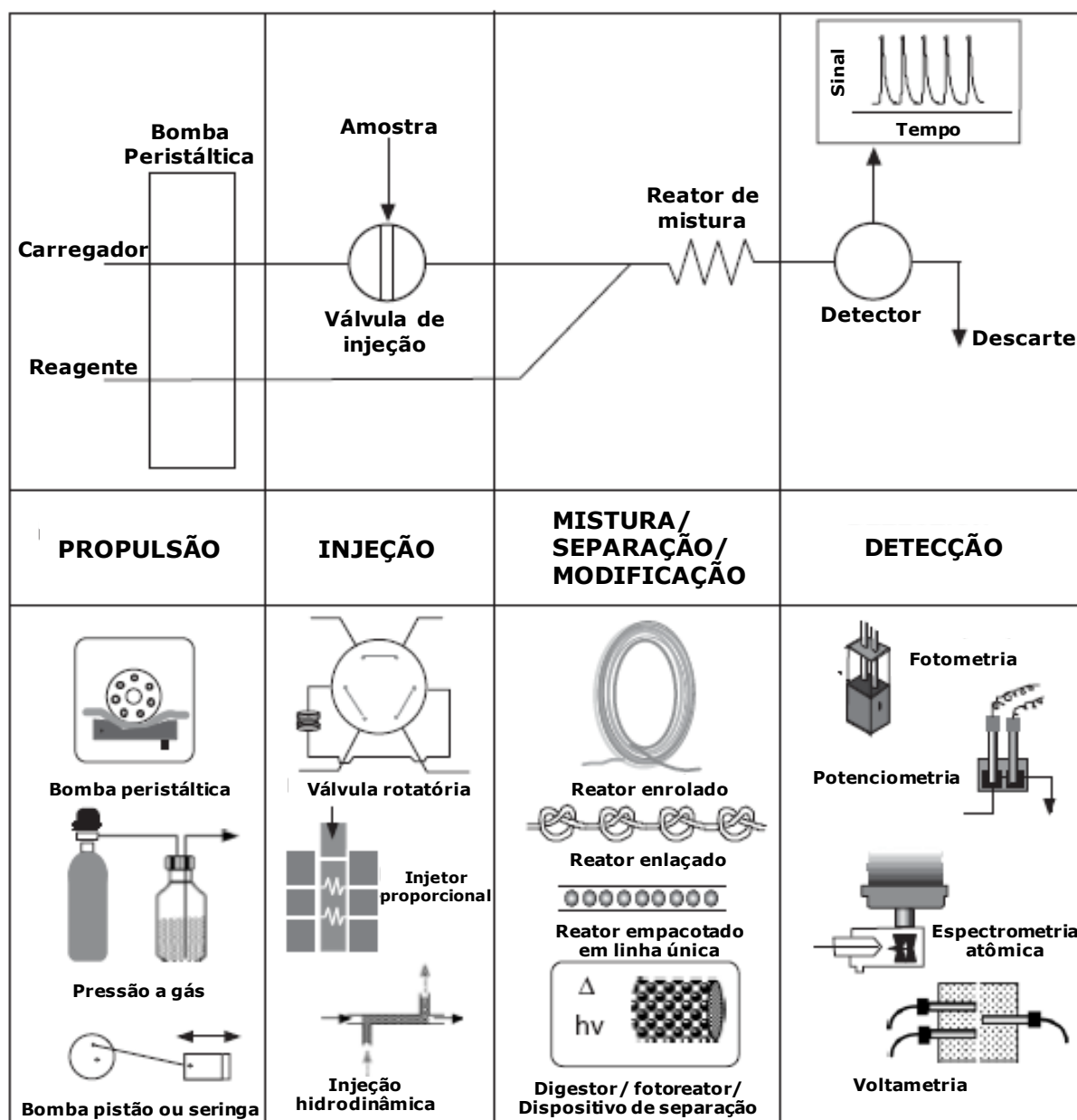


**FIGURA 1.1.** A injeção da amostra **(A)** é a primeira etapa, na qual um volume fixo da solução do analito é inserido dentro de um fluido carregador contendo o reagente. Como a zona da amostra (em vermelho) se move através do fluxo **(B)**, o processo de dispersão mistura a amostra com o reagente, formando um produto da reação (em amarelo). A detecção do analito **(C)** é realizada em fluxo. Adaptada da Ref. [4].

### 1.3.1 Componentes básicos de um sistema FIA

A **Figura 1.2** mostra alguns dos componentes comuns que são usados para as várias operações unitárias no processo de análise em fluxo; por exemplo, propulsão, injeção, reação/mistura/modificação e detecção. O conjunto das bombas, válvulas, tubos de fluxo e detector é muitas vezes referido como a configuração do sistema.





**FIGURA 1.2.** Diagrama esquemático de um sistema FIA, mostrando várias opções para introdução de amostras e reagentes, injeção, mistura e detecção. Adaptada da Ref. [5].

Um sistema FIA básico consiste normalmente de quatro partes essenciais<sup>[6]</sup>:

- (a) Um **sistema de propulsão**, que impele os fluidos por todo o percurso analítico do sistema. Idealmente, ele deveria promover um fluxo de vazão constante livre de pulsação e perfeitamente reprodutível.

- (b) Um **sistema de injeção** ou inserção para introdução de volumes fixos de amostra dentro de um fluido carregador de maneira reprodutível.
- (c) Um **sistema de transporte** conectando os vários elementos que compõem o sistema FIA e permitindo que a amostra atinja um grau adequado de dispersão ou mistura enquanto é transportada.
- (d) Um **sistema de detecção** permitindo o monitoramento contínuo de uma dada propriedade da amostra ou de seu produto de reação, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre a matriz.

Os sistemas FIA podem ser configurados numa ampla variedade de modos diferentes, dependendo da aplicação desejada. Os modos mais elementares são o normal, nFIA<sup>[7],[8],[9]</sup>, e o reverso, rFIA<sup>[10],[11]</sup>. O modo normal tem sido descrito através da injeção da amostra dentro de um fluido carregador. Em seguida, a zona da amostra se une ao(s) reagente(s) e são bombeados para a cela de fluxo do detector para registro do sinal analítico. No FIA reverso, ocorre o caminho oposto; a amostra é inserida continuamente dentro do sistema e atua como carregador. Desta forma, o reagente é injetado dentro do fluxo da amostra quando requerido para a determinação analítica.

As principais vantagens do rFIA são: (a) a economia na disposição de reagentes e resíduos gerados; (b) a possibilidade de se fazer várias determinações diferentes no mesmo fluxo de solução da amostra pela injeção de várias alíquotas de diferentes reagentes, por exemplo; e (c) uma possível melhoria da sensibilidade analítica devido à mistura mais eficiente entre amostra e reagente(s). Para executar este modo de FIA é necessário que haja amostra em abundância, como acontece na análise de águas<sup>[12]</sup>, por exemplo. Quando mais de um reagente é adicionado, o

processo é referido como multicomutação<sup>[13],[14]</sup>. Outra vantagem importante da modalidade de rFIA é que, por ajuste contínuo *online* dos índices de refração dos reagentes injetados e do carregador antes que a reação ocorra, erros devidos ao efeito Schlieren podem ser superados<sup>[15]</sup>.

### 1.3.1.1 Sistema de propulsão

A **Figura 1.2** mostra alguns dos dispositivos que têm sido utilizados em sistemas por injeção em fluxo para liberação de soluções carregadora e reagente, onde os fluxos requeridos estão tipicamente na faixa de 0,2 a 4,0 mL min<sup>-1</sup><sup>[5]</sup>. Bombas peristálticas e bombas seringa (ou pistão) (**Figura 1.3**) são as unidades de propulsão de fluidos mais comumente utilizadas em FIA devido a capacidade de bombeamento de várias linhas de carregador/reagente(s) simultaneamente<sup>[12]</sup>.



**FIGURA 1.3.** Dispositivos comerciais mais utilizados para propulsão de fluidos: (a) bomba peristáltica; (b) bomba seringa.

Historicamente, bombas peristálticas têm sido favorecidas, provavelmente por causa de sua pronta disponibilidade e capacidade multicanal. Todavia, as bombas peristálticas apresentam algumas limitações: (a) produzem ligeira pulsação dos fluxos; (b) a elasticidade dos tubos causa alteração gradual da vazão; e (c) é necessário substituir

os tubos regularmente. Além disso, a interrupção, a reinicialização ou a inversão do fluxo não pode ser instantânea devido ao momento de torque do motor, o que pode ser problemático em medidas em fluxo interrompido ou em métodos de injeção sequencial<sup>[5]</sup>. A incompatibilidade dos tubos elásticos de bombas peristálticas com ácidos ou bases concentradas e solventes orgânicos normalmente força a recalibração periódica do sistema ou a incorporação de tubos resistentes mais caros. A adsorção física de analitos orgânicos nos tubos de Tygon® é outra limitação prática comumente descrita<sup>[12]</sup>. No entanto, bombas peristálticas ainda são a escolha mais popular de dispositivos de propulsão multicanal utilizadas em FIA.

Bombas pistão, que são comumente empregadas em cromatografia líquida, também podem ser utilizadas em FIA. Um dispositivo relacionado é a bomba seringa conduzida mecanicamente, que pode liberar fluxos na faixa de poucos nanolitros a muitos mililitros por minuto e que, além disso, promove um fluxo livre de pulsação. Contudo, o fluxo proveniente de uma bomba seringa é descontínuo, pois a seringa deve ser periodicamente preenchida. Este problema é solucionado quando se utiliza uma válvula solenoide ou uma válvula rotatória para comutar a injeção e/ou a aspiração do fluxo, revertendo-se, para tanto, o sentido do fluxo.

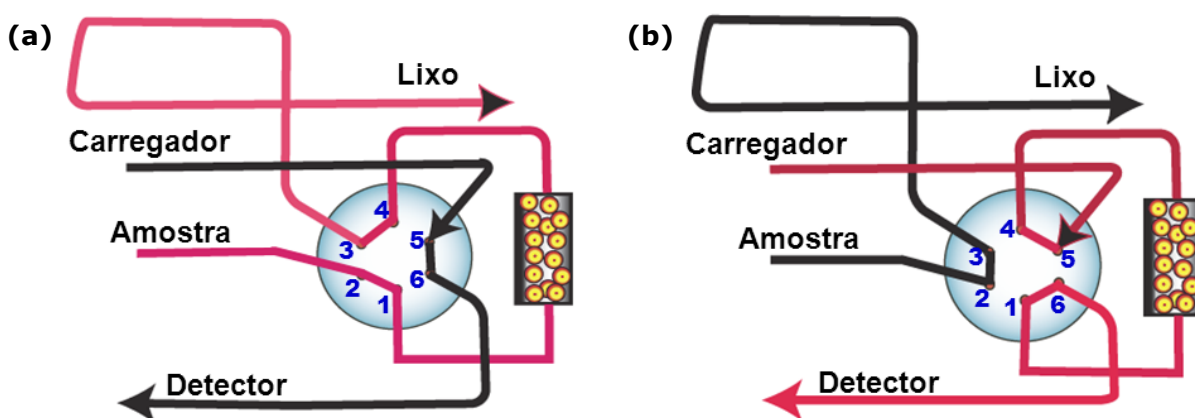
Outros mecanismos empregados na propulsão dos fluidos em sistemas FIA são baseados em gravidade<sup>[16]</sup>, pressão gasosa<sup>[17]</sup>, bombas de membrana ou solenoides<sup>[18]</sup>, bombas de aquário<sup>[19]</sup>, microbombas dinâmicas<sup>[20],[21]</sup> (fluxo eletrosmótico, bombas eletrohidrodinâmica, magnetohidrodinâmica, ultrassônica, etc), dentre outros.

### **1.3.1.2 Sistema de injeção**

Os sistemas FIA e sua progênie contam com a injeção reprodutível de microlitros de amostras ou reagentes. Nos mais antigos sistemas FIA foram utilizados dispositivos de injeção através de um septo de borracha

com uma seringa e foi, a partir desta prática, que se originou o termo "FIA".

A necessidade por injeções automáticas cada vez mais precisas proporcionou o desenvolvimento de válvulas rotatórias (**Figura 1.4**). Estas válvulas têm sido amplamente empregadas em sistemas FIA e SIA<sup>[22]</sup> (do inglês, *Sequential Injection Analysis*), especialmente em instrumentos comerciais completamente automatizados para uso laboratorial<sup>[5]</sup>.

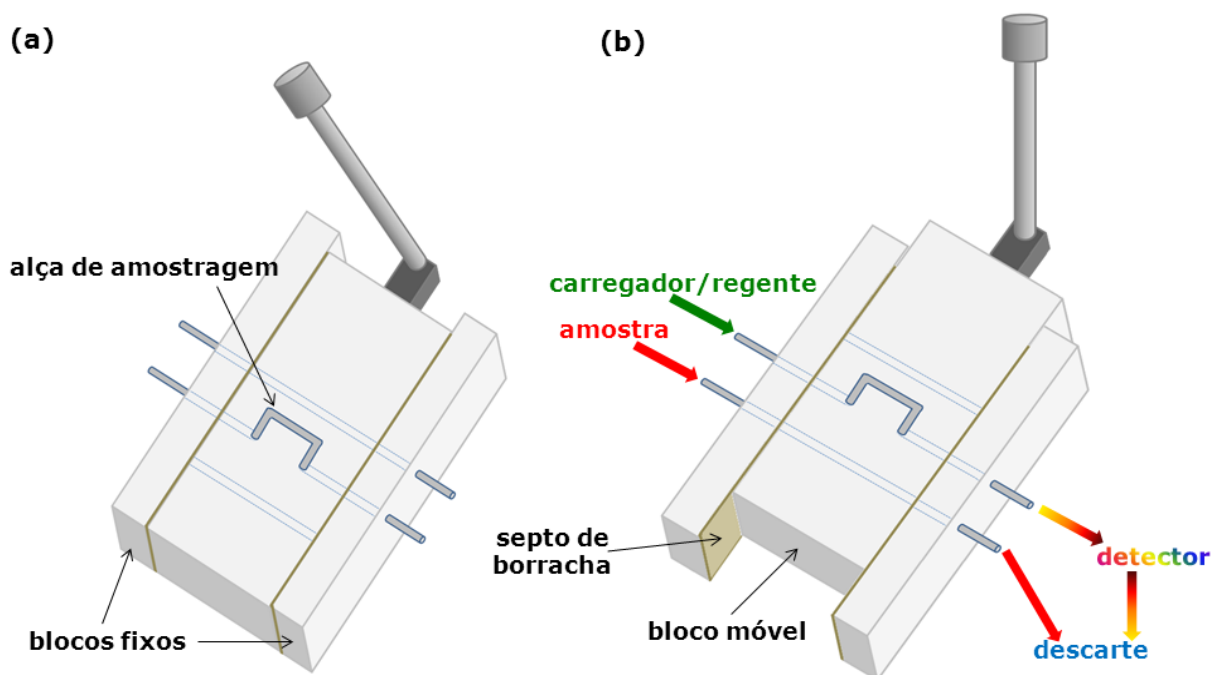


**FIGURA 1.4.** Diagrama esquemático do funcionamento de uma válvula rotatória nas posições de (a) amostragem e (b) injeção.

A válvula rotatória pode trabalhar em duas diferentes configurações: amostragem e injeção. No modo de amostragem (**Figura 1.4a**), a amostra passa através da porta 2, enche a alça de injeção que está localizada entre as portas 1 e 4, e, então, vai para o descarte através da porta 3. Ao mesmo tempo, o fluido carregador entra para a válvula de injeção através da porta 5 e sai em direção à porta 6. No modo injeção (**Figura 1.4b**), o carregador entra na válvula através da porta 5. Nesse modo, a porta 5 está conectada internamente com a porta 1 e o fluido carregador varre o canal da amostra em direção ao detector através da porta 4, a qual está conectada com a porta 6 (porta de saída). Ao mesmo tempo, a amostra entra na válvula pela porta 2, que está conectada internamente com a porta 3, através da qual é enviada para o descarte.

Para alternar entre os dois modos (amostragem e injeção), a válvula deve girar sob um ângulo de 90°. Bolhas de ar e pressão não uniforme dos tubos devem ser evitadas durante a injeção, pois elas modificam o padrão do fluxo em sistemas FIA, afetando a dispersão e a precisão.

Outro dispositivo de injeção bastante empregado em FIA, o injetor proporcional (**Figura 1.5**), foi desenvolvido por BERGAMIN e colaboradores<sup>[23]</sup> e tem sido empregada em sistemas FIA com aprisionamento de zonas<sup>[24]</sup> (*zone-trapping*) e em sistemas de análise em fluxo monossegmentado<sup>[25],[26]</sup> (MSFA; do inglês, *Monosegmented Flow Analysis*).



**FIGURA 1.5.** Injetor proporcional nas posições de (a) amostragem e (b) injeção.

Um injetor proporcional consiste, geralmente, de três blocos perfurados de acrílico justapostos em forma de sanduíche, sendo que a parte central pode ser deslocada em relação às duas laterais. Desta forma, o injetor pode assumir duas posições diferentes, uma para enchimento/amostragem e outra para injeção, respectivamente.

Na posição de amostragem, um canal do sistema de propulsão (normalmente uma bomba peristáltica) circula continuamente a amostra através de uma alça de amostragem em direção ao descarte; simultaneamente, o outro canal é usado para circular o carregador através de outra alça, transportando-o, assim, à cela de fluxo do detector e, subsequentemente, ao descarte. Na posição de injeção, a alça de amostragem é descolocada para a posição do canal do carregador e a amostra é inserida dentro do sistema para consequente transferência ao detector; simultaneamente, um tubo presente no bloco móvel é colocado na posição da alça de amostragem de modo a direcionar o fluido da amostra ao descarte.

No injetor proporcional, o volume é definido pelo comprimento e pelo diâmetro interno da alça de amostragem. Em vista disso, para variar o volume da alíquota de amostra a ser injetado, basta trocar a alça de amostragem. Isso proporciona grande flexibilidade ao processo de injeção, pois se uma amostra estiver muito concentrada, pode-se diminuir o comprimento da alça de amostragem, sem causar perturbação no processo de medida<sup>[27]</sup>.

Analogamente ao que acontece no injetor proporcional, na injeção hidrodinâmica<sup>[28],[29]</sup> o comprimento conhecido do canal é usado para definir o volume da amostra que será inserida no fluxo carregador. Neste caso, os fluxos da amostra e do carregador são redirecionados por comutação das bombas peristálticas ou válvulas solenoides de três vias de modo a preencher a alça de amostragem. Esta abordagem é intrinsecamente mais confiável que o uso de válvulas rotatórias ou injetores proporcionais, pois não existe o mesmo potencial de desgaste mecânico dos rotores ou comutadores das válvulas<sup>[28]</sup>. A reprodutibilidade da injeção também é comparável com as válvulas rotatórias ou injetores proporcionais<sup>[28]</sup>.

Uma alternativa às técnicas de injeção volumétricas descritas acima é a injeção baseada em tempo. Este tipo de injeção depende do

bombeamento ou drenagem da amostra dentro do canal através de uma conexão a uma vazão constante por um período de tempo definido. As válvulas solenoides devem ser operadas enquanto o fluido carregador é parado de modo a evitar pulsação indevida do fluxo, fornecendo, assim, um modo conveniente de desempenho desses injetores. A robustez dessa técnica se deve ao fato de que o volume a ser injetado pode ser facilmente variado por alteração do tempo de abertura da válvula solenoide. A injeção baseada em tempo é ideal para rFIA, pois os canais dos reagentes não precisam ser purgados, uma quantidade muito pequena de reagentes pode ser consumida e, além disso, existe quantidades de amostra em abundância para análise.

### **1.3.1.3 Sistema de transporte**

Os arranjos mais comuns de sistemas FIA são, geralmente, compreendidos de tubos ou canais, com diâmetro interno de 0,3 a 1,0 mm, para manter condições de fluxo laminar e dispersão controlada das zonas de amostras injetadas ou reagentes. Conectores e junções dos tubos devem ter um volume morto negligenciável. Neste caso, o volume morto é definido como o volume mínimo necessário ao preenchimento dos conectores e junções com os fluidos de amostras ou reagentes.

Os principais tipos de tubos utilizados em sistemas FIA são os tubos de bombeamento (normalmente empregados em bombas peristálticas) e os tubos de condução.

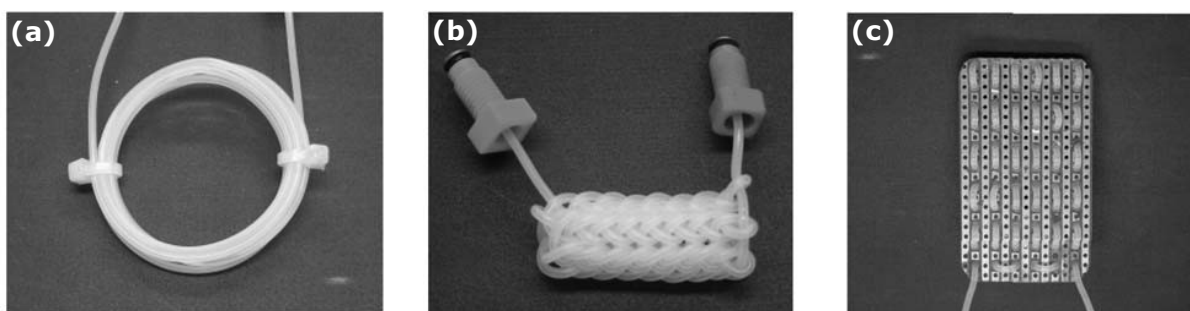
Para a propulsão dos fluidos tubos flexíveis estão disponíveis em diferentes materiais, dependendo do tipo de fluido a ser impelido<sup>[30]</sup>. Dois colares são geralmente colados perto das extremidades de cada tubo da bomba. Os objetivos destes colares são: (a) servir como pontos de ligação entre os arreios da bomba e (b) identificar o diâmetro interno e, conseqüentemente, a vazão a partir do código de cores dos colares. A incompatibilidade entre os tubos das bombas peristálticas com ácidos e



bases concentradas e solventes orgânicos usualmente força a recalibração periódica do sistema FIA ou a incorporação de tubos mais caros resistentes a estes reagentes. A adsorção física dos analitos orgânicos em tubos de PVC (cloreto de polivinila, conhecido comercialmente como Tygon<sup>®</sup>) é outra limitação prática comumente descrita.

Já para a condução dos fluidos, alguns tubos, como os de PTFE (politetrafluoretileno, conhecido comercialmente como Teflon<sup>®</sup>), são utilizados por serem quimicamente inertes. Contudo, tubos de Tygon<sup>®</sup> também são adequados para uma ampla variedade de reagentes. Quando o bombeamento de solventes é requerido pelo sistema, tubos de Solvaflex<sup>®</sup> devem ser empregados. Configurações de microcanais consistindo de blocos poliméricos com canais esculpidos, gravados ou mecanicamente desenhados também têm sido utilizadas, mas a desvantagem é que são, geralmente, empregados em análises químicas de detecção particular.

Tubos enrolados (**Figura 1.6a**) são normalmente utilizados para promover mistura radial e, conseqüentemente, a reação entre as zonas injetadas de amostra e reagente(s). Se o raio da espiral é suficientemente pequeno, o fluxo secundário é induzido de modo a aumentar a mistura radial. Por esta razão, tubos enlaçados (**Figura 1.6b**) ou reatores serpenteados (**Figura 1.6c**) são empregados por promoverem mistura radial superior com dispersão mínima quando comparadas com reatores tubulares enrolados.



**FIGURA 1.6.** Dispositivos de mistura comumente utilizados em FIA: (a) tubo reator de PTFE enrolado em espiral, (b) tubo reator enlaçado e (c) tubo reator serpenteado.

Outros dispositivos como reatores empacotados em linha única, reatores empacotados e misturadores do tipo jato coaxial também já foram empregados, mas seus usos são menos comuns. A mistura entre fluxos de amostra e reagentes depende das características do ponto de confluência. Uma mistura também pode ser produzida pelo uso da multicomutação se os segmentos da amostra e reagente injetados adjacientemente forem suficientemente pequenos, permitindo a dispersão de um dentro do outro enquanto os fluidos são transportados.

#### **1.3.1.4 Sistema de detecção**

Um sistema de análise em fluxo requer um ou mais dispositivos de detecção, dependendo do tipo de análise química ou da quantidade de analitos a ser investigados. Os principais tipos de detecção utilizados em FIA têm empregado medidas de absorbância, fluorescência, quimiluminescência, emissão ou absorção atômica, absorção no infravermelho, pH, potencial de eletrodo, corrente de difusão, condutividade elétrica, turbidez, massa, dentre outros.

Os dispositivos de detecção devem ter um volume mínimo (cerca de 6 a 30  $\mu\text{L}$ ), de modo a evitar aumentos indevidos na dispersão da zona da amostra, tempos longos de limpeza e aprisionamento de bolhas ou adsorção de produtos de reação coloridos.

Idealmente, os detectores e sensores para analisadores por injeção em fluxo deveriam: (a) produzir sinais rápidos e reprodutíveis sem efeitos de histerese; (b) ter uma resposta linear dentro de uma ampla faixa de concentração; e (c) ser resistentes ao desgaste mecânico, à degradação química e à interferentes, quando expostos a um grande número de amostras com matrizes complexas e agressivas. O uso de técnicas de análise por injeção em fluxo confere algumas vantagens nessa perspectiva, uma vez que o detector/sensor precisa apenas ser exposto às

amostras por breves períodos, minimizando assim o potencial de danos ou contaminação.

#### 1.4 Detecção fotométrica

O termo fotometria não é utilizado sistematicamente em toda a literatura científica. Num sentido geral, é utilizado para descrever a “medida de quantidades associadas com a luz”<sup>[31]</sup>, muitas vezes, restrita apenas aos comprimentos de onda que produzem estímulos visuais. A fotometria também pode se referir ao ramo da astronomia observacional para as medidas da magnitude aparente de estrelas<sup>[32]</sup>. Além disso, pode ser usado para descrever a avaliação das propriedades de fontes de luz, tais como características da radiação (especialmente a intensidade luminosa), temperatura de cor e índice de restituição de cor em imagens coloridas<sup>[33]</sup>.

Para os químicos analíticos, a fotometria está geralmente associada com as medidas de absorvância para os propósitos de quantificação de analitos usando instrumentos específicos chamados fotômetros. Historicamente, a fotometria esteve restrita a medidas na faixa de comprimentos de onda na região do visível (390-800 nm), mas atualmente regiões do ultravioleta próximo e infravermelho próximo (190-1000 nm) do espectro eletromagnético também têm sido utilizadas com frequência. Apesar da faixa de comprimentos de onda fornecidos pelo fotômetro, as medidas de absorção com fotômetros são tipicamente feitas num comprimento de onda de emissão máxima característico.

Quando a Análise em Fluxo Contínuo (CFA; do inglês, *Continuous Flow Analysis*) segmentada por bolhas de ar foi introduzida em 1957 por SKEGGS<sup>[34]</sup>, ele lançou sua engenhosa técnica para determinações fotométricas automáticas. Apesar de outras técnicas de detecção já terem sido adaptadas para CFA, a fotometria tem permanecido o mais usado

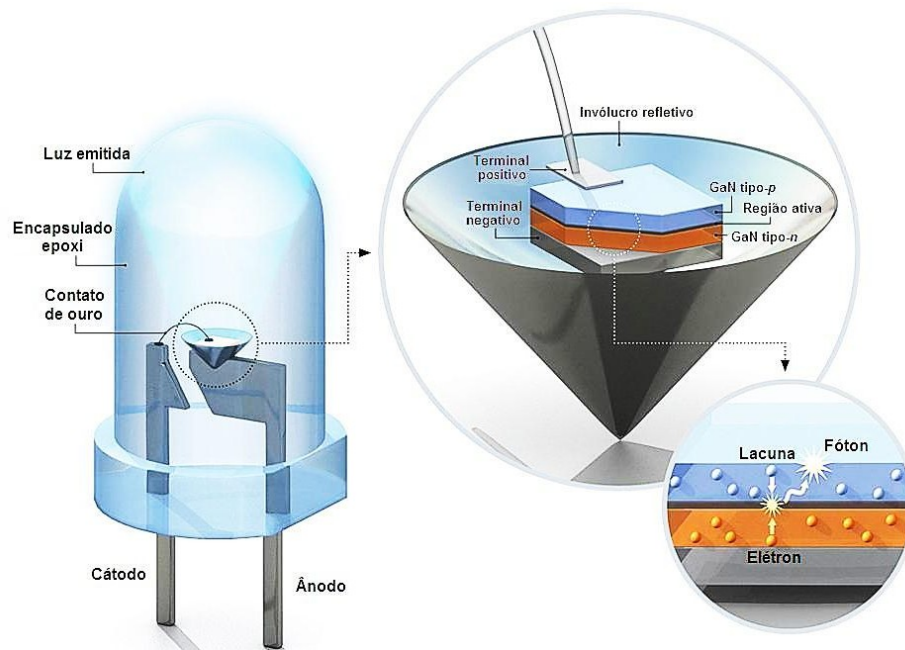
princípio de detecção, com a consequência de um vasto número de protocolos validados terem se tornado métodos de referência.

Uma vez que foi inicialmente desenvolvida como uma configuração alternativa para automação de procedimentos químicos em via úmida, a análise por injeção em fluxo teve seu conceito demonstrando nas primeiras publicações e patentes usando, principalmente, detecção fotométrica<sup>[35]</sup>.

Os métodos fotométricos foram facilmente adaptados aos sistemas FIA, pois medidas de absorvância realizadas em fluxo já tinham sido utilizadas em CFA antes mesmo do advento da FIA. No entanto, é evidente que as condições requeridas para detecção ótima em FIA foram um pouco diferentes daquelas para CFA. De fato, os fotômetros relativamente volumosos que podem ser equipados com cubetas de fluxo não são muito compatíveis com as variedades de FIA tipicamente de pequeno porte. No decorrer do desenvolvimento do FIA (e, posteriormente, várias técnicas relacionadas), a busca por detectores alternativos possibilitou o surgimento de muitas inovações e modificações no que diz respeito à cela de fluxo, mas também à configuração geral da instrumentação espectrofotométrica. Muitos destes desenvolvimentos têm levado ao melhoramento do desempenho analítico e, em muitos casos, têm favorecido a miniaturização dos sistemas FIA e técnicas relacionadas.

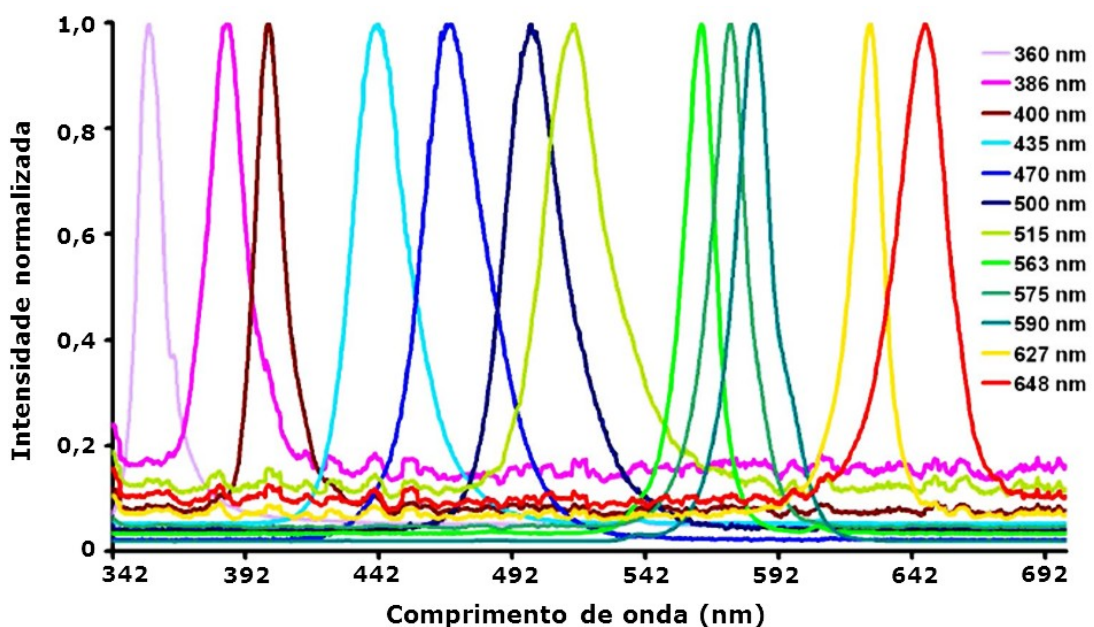
#### **1.4.1 Detectores fotométricos à base de LEDs**

Nas últimas décadas, os LEDs (diodo emissor de luz; do inglês, *light emitting diode*) têm sido amplamente empregados para detecção de absorvância, uma vez que constituem uma alternativa simples ao uso de lâmpadas de tungstênio, filtros e lentes óticas. Além disso, eles oferecem muitas características adicionais bastante atrativas. Na **Figura 1.7** é mostrado o diagrama esquemático dos constituintes de um LED comum e seu funcionamento.



**FIGURA 1.7.** Diagrama esquemático dos constituintes e do funcionamento de um LED comum.

Os LEDs são fontes de luz eletroluminescente focalizada e estritamente miniaturizadas que fornecem radiação cobrindo toda a faixa do ultravioleta próximo até o infravermelho distante [36],[37]. Na **Figura 1.8** podem ser vistos espectros típicos de emissão de vários LEDs, comercialmente disponíveis, na faixa espectral do ultravioleta-visível.



**FIGURA 1.8.** Espectros de emissão típicos de uma seleção de LEDs, comercialmente disponíveis, na faixa espectral do UV-vis. Adaptado da Ref. [37].

LEDs multicolors comutáveis (com emissores estritamente espaçados de modo que a localização da fonte de radiação pode ser considerada a mesma) e LEDs brancos (que fornecem uma emissão quase contínua) também constituem fontes de radiação úteis para fotometria.

Alguns LEDs que estão disponíveis atualmente são “ultrabrilhantes”, têm vida útil extremamente longa e alta estabilidade de emissão. Além disso, são baratos, consomem pouca energia e os componentes eletrônicos necessários ao seu controle são muito simples. Em combinação com um fotodiodo ou fototransistor para detecção de luz, estes dispositivos de estado sólido podem ser fabricados e são altamente robustos, podendo ser alimentados com pilhas ou bateria.

Inicialmente, os detectores à base de LED eram atrativos por não exigirem conhecimentos avançados de eletrônica e os componentes eletrônicos empregados de baixo custo facilmente disponíveis. Nesta perspectiva, detectores foram aplicados em sistemas FIA para propósitos educacionais ou quando alto desempenho não foi requerido<sup>[38]</sup>. Esforços subsequentes foram feitos para projetar celas de fluxo para fácil troca da fonte LED ou múltiplas fontes de LED comutável para fornecer o comprimento de onda requerido para uma aplicação particular<sup>[39],[40]</sup>.

Numa configuração alternativa, a detecção em um tubo transversal é feita usando capilares semitransparentes de PTFE como uma pseudocubeta<sup>[41],[42]</sup>. Esta configuração fornece volumes mortos muito pequenos e os problemas práticos de aprisionamento de bolhas de ar (comum para celas de fluxo em forma de U e Z) são totalmente eliminados. Configurações similares têm sido utilizadas com capilares de vidro ou quartzo<sup>[43],[44],[45],[46]</sup>, os quais são mais transparentes e, devido à sua natureza hidrofílica, são molháveis por soluções aquosas. Isso reduz a possível adsorção de compostos orgânicos com aumento concomitante da absorbância de linha de base com o tempo. É evidente que a curta extensão do caminho óptico da configuração de detecção transversal é desfavorável em relação à sensibilidade, mas, em algumas aplicações

práticas isso tem sido vantajoso, pois a faixa dinâmica foi estendida para níveis mais elevados de concentração.

Uma discussão da fabricação desses fotodetectores foi realizada em uma revisão publicada por DASGUPTA e colaboradores<sup>[47]</sup> e numa outra recente revisão feita por O'TOOLE e DIAMOND<sup>[37]</sup>.

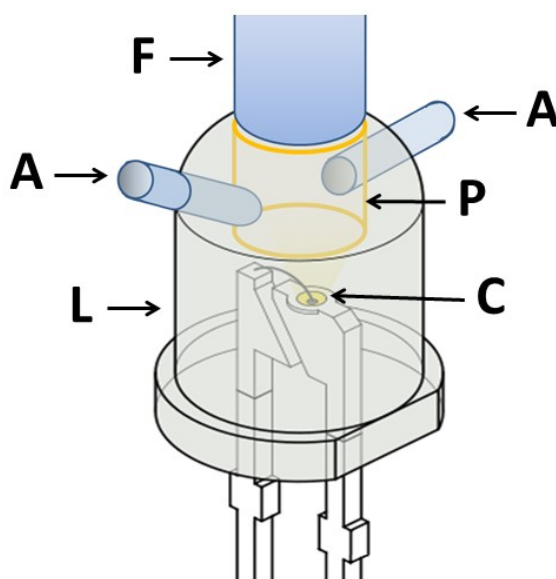
Apesar de sua fácil e ampla disponibilidade, LEDs não estão disponíveis para cobrir todos os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) possíveis, pois apresentam bandas de emissão dentro de uma faixa específica (ver **FIGURA 1.8**). Por isso, o seu uso para medidas exatamente na máxima absorbância de um composto colorido é possível apenas em casos específicos, isto é, quando coincidem com o  $\lambda$  máximo de emissão do LED. Além disso, a denominação "fonte de luz monocromática" é otimista, uma vez que larguras de banda espectral típicas estão na faixa de 20 a 100 nm, que na melhor das hipóteses é a de um fotômetro de filtro comum. Estas duas características dos LEDs podem ter uma influência negativa sobre medidas de absorbância. Neste caso, a sensibilidade máxima possível geralmente não é atingida e a faixa dinâmica linear (em que a lei de Lambert-Beer é obedecida) é, muitas vezes, reduzida em comparação com medidas espectrofotométricas comuns usando uma fonte de luz branca e um monocromador de grade.

Uma diminuição da sensibilidade do detector ocorre quando os desvios entre o  $\lambda$  máximo de absorbância do analito e o  $\lambda$  de emissão de LED aumentam<sup>[39],[48]</sup>. Uma vez que muitas aplicações práticas não requerem alta sensibilidade, isso não é visto como uma limitação restritiva.

Projetos publicados de detectores de absorbância baseados em LEDs para medidas em fluxo são diversos. Muitas opções para configurações de celas de fluxo e os dados comparativos de desempenho também são fornecidas na revisão feita por DASGUPTA e colaboradores<sup>[47]</sup>. Fontes de luz LED e fotodetectores também podem ser usados em combinação com celas de fluxo comuns usando suportes que

acomodam a cubeta e, em estreita proximidade às paredes da cela, o LED e o fotodetector.

A ideia da cela de fluxo dentro de um LED foi originada de DASGUPTA<sup>[44]</sup>. Uma microcela de fluxo projetada engenhosamente com um volume interno na faixa inferior a nanolitro foi fabricada pela perfuração de um pequeno orifício através do corpo de um LED acima do emissor e subsequente posicionamento muito próximo de uma fibra óptica que conduz ao fotodiodo detector (**Figura 1.9**).



**FIGURA 1.9.** Uma cela de fluxo construída no corpo de um LED. **C**, chip emissor; **A**, abertura de entrada/saída; **P**, luva opaca de PEEK (em laranja); **L**, lente (invólucro exterior); **F**, fibra óptica conduzindo ao fotodiodo detector. O detector pode ser referenciado por um fotodiodo colocado sobre o LED. Redesenhado da Ref. [44].

Devido ao formato em miniatura e ao baixo preço dos componentes optoeletrônicos necessários, celas com LED detectores incorporando diversos elementos emissores foram construídas de diferentes formas. Isso permitiu a determinação multicomponente de diferentes espécies absorventes ou o registro dos sinais em diferentes comprimentos de onda simultaneamente para a correção de radiação de fundo ou compensação do efeito Schlieren. Sistemas de fluxo multicanal também têm sido configurados usando diferentes detectores fotométricos à base de LEDs que são controlados e monitorados por um único computador<sup>[49]</sup>. Outra



abordagem é o uso de fontes de luz multidiódo integradas, de frequência controlada, que fornecem diferentes cores em rápida sequência. Elas têm sido aplicadas na determinação simultânea de misturas de dois e três componentes em combinação com a avaliação dos dados utilizando ferramentas quimiométricas<sup>[50]</sup>. Fibras ópticas acopladas a sistemas LED-fotodiodo<sup>[39]</sup> também foram utilizadas a fim de evitar o contato das partes eletrônicas do detector com a cela de fluxo que transporta o líquido; um arranjo que tem seus próprios problemas se houver algum vazamento em potencial.

As características favoráveis de detectores à base de LED favorecem aplicações nas quais medições podem ser feitas num  $\lambda$  fixo, de modo que um único LED pode servir como fonte de luz, como é o caso de sistemas dedicados de análise. A robustez e o baixo consumo de energia dos LEDs são características que permitem a sua utilização em monitoradores de campo<sup>[41]</sup> e analisadores submersíveis remotamente implantados<sup>[51],[52]</sup>. Um exemplo de aplicação deste último tipo de analisador é a utilização de um detector à base de LED totalmente alimentado por bateria para a determinação de nitrogênio oxidado total<sup>[53]</sup>.

### 1.5 Efeito Schlieren ou efeito do índice de refração

No século 17, Robert Hooke<sup>[54]</sup>, investigando algumas propriedades ópticas relacionadas ao ambiente atmosférico e a soluções aquosas, observou o desvio da luz ao atravessar estes meios quando os mesmos apresentavam gradientes de temperatura diversos. Ele propôs experimentos clássicos<sup>[54]</sup> demonstrando que tanto gradientes de temperatura quanto de concentração podem alterar a propagação da luz<sup>[55]</sup>. Este fenômeno é comumente observado na vida diária e um exemplo prático é o aparecimento de imagens em movimento, de baixa definição, sobre a superfície aquecida de estradas asfaltadas. Este

fenômeno é conhecido como efeito Schlieren<sup>[56],[57]</sup>. Este termo foi introduzido por TOEPLER<sup>[58]</sup> em 1864 como “uma desigualdade da refração óptica de uma massa homogênea”<sup>[55]</sup>.

O índice de refração (IR) é, portanto, uma propriedade inerente dos materiais transparentes (sólidos, líquidos e gases). A refração da luz ocorre quando um feixe de radiação colimada cruza a fronteira de fases de dois materiais transparentes em um ângulo diferente do normal. O ângulo de desvio depende da diferença entre os índices de refração das duas fases. Este efeito pode ser utilizado em refractometria para caracterizar espécies químicas ou determinar a composição de misturas binárias de soluções miscíveis<sup>[59],[60]</sup>. Outra aplicação típica da refractometria está em cromatografia líquida, onde a vantagem está na natureza não específica do detector de IR, ou seja, qualquer mudança da composição da fase móvel causada por eluição do analito é registrada<sup>[61],[62]</sup>.

### **1.5.1 Análise por injeção em fluxo e efeito Schlieren**

Nos sistemas de análise por injeção em fluxo, quando as condições de mistura são adequadas e constantes, o perfil analítico dos sinais produzidos pelas amostras são, geralmente, reprodutíveis e ausentes de ruído. Todavia, quando a zona da amostra apresenta gradientes de concentração e estes se associam aos gradientes de IR<sup>[63]</sup>, os sinais analíticos se tornam ruidosos, diminuindo, assim, a sensibilidade analítica<sup>[64],[65]</sup>. Conseqüentemente, a variação do IR pode ser um fator limitante para medidas espectrofotométricas em sistemas FIA, acarretando sérios efeitos sobre a exatidão, a precisão e os limites de detecção<sup>[64],[66]</sup>. Isso ocorre porque qualquer mudança no IR entre o fluido carregador e a amostra ou reagente injetado provoca uma mudança na transmissão da luz através da cubeta ou da cela de fluxo. Em outras palavras, o efeito estático do IR pode ser causado por uma perda do reflexo de luz variável na interface entre a janela óptica e o líquido dentro

da cubeta ou da cela de fluxo; no entanto estas perdas são geralmente negligenciáveis.

Em 1977, KRUG e colaboradores<sup>[67]</sup> descreveram pela primeira vez o efeito Schlieren em um sistema FIA desenvolvido para a determinação turbidimétrica de sulfato em águas naturais e digeridos de plantas. Após a injeção de um branco ou de uma amostra no fluido carregador, o efeito foi verificado visualmente ao se olhar diretamente a zona que atravessava o caminho óptico da cela de fluxo. A imagem observada aumentava e diminuía de tamanho durante a passagem da zona da amostra. Isto pode ser compreendido como um conjunto de lentes associadas à zona da amostra que podem ou não desviar a radiação de maneira errática. Estes artefatos ópticos conduzem a flutuações indesejáveis na luz transmitida, dando origem a sinais ruidosos, comprometendo o limite de detecção e reprodutibilidade das medidas.

Tentativas de minimizar os efeitos adversos que o efeito Schlieren pode exercer em sistemas fotométricos FIA são direcionadas tanto para a prevenção ou redução da formação de Schlieren, quanto para projetar detectores óticos que são tolerantes às mudanças no IR. Muitas vezes, ambas as estratégias são aplicadas em conjunto<sup>[3]</sup>.

Nos sistemas FIA, nos quais os fluxos do transportador e do reagente confluem, a formação Schlieren ocorre nas bobinas de mistura e esta é muitas vezes a principal razão para flutuações de linha de base na detecção de absorbância, o que afeta negativamente os limites de detecção. Para reduzir este tipo de ruído de linha de base é necessário combinar os fluxos do transportador e dos reagentes tanto quanto possível em relação aos seus índices de refração. Isso pode ser realizado ajustando-se, por exemplo, viscosidade e teor de sal, melhorando a mistura dos fluxos usando tubos enlaçados, reatores empacotados ou câmaras de mistura e aperfeiçoando a configuração óptica. Estas estratégias são razoavelmente eficazes quando a matriz da amostra é constante (como é o caso, por exemplo, na análise de água do mar,

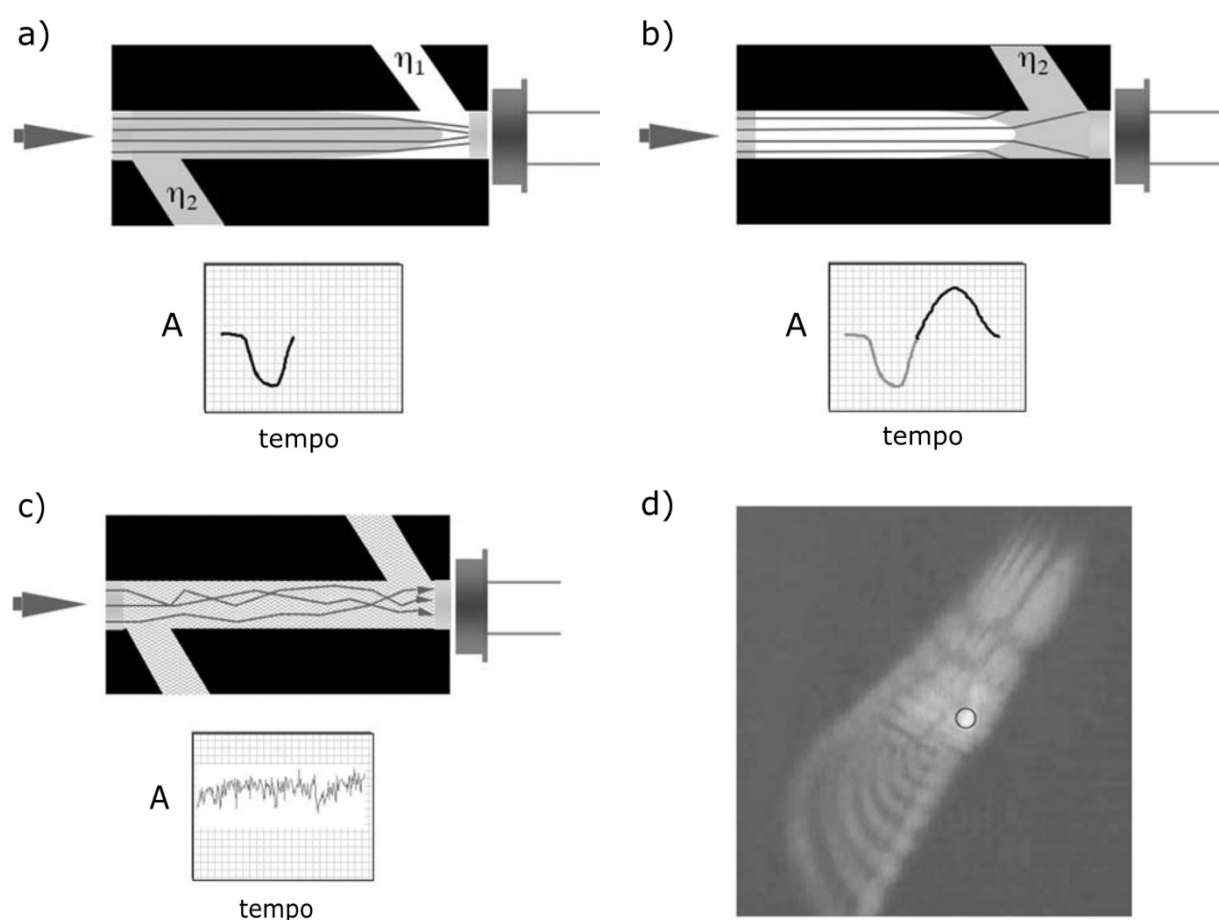
soluções de digestão, extratos ou fluxos de processo industrial). Entretanto, isso não é eficaz quando as amostras apresentam matrizes altamente variáveis, tais como quando águas de estuário são analisadas. Sob tais circunstâncias, ajuste de matriz ou abordagens mais convencionais, como a adição de padrão ou preparação de padrões na matriz adequada não são viáveis, especialmente se um grande número de amostras está envolvido.

DIAS e colaboradores<sup>[68]</sup> verificaram que propriedades e parâmetros, tais como a vazão, a solubilidade e a interação da zona da amostra com as paredes dos tubos, são componentes críticos que influenciam o efeito Schlieren e estudaram a utilização de dois comprimentos de onda para a compensação desse efeito. Eles identificaram que duas formas de ocorrência de IR ou efeito Schlieren pode ocorrer em sistemas de análise em fluxo.

O primeiro efeito, que é bastante reprodutível, ocorre quando o IR de um líquido injetado difere daquele do líquido do recipiente. Abaixo das condições de fluxo laminar, os limites interfaciais da quantidade injetada podem formar lentes líquidas parabólicas na cabeça e na cauda da zona da amostra injetada. A luz que passa ao longo do eixo óptico de uma cela de fluxo é refratada por essas lentes. Dependendo da intensidade relativa dos IR's da amostra e do carregador, pode haver a dispersão ou a convergência dos raios de luz da fonte em direção ao detector ou para longe deste, dando origem aos sinais ou picos Schlieren (**Figura 1.10a e b**). O efeito Schlieren ocorre mesmo na ausência de um cromóforo e pode ser uma fonte maior de erros de quantificação se for ignorado<sup>[69]</sup>.

O segundo efeito está associado com variações localizadas nos IR's de elementos da amostra injetada e carregador/reagentes que surgem devido a diferenças de temperatura, viscosidade ou concentração, o que é agravado por pulsações da bomba e ineficiente mistura das zonas dos fluxos confluentes. Este efeito produz uma mistura "estriada" dentro da cela de fluxo e gera ruído de linha de base aleatória (**Figura 1.10c**).

Ambos os efeitos são vistos claramente na imagem Schlieren projetada mostrada na **Figura 1.10d**. Ela é uma imagem projetada obtida por um laser em 660 nm através de uma cubeta de fluxo de 1,5 mm de diâmetro interno e caminho óptico de 10 mm contendo água de injeção com salinidade de 35 g L<sup>-1</sup> em um carregador de água deionizada. A forma irregular da imagem se deve a não uniformidade do fluxo de líquido dentro da cela de fluxo.



**FIGURA 1.10.** Representação esquemática dos efeitos do índice de refração em análise de fluxo. As figuras (a) e (b) mostram o efeito esperado de lentes Schlieren quando o IR da zona de amostra,  $\eta_2$ , é maior que a do fluxo transportador,  $\eta_1$ , enquanto a figura (c) ilustra como a heterogeneidade do líquido pode causar ruído adicional ao detector. Ambos os efeitos das lentes Schlieren e estrias dos líquidos podem ser vistos na figura (d). O ponto brilhante no centro da imagem corresponde à abertura da cela de fluxo. Adaptado da Ref. [70].

McKELVIE e colaboradores<sup>[69]</sup> elaboraram um sistema FIA para a determinação de fósforo reativo total em águas de rio. Ele utilizou um

sistema de compensação salina para minimizar o efeito Schlieren, evitando a necessidade de ajuste de matriz ou correção de altura de pico.

LAPA e colaboradores<sup>[63]</sup> propuseram um sistema multicomutado com amostragem binária para a determinação espectrofotométrica de pindolol em fármacos. O ruído associado ao efeito Schlieren foi eliminado utilizando duas soluções processadas *on-line* de modo a produzir um fluido carregador com concentração similar à da zona da amostra, o que previne a formação do efeito Schlieren.

Outra abordagem de prevenção da formação do efeito Schlieren em sistemas FIA foi proposto por YAMANE e SAITO<sup>[71]</sup> e envolveu o uso de grande volume de injeção e seleção das janelas de integração para que a resposta do sinal seja obtida a partir da parte média do pico, excluindo, assim, os picos Schlieren que estão confinados à frente e atrás do pico. Este método foi utilizado com sucesso na análise de água salobra, mas a definição cuidadosa das janelas de integração é fundamental, e há a desvantagem que a frequência analítica é reduzida pela injeção de grandes volumes.

AUFLITSCH e colaboradores<sup>[15]</sup> também propuseram um sistema FIA para compensação de salinidade a fim de superar o efeito Schlieren, porém, na análise de águas estuarinas. Isto envolveu uma combinação de ajuste de matriz e injeção de reagente. Um reagente cromogênico foi injetado em um carregador salino com o mesmo IR. Esse fluxo misto foi fundido com um fluxo de amostra continuamente bombeado. Portanto, não houve variações discretas no IR ocorrido durante todo o procedimento analítico e nenhum efeito de lentes Schlieren foi observado.

O efeito Schlieren também pode ser significativamente reduzido quando o fluxo é interrompido. Embora isso não favoreça uma mistura completa de soluções, as heterogeneidades do IR dentro do fluxo são reduzidas. Conseqüentemente, a técnica de fluxo interrompido usada em medidas cinéticas e em SIA é menos susceptível a efeitos do IR. No entanto, ela só pode ser empregada para reações mais lentas onde a

formação de cor continua mesmo que a mistura entre a amostra e o(s) reagente(s) já tenha atingido a cela de fluxo.

O efeito Schlieren em detecção de absorbância é particularmente acentuado quando o feixe de luz é colinear com a direção do fluxo (como é o caso de celas de fluxo comumente usadas em forma de U e Z). Uma redução do efeito Schlieren pode ser alcançada ao centrar a fonte de luz na janela de saída, usando celas de fluxo com geometria interna em forma de cone. Uma alternativa mais eficiente é direcionar a luz de forma transversal em todo o fluxo do líquido. Este conceito foi proposto por BETTERIDGE e colaboradores<sup>[43]</sup>, que colocou um LED e um fotodiodo em lados opostos de um tubo coletor transparente do sistema de fluxo. No entanto, a curta extensão do caminho óptico de iluminação transversal é um fator limitante se alta sensibilidade é requerida, e esta lacuna pode ser superada pelo uso de celas de fluxo de reflexão ou multicanal que oferecem caminho óptico moderado com imunidade considerável para efeito Schlieren<sup>[45],[72]</sup>.

Uma abordagem totalmente diferente para compensar os efeitos do IR envolve o uso de detecção de duplo comprimento de onda. Isso se baseia no fato de que os sinais Schlieren semelhantes ocorrem em uma ampla gama de comprimentos de onda. Usando uma detecção do comprimento de onda na máxima absorbância do cromóforo e uma segunda compensação Schlieren altamente efetiva em outro comprimento de onda, separados apenas onde o sinal Schlieren ocorre foi obtida<sup>[64],[73]</sup>. Na prática, a detecção de duplo comprimento de onda foi realizada usando fontes de luz LED com frequência seletiva multicor<sup>[74]</sup> ou detectores de arranjo de diodos<sup>[64]</sup>. Estes últimos têm a vantagem de que os comprimentos de onda de correção podem ser livremente selecionados de acordo com capacidade ótima de compensação do efeito Schlieren.

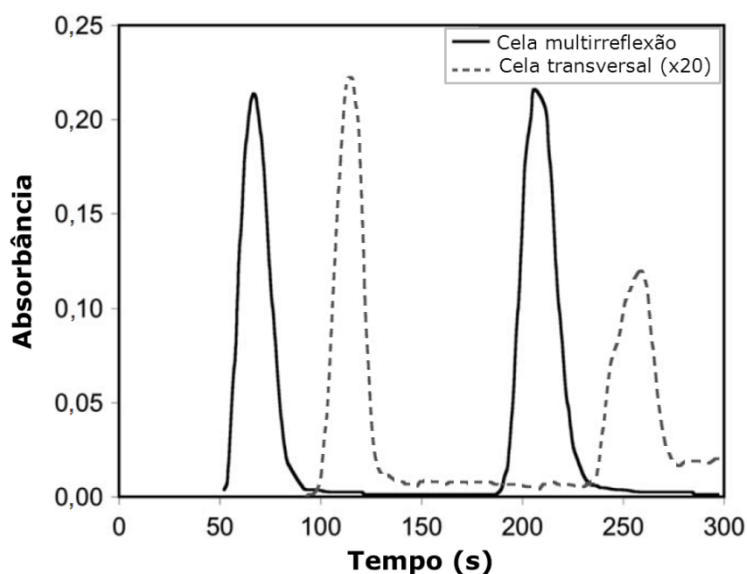
O efeito Schlieren também foi reportado em análises HPLC<sup>[75]</sup> quando uma amostra deixa uma coluna aquecida e alcança o detector a

uma temperatura menor. Tal distúrbio óptico também pode ser compensado por espectrofotometria de duplo comprimento de onda<sup>[76]</sup>.

GOMES e colaboradores<sup>[77]</sup> descreveram um sistema FIA multisseringa para a determinação espectrofotométrica de ferro e boro em extratos de solo. Neste sistema, o efeito Schlieren foi minimizado com a utilização de amostragem binária com uso de um sistema de válvulas solenoides.

O uso de celas com guia de onda de núcleo líquido permite o uso de um aumento considerável da extensão de caminho óptico, porque a luz é propagada pela refração interna total. No entanto, o ângulo de reflexão da luz nas paredes do capilar é bastante grande e os feixes são quase paralelos ao fluxo. A extensão de caminho óptico é, portanto, apenas ligeiramente maior que o tamanho físico do guia de onda do líquido capilar. Conseqüentemente, estas celas tendem a apresentar efeito Schlieren agudo, mas um pequeno aumento da sensibilidade diferente da que é atribuída ao aumento do comprimento físico pode ser alcançado. Neste contexto, celas multirreflexão descritas por ELLIS e colaboradores<sup>[45]</sup> e MISHRA e DASGUPTA<sup>[78]</sup> são um bom compromisso entre uma maior sensibilidade e a tolerância do efeito Schlieren, porque a luz é introduzida através do fluxo e o ângulo de incidência dos feixes de luz introduzidos dessa forma é muito mais agudo em relação à normal da direção do fluxo. Neste caso, uma série de reflexões irá ocorrer ao longo do comprimento de celas de fluxo e o caminho óptico será reforçado em algum grau, evitando os piores extremos de picos Schlieren (**Figura 1.11**).





**FIGURA 1.11.** Comparação da sensibilidade aos efeitos do índice de refração entre uma cela multirreflexão e uma cela transversal de passagem radial única. Para efeitos comparativos, o sinal da cela transversal foi multiplicado por 20. Em ambos os casos a primeira injeção é de 10 mM de azul de bromotimol alcalino e a segunda injeção é o mesmo analito em uma matriz de 100‰ de NaCl. Adaptado da Ref. [78].

É interessante notar que o efeito Schlieren também tem sido intencionalmente utilizado em FIA para determinação do analito. As metodologias analíticas utilizadas para estes fins são discutidas a seguir.

### 1.5.2 Metodologias analíticas que exploram o efeito Schlieren

Apesar de o efeito Schlieren estar associado normalmente a ruídos nos sistemas de análise em fluxo, em situações nas quais as condições de fluxo e a configuração óptica do sistema de detecção são adequadas, os gradientes de índice de refração de amostras incolores geram sinais Schlieren reproduzíveis. Neste contexto, estes perfis foram explorados de modo positivo para análises químicas<sup>[43],[76],[79]</sup>. Embora seja um método promissor de análises, metodologias analíticas que exploram o efeito Schlieren possuem poucas citações na literatura.

BETTERIDGE e colaboradores<sup>[43]</sup> construíram, em 1978, um fotômetro à base de LED com iluminação axial do caminho do fluxo para a determinação de salinidade. Ele observou que a injeção de amostras

incolores utilizando água como fluido carregador gerava um sinal analítico caracterizado por um pico positivo seguido de um pico invertido, os quais foram creditados à formação de um gradiente de concentração dependente do índice de refração e da difusividade das amostras injetadas. A cela empregada favoreceu a obtenção de sinais reproduzíveis e independentes do tipo de substância analisada. Verificou-se também que estas medidas eram dependentes do tipo de substância analisada e que os picos apresentavam perfis irreproduzíveis quando a vazão se encontrava abaixo de  $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ .

SANTOS e colaboradores<sup>[79]</sup> foram os primeiros a analisar as características dos perfis Schlieren em condições de baixa vazão e sem a utilização de bobinas de mistura para a determinação do teor alcoólico de bebidas destiladas. Eles observaram como a geometria da cela influencia no perfil do sinal analítico e que os perfis gerados eram notavelmente diferentes dos diagramas normais. Também observaram que, sob as condições utilizadas nas análises, o pico invertido se apresentava mais reproduzível do que o pico normal. Como vantagens das análises realizadas por este sistema podem ser citadas: (a) não requer uso de nenhum tipo de reagente, apenas água recém-destilada; (b) não requer o tratamento prévio das amostras; e (c) utilizar um fotômetro simples à base de LEDs que substitui espectrofotômetros ou fotômetros mais dispendiosos.

COSTA e colaboradores<sup>[80]</sup> exploraram os perfis Schlieren para a classificação de bebidas alcoólicas empregando técnicas quimiométricas. Os autores observaram que os perfis Schlieren são característicos para os diversos tipos de bebidas analisadas e podem ser utilizados para a verificação de qualidade das mesmas com confiabilidade.

O efeito Schlieren também foi utilizado na determinação de glicol em fluidos de aviação<sup>[81]</sup>. Frequentemente tem sido usado como uma base de medidas (óptica Schlieren) para cromatografia

líquida<sup>[82],[83],[84],[85]</sup> e em procedimentos entalpimétricos envolvendo desvio induzido da luz emitida pelo aquecimento da reação<sup>[86]</sup>.

O desenvolvimento de instrumentos e procedimentos analíticos atualmente levou à necessidade por métodos avançados para o planejamento de experimentos, para a calibração de instrumentos e para analisar os dados resultantes<sup>[87]</sup>. Analogamente, o desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas FIA envolve, no mínimo, três estágios, nos quais a utilização da quimiometria permite a otimização do método, a avaliação dos sinais e os subsequentes procedimentos de calibração<sup>[88]</sup>.

Em FIA, as respostas de diferentes complexidades produzidas no detector fornecem informações analíticas relevantes que podem ser extraídas quimiometricamente. O caso mais simples envolve um dado escalar simples por amostra, como altura ou área do pico, por exemplo. Já os dados multivariados mais complexos consistem de matrizes ou vetores de dados geradas através do tempo ao longo de um pico (fiagrama) em um dado comprimento de onda ou através do registro de todo o espectro em um intervalo de tempo pré-selecionado. Nesta perspectiva, os procedimentos de calibração que podem ser aplicados a cada tipo de dados de modo a quantificar o analito em amostras desconhecidas são, genericamente, chamados de métodos de calibração de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, respectivamente. Tais procedimentos de calibração são amplamente discutidos em duas revisões feitas por KOŚCIELNIAK<sup>[89]</sup> e SAURINA<sup>[90]</sup> para sistemas FIA.

## 1.6 Quimiometria

O termo quimiometria foi introduzido em 1971 para descrever o crescente uso de modelos matemáticos, princípios estatísticos e outros métodos baseados em lógica no campo da química e, em particular, no campo da química analítica<sup>[91],[92],[93]</sup>. Neste contexto, uma das

definições mais citadas de quimiometria foi introduzida por MASSART (94): “quimiometria é uma disciplina da química que usa matemática, estatística e lógica formal (a) para planejar ou selecionar procedimentos experimentais ótimos, (b) para fornecer o máximo de informações químicas relevantes por análise de dados químicos e (c) obter conhecimento sobre sistemas químicos”.

Os rápidos avanços tecnológicos, especialmente na área dos instrumentos computadorizados para química analítica, permitiram e exigiram um crescimento fenomenal no campo da quimiometria nos últimos 30 anos. Na maior parte desse período, os desenvolvimentos têm focado em métodos multivariados. Uma vez que o mundo que nos rodeia é intrinsecamente multivariado, faz sentido tratar múltiplas medições simultaneamente em todo o processo de análise dos dados.

Em um recente artigo, BRO<sup>[95]</sup> descreve quatro vantagens adicionais dos métodos multivariados quando comparados com métodos univariados. A redução do ruído é possível quando múltiplas variáveis redundantes são analisadas simultaneamente por métodos multivariados apropriados. Outra importante vantagem é que medições parcialmente seletivas podem ser usadas e, empregando métodos multivariados apropriados, os resultados podem ser obtidos livres dos efeitos de sinais interferentes. A terceira vantagem é que amostras anômalas podem ser facilmente descobertas, por exemplo, em análise espectroscópica. Para qualquer método quimiométrico bem caracterizado, as propriedades físicas e químicas de amostras reais medidas no futuro podem ser devidamente explicadas por combinações lineares do conjunto de treinamento ou dos espectros de calibração. Espécies químicas estranhas, que dão sinais espectroscópicos ligeiramente diferentes do esperado, podem ser detectadas nos resíduos espectrais e a amostra correspondente é sinalizada como um *outlier* ou amostra anômala. As vantagens da quimiometria são, portanto, frequentemente a consequência do uso dos métodos multivariados.

### 1.6.1 Calibração multivariada

A calibração univariada, conforme já se é sabido, é específica para situações cuja resposta instrumental depende apenas da concentração do analito alvo. Em calibração multivariada<sup>[96],[97],[98]</sup>, parâmetros do modelo podem ser estimados quando as respostas dependem do analito alvo além de outras variáveis físicas ou químicas e, portanto, a calibração multivariada corrige tais efeitos interferentes. Para a  $i$ -ésima amostra de calibração, o modelo com o intercepto diferente de zero pode ser escrito como:

$$y_i = b_0 + x_{i1}b_1 + x_{i2}b_2 + \dots + x_{ij}b_j + e_i, \quad (1)$$

onde  $y_i$  representa a concentração da  $i$ -ésima amostra de calibração,  $x_{ij}$  denota a resposta medida na  $j$ -ésima resposta instrumental correspondente,  $b_j$  simboliza o coeficiente de calibração (inclinação da reta ajustada) e  $e_i$  significa o erro associado com a  $i$ -ésima amostra de calibração, assumindo-se a distribuição normal aleatória,  $N(0,1)$ . Em notação matricial, a **Equação (1)** é ilustrada na **Figura 1.12** e se torna:

$$y = Xb + e, \quad (2)$$

onde  $y$  e  $e$  são vetores ( $n \times 1$ ) para  $n$  amostras de calibração,  $X$  é uma matriz  $\{n \times (m+1)\}$  para  $m$  comprimentos de onda e uma coluna de 1's, se um termo de interseção deve ser usado, e  $b$  é uma matriz  $\{(m+1) \times 1\}$ . Se  $y$  e  $X$  são centrados na média, o termo de interseção é removido das **Equações (1)** e **(2)**.

$$\begin{array}{|c|} \hline y_1 \\ \hline y_2 \\ \hline \cdot \\ \hline \cdot \\ \hline \cdot \\ \hline y_n \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline 1 & x_{1,1} & x_{1,2} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{1,m} \\ \hline 1 & x_{2,1} & x_{2,2} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{2,m} \\ \hline & & & & & & \\ \hline & & & & & & \\ \hline & & & & & & \\ \hline 1 & x_{n,1} & x_{n,2} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{n,m} \\ \hline \end{array} \begin{array}{|c|} \hline b_0 \\ \hline b_1 \\ \hline \cdot \\ \hline \cdot \\ \hline \cdot \\ \hline b_m \\ \hline \end{array}$$

**FIGURA 1.12.** Representação matricial de um modelo de calibração multivariada linear com  $n$  amostras de calibração.  $y_i$  representa a concentração da  $i$ -ésima amostra de calibração,  $x_{ij}$  denota a resposta medida na  $j$ -ésima resposta instrumental correspondente e  $b_j$  simboliza o coeficiente de calibração.

Com calibração multivariada, comprimentos de onda já não têm de ser seletivos para um único analito, mas podem responder agora a outras espécies químicas presentes nas amostras. Entretanto, o espectro para o analito alvo deve ser parcialmente diferente dos espectros de todas as amostras respondentes. Além disso, um conjunto de padrões de calibração deve ser selecionado de modo que seja representativo das amostras que contenham quaisquer espécies interferentes. Em outras palavras, espécies interferentes devem estar presentes no conjunto de calibração em quantidades variáveis. Sob as duas condições acima, é possível construir um modelo de calibração que compense o efeito das espécies interferentes utilizando a regressão por mínimos quadrados. Deve-se notar que, se os papéis das respostas espectrais e as concentrações forem invertidos na **Equação (2)**, como é feito muitas vezes com a lei de Beer, então as informações quantitativas de todos os efeitos físicos e químicos que causem uma resposta nos comprimentos de onda medidos devem ser conhecidas e incluídas no modelo<sup>[99],[100]</sup>. Assim, existem vantagens distintas para expressar o modelo de calibração com na **Equação (2)**, com concentração e respostas instrumentais como as variáveis dependente e independente, respectivamente.

Para se obter uma estimativa do vetor  $\mathbf{b}$  de regressão por uso da **Equação (3)**, ou seja, para assegurar que a inversa  $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1}$  existe, o determinante de  $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})$  não deve ser zero.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y}, \quad (3)$$

onde  $\mathbf{b}$  simboliza o vetor dos coeficientes de regressão estimados e  $\mathbf{X}^T$  é a transposta da matriz de respostas instrumentais.

Isso significa que é necessário que  $n \geq (m+1)$  com um termo de interseção e  $n \geq m$  sem um termo de interseção. Deste modo, espectros completos não podem ser usados e o analista deve selecionar os comprimentos de onda a ser modelados. Este tipo de modelo, que requer comprimentos de onda selecionados para manter  $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$  não singular, é frequentemente referido na literatura como modelo de regressão linear múltipla (MLR; do inglês, *Multiple Linear Regression*). Apesar de comprimentos de onda terem sido selecionados de modo que  $n \geq (m+1)$  com um termo de interseção ou  $n \geq m$  sem um termo de interseção,  $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$  ainda pode ser singular ou aproximadamente singular, com a segunda situação sendo mais comum devido ao ruído espectroscópico. Este é o problema da colinearidade espectral (sobreposição espectral ou seletividade) e, portanto, estimativas da concentração podem ser seriamente prejudicadas. Assim, a seleção de comprimentos de onda específicos a serem incluídos no modelo é crítica para o seu desempenho. Discussões aprofundadas sobre colinearidade (ortogonalidade espectral) bem como sobre métodos para diagnosticar colinearidade e a dimensão do envolvimento de cada espécie química estão disponíveis na literatura<sup>[99]</sup>. Na **Seção 1.6.1.1.2** são descritas algumas das ferramentas de diagnóstico do desempenho do modelo e figuras de mérito para calibração multivariada.

Geralmente, a colinearidade (singularidade próxima) não é um problema com técnicas de regressão tendenciosas como a regressão por

componentes principais (PCR; do inglês, *Principal Component Regression*) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS; do inglês, *Partial Least Squares*). Na [Seção 1.6.1.1](#) é descrito o método de regressão por mínimos quadrados parciais, o qual não necessita de seleção de variáveis para estimar o vetor  $\mathbf{b}$  de regressão dado na [Equação \(2\)](#). No entanto, a formação dos modelos por esses métodos requerem a determinação de pelo menos um metaparâmetro (parâmetro de regularização), onde o metaparâmetro é usado para evitar a singularidade próxima de  $\mathbf{X}$ . Técnicas de seleção de variáveis também podem ser usadas com estes métodos tendenciosos, mas o requerimento de  $n \geq (m+1)$  ou  $n \geq m$  não é aplicável.

Como nota final, o modelo da [Equação \(2\)](#) pode ser expresso para incluir outros analitos alvo ao invés de apenas um. Nesta situação o modelo se expande para:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \mathbf{E}, \quad (4)$$

onde  $\mathbf{Y}$  é  $n \times k$  para  $k$  analitos e  $\mathbf{B}$  aumenta para  $m \times k$  com uma coluna de coeficientes de regressão para cada analito. Uma solução para a matriz de regressão já é obtida pela [Equação \(3\)](#), com  $\mathbf{Y}$  e  $\mathbf{B}$  substituindo  $\mathbf{y}$  e  $\mathbf{b}$ . Quando um modelo é construído para múltiplos analitos, comprimentos de onda determinados são selecionados, em contraste com os modelos para analitos específicos expressos pela [Equação \(2\)](#), os quais se baseiam na seleção de comprimentos de onda pertinentes a cada analito alvo.

### 1.6.1.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A regressão por mínimos quadrados parciais foi desenvolvida por H. Wold no campo da econometria no final da década de 1960. Durante a década de 1970, grupos dirigidos por S. Wold e H. Martens popularizaram o uso do método para aplicações químicas.



Dois métodos diferentes estão disponíveis, chamados PLS1 e PLS2. Em PLS1, modelos de calibração separados são construídos para cada coluna em  $Y$ . Em PLS2, um único modelo de calibração é construído para todas as colunas de  $Y$  simultaneamente.

As propriedades estatísticas de PLS2 ainda não são bem compreendidas. A solução produzida por PLS2 é dependente de como os cálculos iterativos são inicializados. Uma prática usual é inicializar PLS2 com a coluna de  $Y$  com a maior correlação com  $X$ . A inicialização com outras colunas produz resultados diferentes.

#### 1.6.1.1.1 Procedimento matemático

Em PLS, a matriz de resposta  $X$  é decomposta em uma forma similar a análise por componentes principais, gerando uma matriz de escores (*scores*),  $T$ , e uma de pesos (*loadings*) ou fatores,  $P$ . (Estes vetores também podem ser referidos como vetores base.) Uma análise similar é executada para  $Y$ , produzindo uma matriz de escores,  $U$ , e uma de pesos,  $Q$ .

$$X = TP^T + E, \quad (5)$$

$$Y = UQ^T + F, \quad (6)$$

O objetivo de PLS é modelar todos os constituintes que formam  $X$  e  $Y$  de modo que os resíduos  $E$  para o bloco  $X$  e os resíduos  $F$  para o bloco  $Y$  sejam aproximadamente iguais à zero. Uma relação interna também é construída relacionando os escores do bloco  $X$  aos escores do bloco  $Y$ .

$$U = TW, \quad (7)$$

O modelo acima é aperfeiçoado pelo desenvolvimento de uma relação interna. Uma vez que vetores latentes (base) são calculados para ambos os blocos independentemente, eles podem ter apenas uma fraca relação um com o outro. Uma vez que o modelo completo é calculado, as equações acima podem ser combinadas para gerar uma matriz de vetores de regressão, sendo uma para cada componente em  $Y$ :

$$B = P(P^T P)^{-1} W Q^T, \quad (8)$$

$$Y = X B, \quad (9)$$

Várias descrições do algoritmo PLS existem na literatura. Para algumas das diferenças que surgem no caminho, a normalização é utilizada. Em outras descrições, nem os escores nem os pesos são normalizados. Noutras ainda, nem os pesos ou escores podem ser normalizados. As diferenças resultam em diferentes expressões para os cálculos de PLS; no entanto, os vetores de regressão estimados para  $b$  devem ser os mesmos, exceto para diferenças no erro de arredondamento.

#### 1.6.1.1.2 Diagnóstico do modelo

Devido aos erros aleatórios nas medidas, os parâmetros estimados para modelos de calibração mostram alguns pequenos desvios aleatórios,  $e_i$ , dos valores verdadeiros. Para os modelos de calibração PLS, assume-se que os erros em  $y_i$  são pequenos, aleatórios e não correlacionados, seguem a distribuição normal e são maiores que os erros em  $x_i$ . Vale ressaltar que este nem sempre é o caso.

Em calibração multivariada são utilizadas, tipicamente, estratégias diferentes para determinação do nível de erro de previsão para um modelo. Três figuras de mérito para estimativa de erros em  $y_i$  são

discutidas nesta seção: (a) a raiz do erro quadrático médio da calibração (RMSEC; do inglês, *root mean square error of calibration*), (b) a raiz do erro quadrático médio da previsão (RMSEP; do inglês, *root mean square error of prediction*), também conhecido como RMSEV para validação, e (c) a raiz do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV; do inglês, *root mean square error of crossvalidation*).

O RMSEC indica o grau de concordância entre os valores de concentração estimados pelo modelo de calibração para as amostras de calibração e os valores verdadeiros aceitos para as amostras de calibração usadas para obter os parâmetros do modelo na **Equação (2)** de acordo com a **Equação (10)**:

$$RMSEC = \frac{1}{n - m - 1} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2, \quad (10)$$

Devido a estimativa dos parâmetros do modelo ( $b_0, b_1, \dots, b_m$ ),  $m+1$  graus de liberdade e os  $n-m-1$  graus de liberdade remanescentes são usados para estimar o RMSEC. Se o intercepto  $b_0$  é omitido para o modelo de calibração, então o número de graus de liberdade para o RMSEC é  $n-m$ . Se os dados tiverem sido centrados na média, os graus de liberdade permanecem  $n-m-1$ . Normalmente, o RMSEC fornece estimativas excessivamente otimistas da capacidade preditiva do modelo de calibração para as amostras reais medidas. Isto acontece porque uma porção do ruído nos padrões é modelada inadvertidamente pelos parâmetros estimados. Uma melhor estimativa da capacidade preditiva do modelo de calibração pode ser obtida pelo método da validação cruzada com as amostras de calibração ou a partir de um conjunto separado de amostras de validação.

Para obter o RMSEP, as amostras de validação preparadas e medidas independentemente a partir das amostras de calibração são utilizadas. O número de amostras de validação,  $p$ , deve ser grande, para

que o erro de previsão estimado reflita precisamente todas as fontes de variabilidade no método de calibração. O RMSEP é calculado por

$$RMSEP = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p (y_i - \hat{y}_i)^2, \quad (11)$$

A abordagem da validação cruzada também pode ser usada para estimar a capacidade preditiva do modelo de calibração. Um método de validação cruzada é a *leave-one-out crossvalidation* (LOOCV). A LOOCV é executado estimando-se  $n$  modelos de calibração, onde cada uma das  $n$  amostras de calibração é deixada de fora uma de cada vez. Os modelos de calibração resultantes são, então, usados para estimar a amostra deixada de fora, a qual atua como uma amostra de validação independente e fornece uma previsão independente de cada valor de  $y_i$ ,  $\hat{y}_i$ , onde a notação  $i$  indica que a  $i$ -ésima amostra foi deixada de fora durante a estimativa do modelo. Este processo de deixar uma amostra fora é repetido até que todas as amostras de calibração tenham sido deixadas de fora. As previsões  $\hat{y}_i$  podem ser usadas na **Equação (11)** para estimar o RMSECV. Entretanto, a LOOCV tem sido usada para determinar modelos que apresentam modelagem de informação útil associada a ruído (*overfitting*), pois muitos parâmetros são incluídos. O mesmo é verdadeiro para validação cruzada cujo conjunto de calibração é dividido dentro de  $v$  grupos distintos de aproximadamente o mesmo tamanho e um grupo é deixado de fora em cada ciclo para servir como um conjunto de validação independente. Essa deficiência pode ser superada se uma validação cruzada Monte Carlo (MCCV), também chamada de *leave-multiple-out crossvalidation* (LMOCV), é usada. Na MCCV, o conjunto de calibração é dividido de modo que o número de amostras de validação é maior que o número de amostras de calibração. Um valor da MCCV médio é obtido a partir de um grande número de divisões aleatórias. Em resumo, enquanto alguns autores preferem a abordagem LOOCV quando pequenos números

de amostras de calibração são usados; o RMSECV resultante também tende a dar uma estimativa excessivamente otimista da capacidade preditiva do modelo de calibração.



*A liberdade guiando o povo.* Eugène Delacroix, 1830.

"Só é merecedor da liberdade e da vida quem tem de conquistá-la de novo todos os dias." – Goethe

# **METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

## **Capítulo 2**

## 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 2.1 Reagentes, soluções e amostras

Para construção dos modelos de calibração para cada analito foram utilizadas soluções padrão de NaCl (Carlo Herba<sup>®</sup>) 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2% (m v<sup>-1</sup>), de glicose (Merck<sup>®</sup>) 2,0; 4,0; 6,0; 0,8 e 10,0% (m v<sup>-1</sup>) e de KCl (Merck<sup>®</sup>) 4, 8, 12, 16 e 20% (m v<sup>-1</sup>).

Foram analisadas 5 amostras injetáveis de KCl, 5 de soro fisiológico e 5 de soro glicosado. Todas as amostras foram adquiridas em drogarias da cidade de João Pessoa-PB e de lotes diferentes.

As análises de referência dos três analitos (cloreto de sódio<sup>[101]</sup>, cloreto de potássio<sup>[102]</sup> e glicose<sup>[103]</sup>) foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira.

Água sempre recém-destilada e posteriormente deionizada por um sistema de purificação Milli-Q Plus<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA) foi usada nas preparações de todas as soluções.

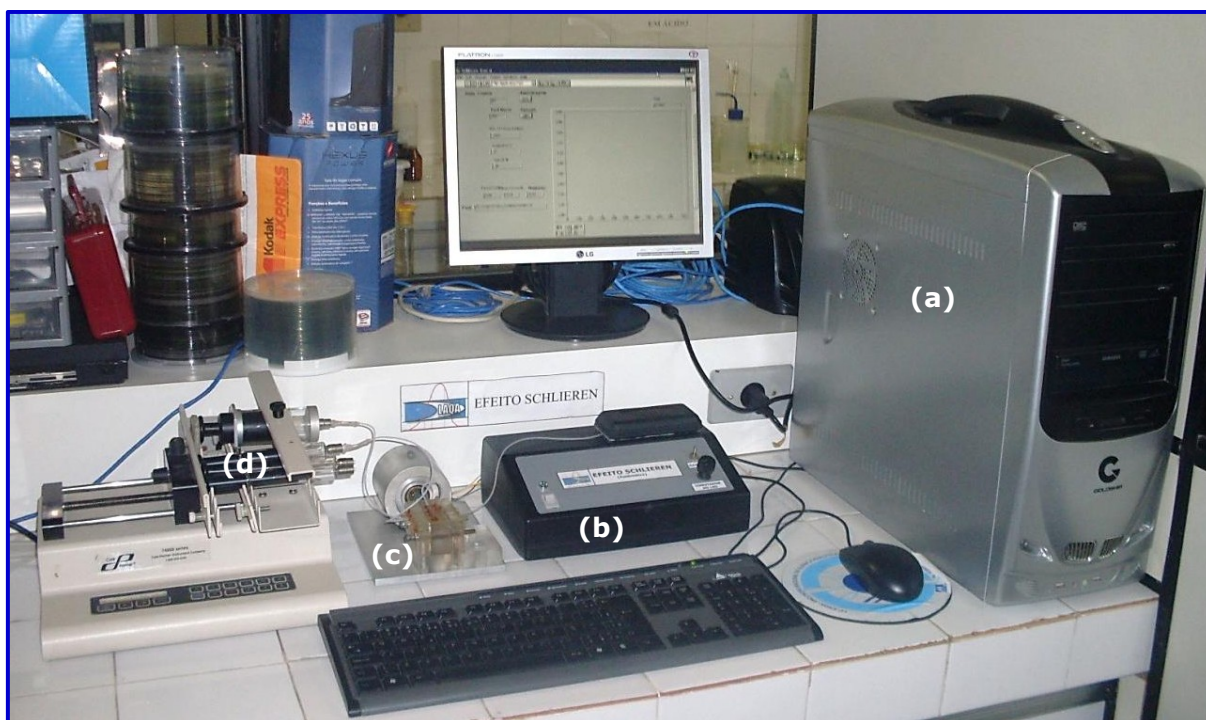
### 2.2 Materiais e equipamentos

Para descrever e ilustrar os materiais e equipamentos que foram empregados na montagem do sistema FIA em linha única para exploração fotométrica do efeito Schlieren desenvolvido, bem como a disposição física de seus componentes, uma fotografia é mostrada na **Figura 2.1**.

A propulsão dos fluidos no sistema foi realizada por uma bomba seringa da Cole Parmer<sup>®</sup>, modelo 74900 Series, com capacidade para até oito seringas. A unidade para injeção da amostra dentro da linha do carregador foi um injetor proporcional controlado mecanicamente (**Seção 2.2.1**). Para a detecção dos perfis Schlieren foi construído um fotômetro à base de LED e de fototransistor, descrito na **Seção 2.2.2**.

O injetor proporcional e o fotômetro foram conectados a um microcomputador Pentium<sup>®</sup> Dual Core, com 2 GBytes de memória RAM,

através de uma interface eletrônica PCL-711, descrita na **Seção 2.2.3**. O controle do sistema e a aquisição dos dados foram realizados através de um programa escrito em ambiente visual LabVIEW<sup>®</sup>, versão 5.1. Para tratamento dos dados foi utilizado o programa The Unscrambler<sup>®</sup> 7.1 da CAMO S/A.

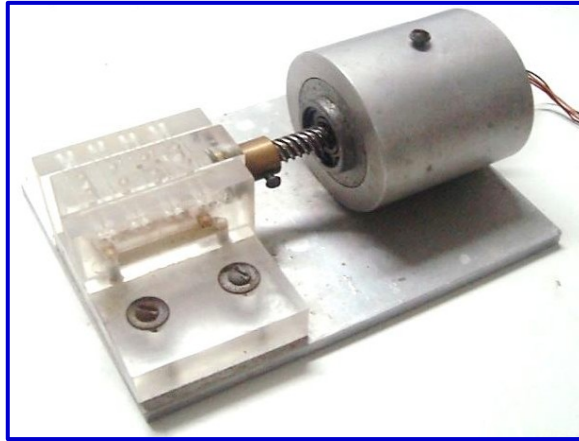


**Figura 2.1.** Fotografia do sistema FIA-Schlieren automatizado. (a) Microcomputador; (b) fotômetro à base de LED e fototransistor; (c) injetor proporcional; (d) bomba seringa.

### 2.2.1 Injetor proporcional

As amostras foram introduzidas no fluido carregador usando um injetor proporcional mecanicamente controlado (**Figura 2.2**). O injetor é constituído de três blocos de acrílico paralelos entre si contendo pequenos canais por onde passam os fluxos. O bloco central desliza paralelamente aos outros dois, desviando, assim, o fluxo para o canal de interesse do usuário. O movimento do bloco central deslizante é promovido por um motor de passos, o qual é controlado através do programa computacional escrito em ambiente visual LabVIEW<sup>®</sup>, descrito na **Seção 2.2.4**.



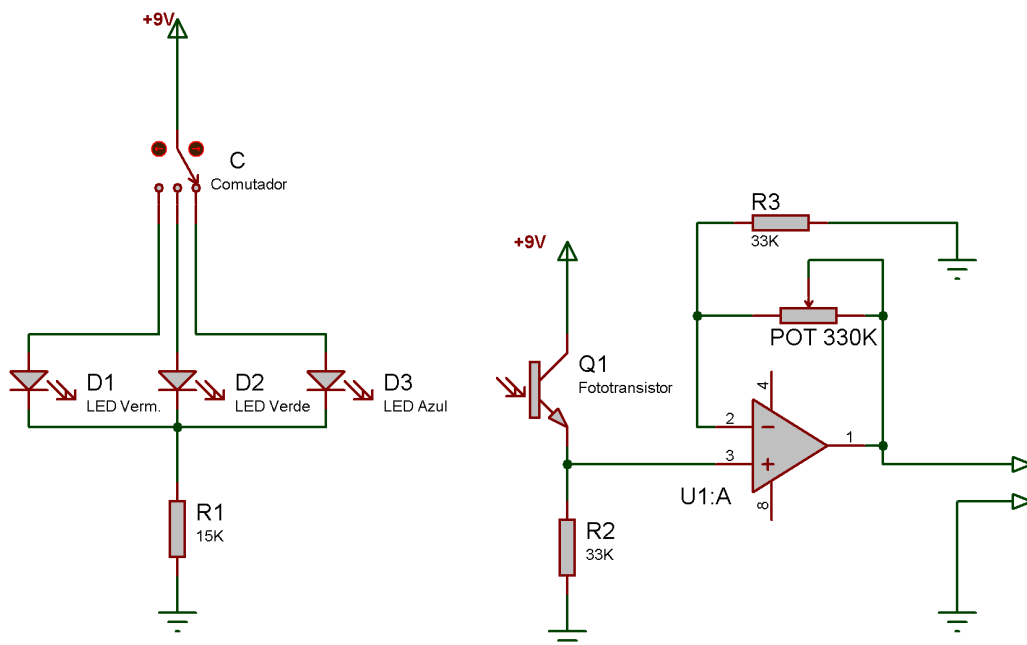


**FIGURA 2.2.** Injetor proporcional mecanicamente operado por motor de passos.

### 2.2.2 Fotômetro à base de LED e fototransistor

O sistema de detecção empregado no sistema FIA-Schlieren desenvolvido consistiu de um fotômetro de fluxo *labmade* à base de um LED tricolor (RS247-1511) com máximas emissões em 470 nm (azul), 565 nm (verde) e 625 nm (vermelho) e de um fototransistor (RS284-1342).

O diagrama do circuito eletrônico do fotômetro é apresentado na **Figura 2.3.**



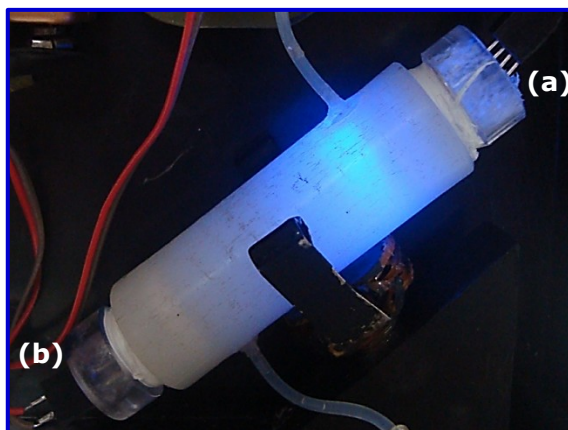
**FIGURA 2.3.** Circuito eletrônico do fotômetro de fluxo.

O circuito é composto de um amplificador operacional 3140 com amplificação de sinal pela entrada não inversora. O sinal gerado no resistor de 33 K do emissor do fototransistor é amplificado até 10 vezes por ajuste adequado do potenciômetro de 330K da malha de realimentação do amplificador. O ganho de sinal é ajustado através de um botão externo ("Ganho") localizado acima do "Comutador do LED", conforme pode ser visto na **Figura 2.4**. A região selecionada pelo retângulo vermelho abriga a cela de fluxo (**Figura 2.5**).



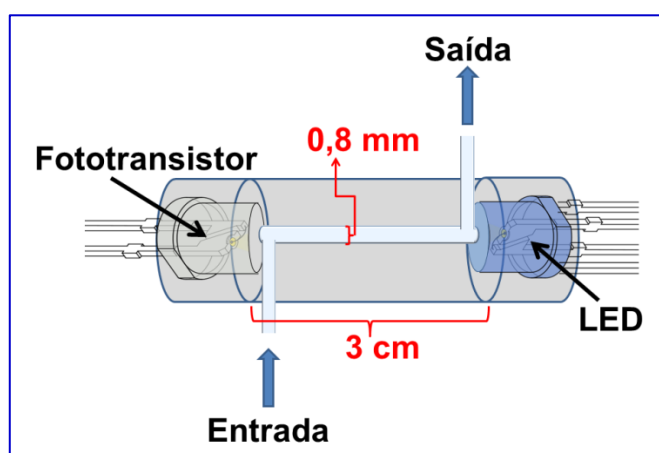
**FIGURA 2.4.** Fotografia do fotômetro desenvolvido. O destaque (em vermelho) mostra a câmara que abriga a cela de fluxo.

A escolha da região espectral é realizada por meio de um botão "Comutador do LED" na face superior do fotômetro Schlieren, como pode ser visto na **Figura 2.4**. Este botão está conectado a uma chave de comutação de um polo e três posições. Cada posição da chave aciona uma das três regiões espectrais de emissão do LED: verde, vermelha ou azul. Como foi utilizado um LED tricolor de alto brilho, a corrente que flui através do mesmo foi dimensionada para aproximadamente 0,5 mA, a qual é suficiente para gerar elevado sinal analítico e manter o *drift* térmico sob controle.



**FIGURA 2.5.** Fotografia da cela de fluxo que abriga (a) o LED e (b) o fototransistor.

O sistema de detecção do sistema FIA-Schlieren desenvolvido compreende a cela de fluxo construída no laboratório, a qual abriga o LED e o fototransistor. O caminho óptico e o diâmetro interno da cela de fluxo foram de 3 cm e 0,8 mm, respectivamente. Um diagrama esquemático que mostra os detalhes a geometria da cela de fluxo construída é apresentado na **Figura 2.6**.



**FIGURA 2.6.** Diagrama esquemático da cela de fluxo construída.

### 2.2.3 Interface eletrônica

O cartão PCL-711 da PC-LabCard (Advantech®), **Figura 2.7**, é uma interface de controle e aquisição de dados programável acoplável a um slot ISA (*International Standard Architecture*) do microcomputador.



**FIGURA 2.7.** Fotografia da interface PCL-711.

A interface PCL-711 é constituída por:

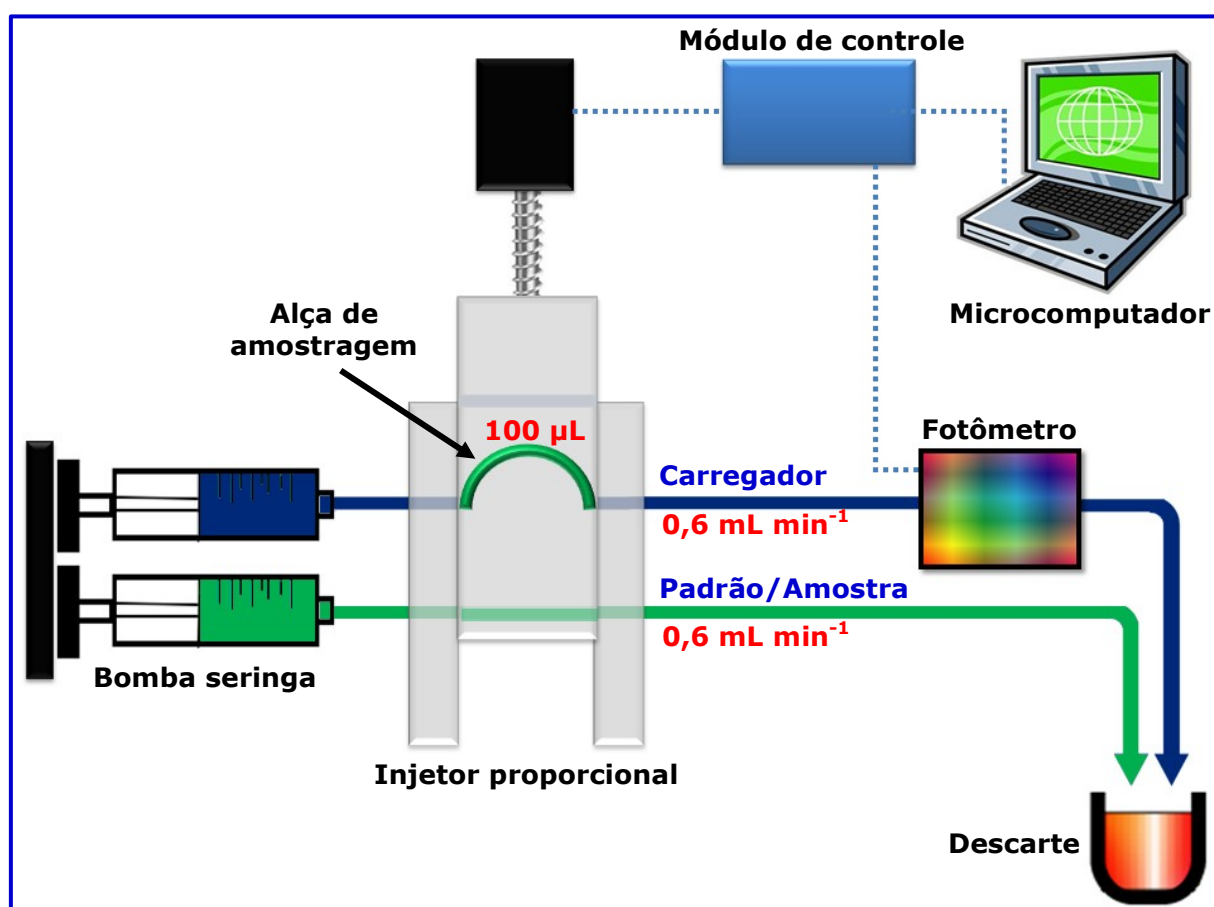
- a) um sistema de chaves que permite definir o endereço base a partir do qual os demais elementos do sistema físico são acessados;
- b) um conversor analógico/digital (AD) responsável pela transformação da informação analógica detectada pelo fotômetro (*labmade*) em informação digital, que é registrada e armazenada via programa computacional escrito em ambiente visual LabVIEW<sup>®</sup>;
- c) um circuito integrado (CI) que permite selecionar até 8 diferentes sinais analógicos (canais) a ser lido pelo AD e dois CI's que permitem controlar, seja enviando (saída digital) ou recebendo (entrada digital), até 16 dispositivos. Para os casos de medidas de sinais analógicos baseados no tempo, essa interface possui um CI programável comercialmente conhecido como 8253. O CI 8253 é conectado a interrupção do microcomputador para que a cada intervalo de tempo programado por software uma interrupção seja gerada e o A/D realize uma conversão.

O AD de 12 bits realiza uma conversão a cada 25  $\mu\text{s}$  e pode ser configurado por software para trabalhar em cinco diferentes faixas:  $\pm 5\text{ V}$  (ganho 0),  $\pm 2,5\text{ V}$  (ganho 1),  $\pm 1,25\text{ V}$  (ganho 2),  $\pm 0,625\text{ V}$  (ganho 3) e  $\pm 0,3125\text{ V}$  (ganho 4).

O DA de 12 bits realiza uma conversão a cada 30  $\mu\text{s}$  e pode ser ajustado por jampemento para trabalhar nas faixas de 0 a +5 V e 0 a +10 V.

### 2.2.4 Procedimento analítico

Na **Figura 1.1** é mostrado o diagrama esquemático para o sistema FIA-Schlieren proposto.



**FIGURA 2.8.** Diagrama esquemático do sistema FIA-Schlieren proposto.

A solução padrão ou a amostra foram injetadas dentro de um fluido carregador de água deionizada bombeado continuamente em direção ao detector. A injeção de uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão ou da amostra na linha do carregador foi realizada por um injetor proporcional controlado por um motor de passos. A vazão dos fluxos foi fixada em  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ .

Como as refrações dos feixes de radiação provenientes do LED ocorrem com maior intensidade para os menores comprimentos de onda, para realizar as medidas, o comprimento de onda máximo de emissão do LED em 470 nm foi selecionado através do botão “Comutador do LED”, localizado na parte externa do fotômetro (**Figura 2.4**).

Para minimizar o *drift* do LED, uma leitura contínua do branco (água deionizada) foi realizada antes de cada injeção. Como existe apenas um fotodetector para medir os sinais, medidas sequenciais foram realizadas. Os sinais obtidos foram armazenados no microcomputador.

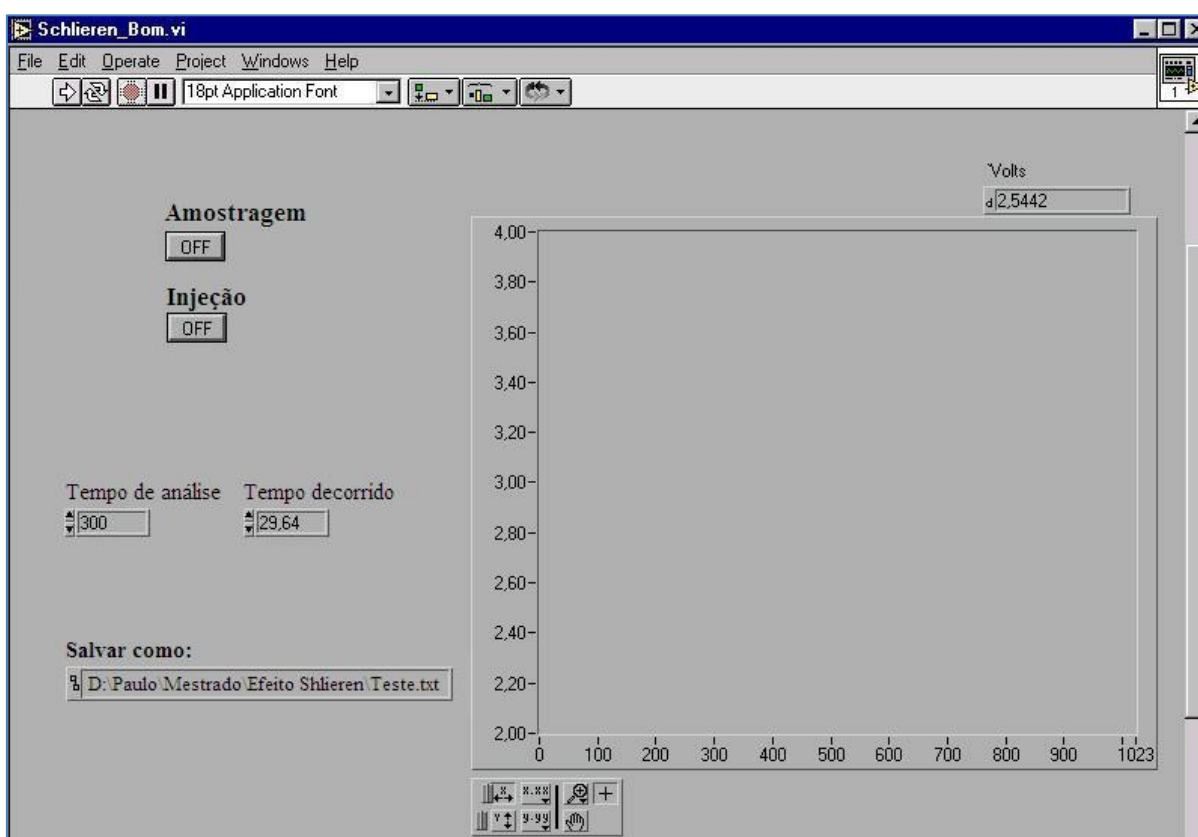
O procedimento analítico para controle das operações de amostragem e injeção das amostras e a aquisição dos dados foi controlado por um programa, escrito em ambiente gráfico LabVIEW<sup>®</sup>. Na **Figura 2.9** é apresentada a janela da interface gráfica do programa desenvolvido.

Ao acessar a janela do programa, o analista escolhe o tempo de análise e o nome e o local do arquivo onde deseja armazenar os dados. Ao ser iniciada a análise, o valor do branco é calculado automaticamente utilizando todos os sinais registrados durante os primeiros três segundos. Durante a análise, o programa indica o tempo decorrido, o perfil do sinal analítico, o valor máximo do sinal e o sinal registrado em milivolts.

A análise é iniciada acionando-se o botão “Injeção” na janela do programa para injeção da amostra. Assim, o injetor proporcional injeta automaticamente uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da amostra no fluxo carregador, a qual é transportada em direção ao detector, onde é produzido um sinal analítico relativo ao efeito Schlieren. Este sinal é então registrado pelo microcomputador e guardado no arquivo previamente definido pelo

analista para ser utilizados posteriormente nos cálculos quimiométricos. Finalizado o tempo de análise, o injetor retorna para a posição de amostragem, onde a alça de amostragem é novamente preenchida.

Ao final de todas as análises das soluções padrão e das amostras reais, os dados arquivados são tratados empregando procedimentos quimiométricos com o Programa Unscrambler<sup>®</sup> 7.1 da CAMO S/A.



**FIGURA 2.9.** Interface gráfica do programa para controle do sistema e aquisição dos dados.



*A noite estrelada.* Vincent van Gogh, 1889.

"Para compreender por que o céu é azul em qualquer parte,  
não é preciso dar a volta ao mundo." - Goethe

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Capítulo 3**



“Não quero ter a terrível limitação de quem vive apenas do que é possível fazer sentido.”

Clarice Lispector

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são discutidos os estudos realizados para ajuste do sistema FIA-Schlieren desenvolvido bem como as técnicas quimiométricas empregadas no tratamento dos dados.

O ajuste dos parâmetros do sistema FIA-Schlieren abordam os estudos do comprimento do caminho óptico da cela de fluxo, do tamanho da alça de amostragem e da vazão dos fluxos. Já o tratamento quimiométrico abrange os métodos de ajuste e validação dos modelos PLS1 construídos para os três analitos em estudo: NaCl, KCl e glicose. O ajuste compreende o uso de técnicas para pré-tratamento dos dados bem como para a calibração propriamente dita, resultando nos modelos adequados para cada analito. Após a etapa de calibração dos modelos, a validação é realizada de modo a comparar os resultados estimados pelo modelo com os respectivos valores de referência. A etapa seguinte é a previsão, na qual as concentrações dos analitos presentes nas amostras reais são estimadas.

#### 3.1 Ajuste do sistema FIA-Schlieren

Para ajustar os parâmetros do sistema FIA desenvolvido que influenciam na formação dos perfis Schlieren foram realizados estudos qualitativos acerca da vazão dos fluxos, do comprimento do caminho óptico da cela de fluxo e do tamanho da alça de amostragem. A seguir, são discutidos os estudos realizados.

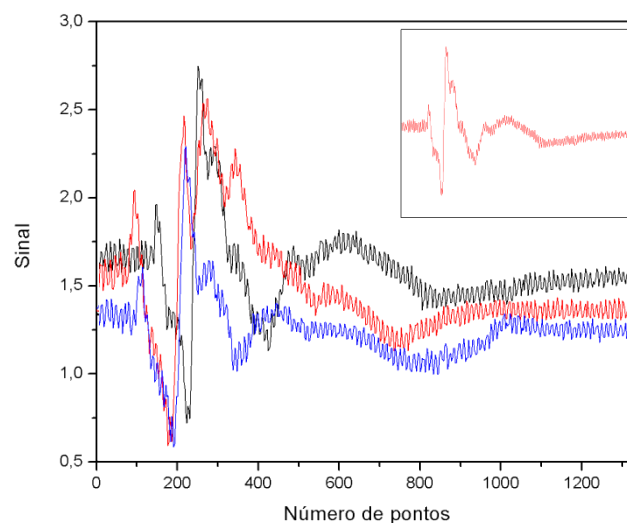
##### 3.1.1 Vazão

Inicialmente, foi realizado um estudo sobre a vazão adequada na qual os sinais analíticos relacionados ao efeito Schlieren fossem reprodutíveis e apresentassem a menor relação sinal-ruído possível. Para este teste, foi empregada uma solução de 1,0% m v<sup>-1</sup> de NaCl e fixou-se o

caminho óptico em 3 cm e a alça de amostragem de 100  $\mu\text{L}$ . Em seguida, foram testadas vazões de 1,0 e 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ .

O resultado do teste que utiliza a vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  é mostrado na **Figura 3.1**. Os sinais obtidos são bastante ruidosos e apresentam diferentes linhas de base. Apesar disso, pode-se notar que os três sinais obtidos possuem certa semelhança quanto à forma de seus perfis, isto é, são de certo modo reproduzíveis.

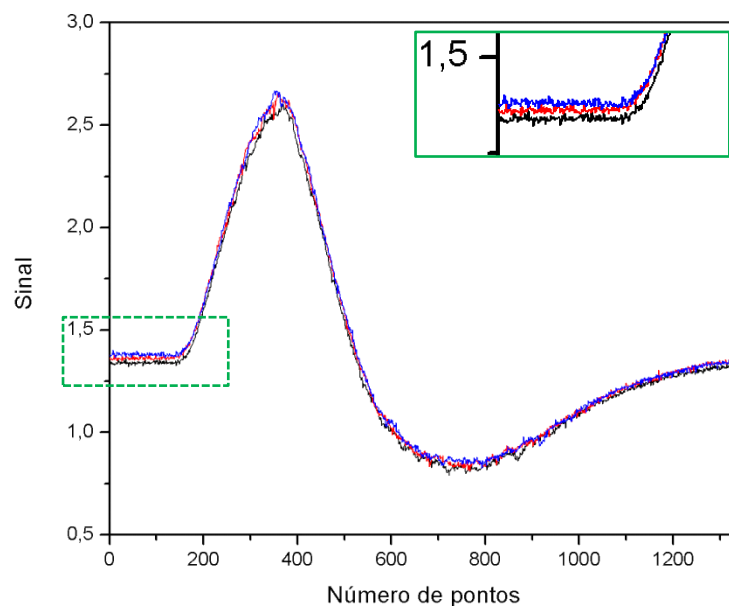
De fato, altas vazões provocam dispersão axial e radial da zona da amostra dentro do fluido carregador, impossibilitando a formação de “lentes” nas regiões frontal e traseira da zona da amostra. Isso favorece a refração irregular da radiação proveniente do LED dentro da cela de fluxo, adicionando ruído ao detector. A forma irregular dos perfis gerados é, portanto, devida a não uniformidade dos fluxos dentro da cela.



**FIGURA 3.1.** Perfis Schlieren obtidos em triplicata para uma solução padrão de NaCl 1,0%  $\text{m v}^{-1}$  a uma vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . No destaque é mostrado um dos perfis obtidos.

Uma vez que foi demonstrada a inviabilidade de se trabalhar a uma vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , foi realizado um novo teste reduzindo-se a vazão para 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  e mantendo-se os mesmos parâmetros anteriores. Esta vazão de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  foi escolhida com base nos dados experimentais publicados por SANTOS e colaboradores<sup>[79]</sup> e COSTA e colaboradores<sup>[80]</sup>.

Os resultados desse novo teste são mostrados na **Figura 3.2**. Os sinais analíticos então obtidos são bastante reproduzíveis e apresentam-se pouco ruidosos. Todavia, os sinais ainda possuem diferentes linhas de base, porém a diferença se mostrou bem menos acentuada do que aquela obtida para a vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Apesar disso, este inconveniente pode ser superado fazendo-se uma correção de linha de base através de procedimentos quimiométricos adequados.



**FIGURA 3.2.** Perfis Schlieren obtidos em triplicata para uma solução padrão de NaCl  $1,0\% \text{ m v}^{-1}$  a uma vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . No destaque é mostrada a diferença entre as linhas de base dos perfis obtidos.

A partir do estudo acima discutido foi verificado que a vazão é um dos fatores críticos para a obtenção dos perfis Schlieren gerados em sistemas FIA. Neste contexto, manter a vazão a uma baixíssima taxa, no caso  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , é fundamental, pois ela mantém a condição de fluxo laminar, que é imprescindível para a formação das “lentes” que delimitam as fronteiras de fase em relação aos seus índices de refração.

### 3.1.2 Comprimento do caminho óptico

Após definir a taxa de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  como a vazão ótima para a obtenção dos perfis Schlieren usando uma cela de fluxo com caminho

óptico de 3 cm e alça de amostragem de 100  $\mu\text{L}$ , foi estudada a influência do comprimento do caminho óptico sobre a formação destes perfis. Assim, duas outras celas de fluxo com caminhos ópticos de 1 e 2 cm também foram construídas e testadas.

As celas de fluxo construídas no laboratório possuem em suas extremidades o LED e o fototransistor. O LED e o fototransistor tiveram as suas cabeças serradas e polidas a fim de evitar que bolhas de ar ficassem retidas ao seu redor. Com isso, evita-se também que haja um maior espalhamento da radiação, o que implicaria em uma perda da sensibilidade do detector.

A influência do comprimento do caminho óptico na formação dos perfis Schlieren foi estudada empregando-se uma solução de 1,0%  $\text{m v}^{-1}$  de NaCl, uma alça de amostragem de 100  $\mu\text{L}$  e a vazão de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ . Depois de realizados os testes, os perfis Schlieren obtidos com os três diferentes comprimentos das celas de fluxo estudadas diferenciaram-se quanto à intensidade dos sinais produzidos: quanto maior a cela, mais intenso é o sinal obtido.

Além disso, foi verificado que a linha de base (que corresponde ao carregador de água deionizada) aumenta consideravelmente de intensidade quando se diminui o comprimento do caminho óptico de 3 para 2 e posteriormente para 1 cm. De fato, a linha de base aumenta devido ao menor comprimento da cela, uma vez que a radiação proveniente do LED chega com mais intensidade ao fototransistor.

Como as celas de 1 e 2 cm de caminho óptico produziram perfis menos intensos que a cela de 3 cm, houve a necessidade de aumento do ganho do sinal produzido no detector. Foram utilizados três níveis de ganho (0, 1 e 2), que podem ser definidos através de um botão localizado na parte externa do fotômetro acima do comutador do LED. Entretanto, aumentando-se o ganho verifica-se um aumento significativo do ruído nos sinais analíticos, diminuindo, desta forma, a sensibilidade do detector.

Assim, após este estudo, o comprimento do caminho óptico de 3 cm foi definido como mais adequado para a obtenção dos perfis

Schlieren, uma vez que os sinais se apresentaram mais intensos e bem definidos e não houve a necessidade de alteração do ganho do detector.

### 3.1.3 Volume de amostra injetada

Após definidas as condições adequadas para a vazão e para o comprimento do caminho óptico da cela fluxo, foi estudada a influência do volume de amostra a ser injetado no sistema FIA-Schlieren proposto.

O volume de amostra injetado no sistema é definido pelo comprimento da alça de amostragem localizado na linha da amostra do injetor proporcional, conforme pode ser visto no diagrama esquemático apresentado na **Figura 2.8**.

Assim, nesta etapa foi testada uma alça de amostragem de 200  $\mu\text{L}$ , uma vez que uma alça de 100  $\mu\text{L}$  já foi usada nas etapas anteriores e apresentou bons resultados.

Os perfis Schlieren obtidos para uma solução padrão de 1,0%  $\text{m v}^{-1}$  de NaCl a vazão de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  usando as duas alças se diferenciaram pela largura dos perfis e, principalmente, pelo tempo demandado para cada análise. Os perfis obtidos com a alça de 200  $\mu\text{L}$  apresentou um alargamento muito maior que o da alça de 100  $\mu\text{L}$ . Além disso, como já era esperado, o volume de amostra injetado pela alça maior demora praticamente o dobro do tempo para ser analisado em relação à alça menor, que demandou cerca de 5 minutos por análise. Logo, a alça de 100  $\mu\text{L}$  foi escolhida para utilização na obtenção dos perfis Schlieren.

A maior inconveniência da estratégia utilizada é a baixa frequência analítica, cerca de 12 análises por hora apenas, que se deve principalmente ao fato de que a vazão dos fluxos é muito baixa.

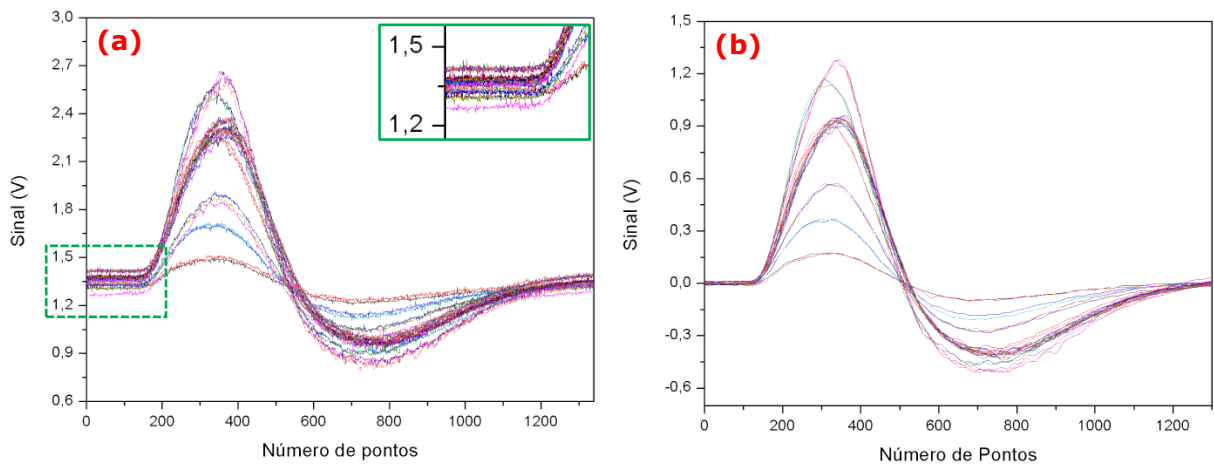
## 3.2 Tratamento dos dados

Após ajustar todos os parâmetros do sistema FIA-Schlieren desenvolvido (vazão de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , caminho óptico de 3 cm e alça de amostragem de  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ), foram obtidos os perfis Schlieren de todas as soluções padrão de NaCl, KCl e glicose e das respectivas amostras reais contendo estes analitos. O tratamento dos dados obtidos é discutido a seguir.

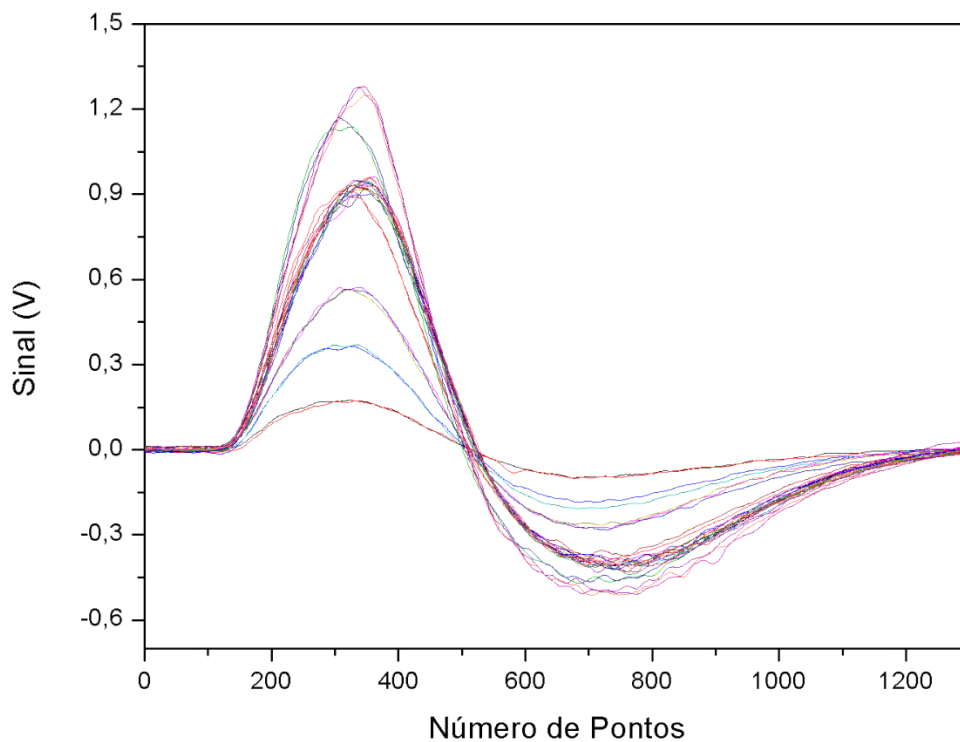
### 3.2.1 Pré-tratamento dos dados

Inicialmente foi realizado um pré-tratamento de todos os dados obtidos experimentalmente devido à existência de deslocamento da linha base e de ruídos aleatórios. Assim, uma correção de linha de base seguida de uma suavização Savitzky-Golay dos perfis Schlieren foram realizadas. A melhor configuração testada para a suavização Savitzky-Golay empregou a utilização de um polinômio de 2ª ordem e seleção de uma janela de 41 pontos. Na **Figura 3.3** é ilustrada a diferença entre os perfis Schlieren brutos (**Figura 3.3a**) e pré-tratados (**Figura 3.3b**) para as soluções padrão de cloreto de sódio. Após o pré-processamento dos dados, houve, visualmente, uma melhoria significativa quanto à minimização do ruído dos perfis analisados.

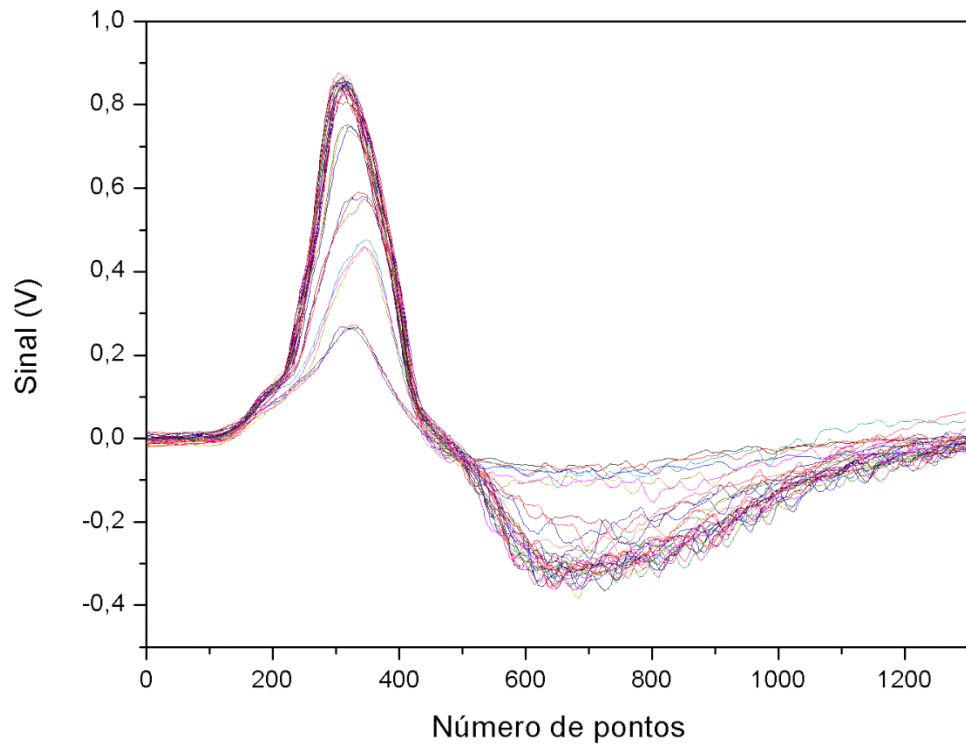
Para o pré-tratamento dos perfis das soluções padrão de cloreto de potássio e de glicose e das amostras de KCl injetável e soro glicosado foram utilizadas as mesmas técnicas empregadas para o caso do NaCl. As **Figura 3.4** a **3.6** mostram os perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de NaCl, KCl e glicose, bem como das respectivas amostras reais que contém estes analitos, respectivamente.



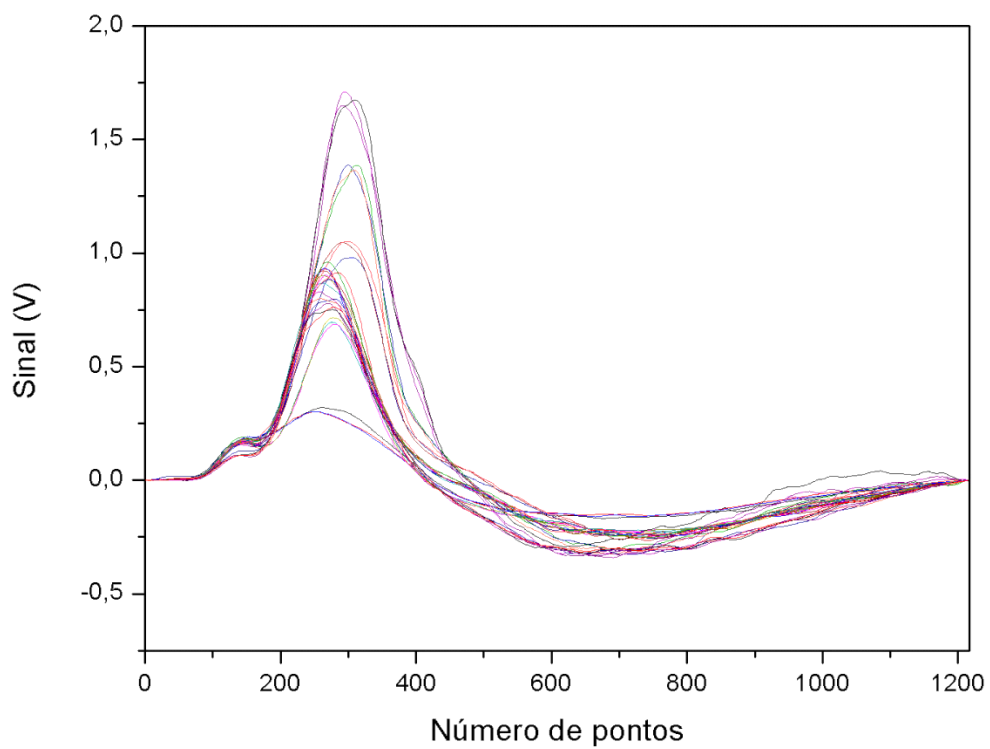
**FIGURA 3.3.** Perfis Schlieren para as soluções padrão de NaCl e amostras de soro fisiológico: (a) à esquerda, os perfis brutos; (b) à direita, os perfis pré-tratados. No destaque (em verde) é possível observar a presença de diferentes linhas de base e ruídos aleatórios.



**FIGURA 3.4.** Perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de NaCl e amostras de soro fisiológico.



**FIGURA 3.5.** Perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de KCl e amostras de KCl injetável.

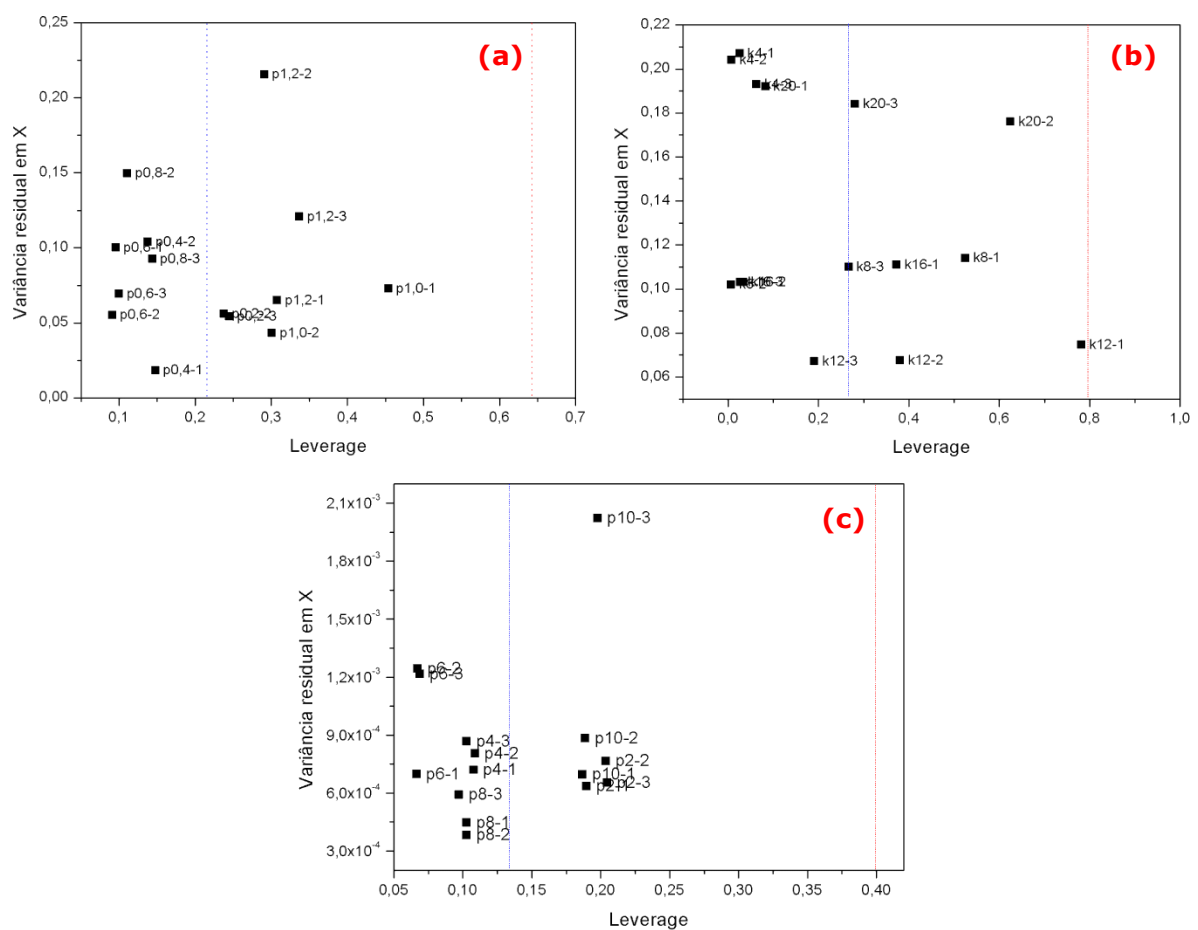


**FIGURA 3.6.** Perfis Schlieren pré-tratados para as soluções padrão de glicose e amostras de soro glicosado.



### 3.2.2 Detecção de amostras anômalas

Antes de iniciar efetivamente a modelagem, foi realizado um estudo para verificar a presença de amostras anômalas (*outliers*) nos conjunto das soluções padrão de NaCl, KCl e glicose. Para tanto foram gerados os gráficos do resíduo de concentração de Student versus a influência (*leverage*) das amostras para os dois modelos. Na **Figura 3.7** são apresentados os gráficos obtidos para os três conjuntos.



**FIGURA 3.7.** Variância residual em X versus leverage das amostras dos modelos PLS1 construídos usando soluções padrão de (a) NaCl, (b) KCl e (c) glicose. A linha vertical tracejada azul representa a média da influência das amostras e a linha vermelha três vezes a média da influência.

A *leverage* de uma amostra ( $h_i$ ) é calculada pela equação<sup>[104]</sup>:

$$h_i = \frac{1}{i} + u_i^T (U^T U) u_i$$

onde  $i$  é o número de amostras do conjunto de calibração,  $u_i$  é o vetor de escores da amostra  $i$  e  $U$  é a matriz de escores do conjunto de calibração truncado para o número adequado de variáveis latentes (ou fatores).

Já o resíduo de espectral de *Student* ( $rxS_i$ ) de uma amostra é o resíduo espectral ( $x_i - \hat{x}_i$ ) convertido em unidades de desvio padrão<sup>[104]</sup>:

$$rxS_i = \frac{x_i - \hat{x}_i}{s \sqrt{1 - h_i}}$$

onde  $x_i$  e  $\hat{x}_i$  são, respectivamente, os espectros conhecidos e previstos pelo modelo construído para a  $i$ -ésima amostra e  $s$  é o desvio padrão dos resíduos espectrais das amostras do conjunto de calibração, que é calculado por

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^i (x_i - \hat{x}_i)^2}}{i - n_{VL} - 1}$$

onde  $n_{VL}$  é o número de variáveis latentes utilizados na construção do modelo.

Em um dado conjunto de calibração, a medida da influência de uma amostra no modelo de regressão tem valor máximo igual a 1. Um baixo valor de influência indica que a amostra influencia pouco na construção do modelo de calibração. Amostras com valores de influência significativamente maiores que três vezes a média de todas as influências devem ser mais bem investigadas. Seguindo este mesmo raciocínio, as amostras que possuem alto resíduo espectral (positivo ou negativo) também têm alta influência no modelo e não foram bem ajustadas ao modelo. De acordo com as suposições estatísticas usuais, se  $|rxS_i| > 2,5$  ele é considerado pouco comum. Portanto, uma amostra é caracterizada como anômala se possui alta *leverage* e alto resíduo espectral<sup>[104],[105]</sup>.

Com base nas considerações acima, a amostra k12-1 (**Figura 3.7b**) apresenta uma alta influência no modelo, no entanto não se caracteriza como amostra anômala, uma vez que possui resíduo espectral dentro dos limites aceitáveis, ou seja, três vezes a média da *leverage* e

baixa variância residual em X. Portanto, o conjunto de soluções padrão de KCl não possui amostras anômalas. Seguindo este mesmo raciocínio, pode-se afirmar que os modelos construídos para NaCl (**Figura 3.7a**) e glicose (**Figura 3.7c**) também não apresentam amostras anômalas.

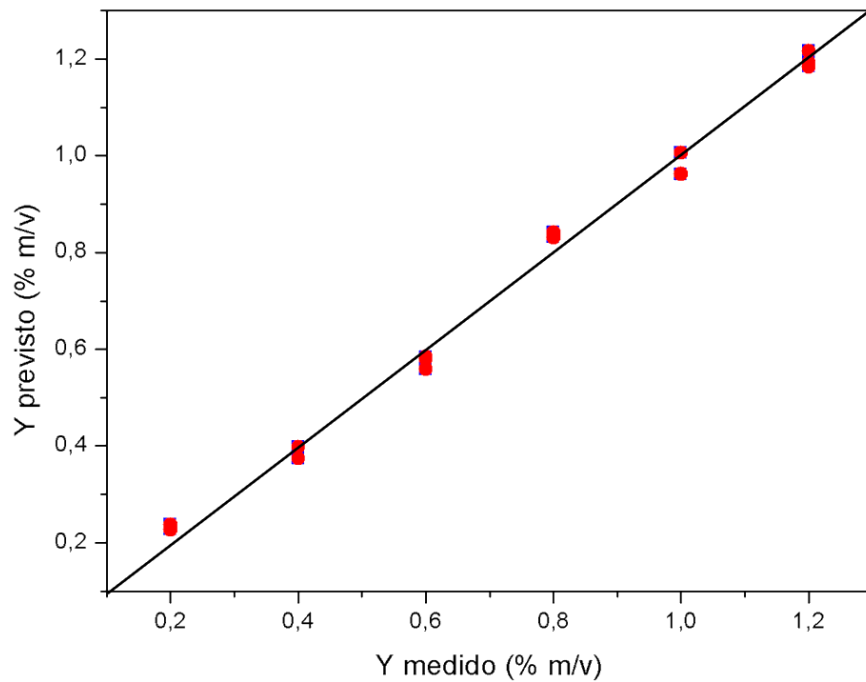
Após constatada a ausência de amostras anômalas nos conjuntos estudados, foi realizada a construção dos modelos de calibração para os três conjuntos de analitos empregando PLS1 com validação cruzada.

### 3.2.3 Construção e validação dos modelos de calibração

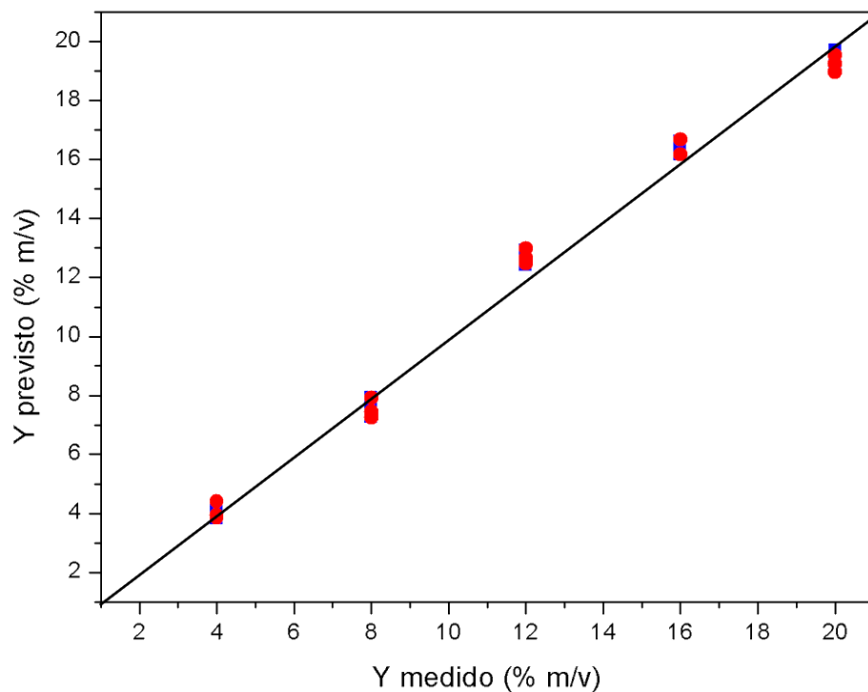
A partir dos dados pré-processados foram construídos modelos de calibração relacionando as matrizes X (valores de AD em volts) e Y (das concentrações) empregando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Para a construção dos modelos de calibração PLS1 foram utilizadas apenas as soluções padrão de NaCl, KCl e glicose.

Os modelos construídos foram validados empregando o método da validação cruzada *leave-on-out*, que utiliza um objeto do próprio conjunto de calibração que atua momentaneamente como conjunto de teste independente. Após esse processo, o objeto retorna ao conjunto de calibração e um novo objeto é usado como teste. Sucessivas repetições desse processo, empregando um único objeto de cada vez, são realizadas de modo que todo o conjunto de calibração tenha sido utilizado na previsão. O número de repetições do processo é, portanto, igual ao número de objetos do conjunto de calibração.

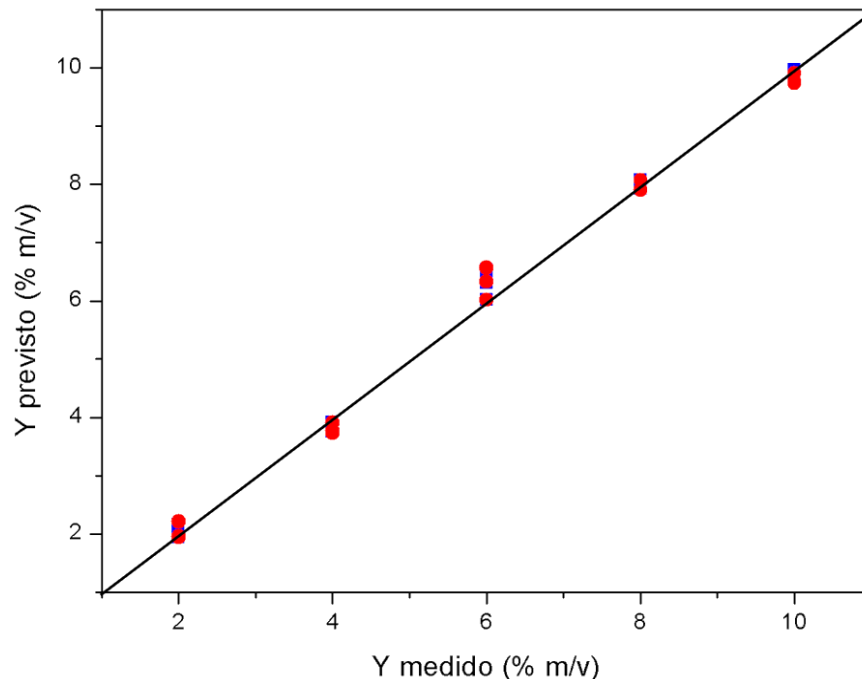
As **Figura 3.8** a **3.10** mostram os gráficos das concentrações medidas versus concentrações previstas das soluções padrão de NaCl, KCl e glicose, respectivamente, para os modelos de calibração construídos. Os quadrados azuis representam a calibração e os círculos vermelhos a validação.



**FIGURA 3.8.** Gráfico das concentrações medidas versus concentrações previstas para as soluções de NaCl na construção do modelo de calibração usando o método de validação cruzada.



**FIGURA 3.9.** Gráfico das concentrações medidas versus concentrações previstas para as soluções padrão de KCl na construção do modelo de calibração com validação cruzada.



**FIGURA 3.10.** Gráfico das concentrações medidas versus concentrações previstas para as soluções padrão de glicose na construção do modelo de calibração com validação cruzada.

Na **Tabela 3.1** são apresentados os valores de RMSEC, RMSECV e suas respectivas correlações obtidos na construção do modelo de calibração para as soluções padrão de NaCl, KCl e glicose.

**TABELA 3.1.** Valores de RMSEC, RMSECV e suas respectivas correlações obtidos na construção dos modelos de calibração para as soluções padrão de NaCl, KCl e glicose.

	RMSEC	Correlação	RMSECV	Correlação
NaCl	0,0201	0,9983	0,0264	0,9971
KCl	0,4991	0,9961	0,5793	0,9948
Glicose	0,2020	0,9974	0,2270	0,9968

Os valores das correlações obtidos na calibração e na validação dos modelos são próximos a 1 e indicam um bom ajuste linear dos modelos dentro das suas respectivas faixas de trabalho estudadas. Já os baixos valores de RMSEC e de RMSECV representam um nível aceitável de dispersão e uma boa concordância entre si e são, portanto, indicadores da boa exatidão dos modelos construídos.

### 3.2.4 Previsão da concentração dos analitos em amostras reais

Os modelos construídos e validados na seção anterior foram usados para a previsão das concentrações das respectivas espécies em amostras reais: 5 amostras de soros fisiológico, 5 de KCl injetável e 5 de soro glicosado.

Nas **TABELA 3.2 Tabelas 3.2 a 3.4** são apresentados os valores das concentrações previstos pelos modelos, os valores de referência para cada amostra e os testes estatísticos que avaliam a exatidão das medidas. Os métodos de referência, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, utilizados para os três analitos foram o método de Volhard para o NaCl<sup>[101]</sup> e para o KCl<sup>[102]</sup> e o método iodométrico para a glicose<sup>[103]</sup>.

**TABELA 3.2.** Valores previstos, intervalos de confiança e valores de referência para as concentrações das amostras de soro fisiológico e valores de t estimados para cada amostra.

Amostra	Valor Previsto (% m/v)	Intervalo de confiança (95%)	Valor de Referência (% m/v)	t <sub>estimado</sub>
Am. 1 – 1	0,92	0,94 ± 0,05	0,89	4,009
Am. 1 – 2	0,97		0,89	
Am. 1 – 3	0,93		0,89	
Am. 2 – 1	0,94	0,96 ± 0,08	0,89	3,735
Am. 2 – 2	1,00		0,89	
Am. 2 – 3	0,93		0,89	
Am. 3 – 1	0,94	0,94 ± 0,06	0,90	3,240
Am. 3 – 2	0,98		0,90	
Am. 3 – 3	0,92		0,90	
Am. 4 – 1	0,93	0,94 ± 0,05	0,90	3,980
Am. 4 – 2	0,97		0,90	
Am. 4 – 3	0,93		0,90	
Am. 5 – 1	0,99	0,94 ± 0,09	0,89	3,407
Am. 5 – 2	0,98		0,89	
Am. 5 – 2	0,91		0,89	

**TABELA 3.3.** Valores previstos, intervalos de confiança e valores de referência para as concentrações das amostras de KCl injetável e valores de t estimados para cada amostra.

Amostra	Valor Previsto (% m/v)	Intervalo de confiança (95%)	Valor de Referência (% m/v)	t <sub>estimado</sub>
Am. 1 – 1	18,6	19,2 ± 1,1	19,3	0,257
Am. 1 – 2	19,6		19,3	
Am. 1 – 3	19,5		19,3	
Am. 2 – 1	19,8	19,7 ± 0,4	18,9	9,798
Am. 2 – 2	19,8		18,9	
Am. 2 – 3	19,5		18,9	
Am. 3 – 1	19,5	19,5 ± 1,1	19,7	0,899
Am. 3 – 2	18,9		19,7	
Am. 3 – 3	20,0		19,7	
Am. 4 – 1	19,0	19,1 ± 0,4	19,1	0
Am. 4 – 2	19,3		19,1	
Am. 4 – 3	19,0		19,1	
Am. 5 – 1	19,1	19,1 ± 0,3	19,0	0,926
Am. 5 – 2	19,2		19,0	
Am. 5 – 3	18,9		19,0	

**TABELA 3.4.** Valores previstos, intervalos de confiança e valores de referência para as concentrações das amostras de soro glicosado e valores de t estimados para cada amostra.

Amostra	Valor Previsto (% m/v)	Intervalo de confiança (95%)	Valor de Referência (% m/v)	t <sub>estimado</sub>
Am. 1 – 1	4,8	4,6 ± 0,4	4,9	3,674
Am. 1 – 2	4,5		4,9	
Am. 1 – 3	4,5		4,9	
Am. 2 – 1	4,7	4,8 ± 0,2	4,8	0,612
Am. 2 – 2	4,9		4,8	
Am. 2 – 3	4,7		4,8	
Am. 3 – 1	4,9	5,0 ± 0,2	5,1	1,225
Am. 3 – 2	5,1		5,1	
Am. 3 – 3	5,1		5,1	
Am. 4 – 1	4,6	4,5 ± 0,5	4,9	3,737
Am. 4 – 2	4,7		4,9	
Am. 4 – 3	4,3		4,9	
Am. 5 – 1	4,7	4,5 ± 0,5	4,9	3,368
Am. 5 – 2	4,4		4,9	
Am. 5 – 3	4,4		4,9	

Inicialmente, foi avaliado se as amostras estão de acordo com o rotulado: 0,9% de NaCl para soro fisiológico, 19% de KCl para KCl injetável e 5% de glicose para soro glicosado. Supondo-se que as medidas não foram afetadas por erros grosseiros nem sistemáticos, restam apenas os erros aleatórios. Então, de acordo com o teorema do limite central, os valores médios de um conjunto de medidas feitas em um mesmo lote devem seguir a distribuição de Student<sup>[106]</sup>.

Desta forma, para se chegar a uma conclusão sobre as amostras, foram calculados os respectivos intervalos no nível de confiança de 95% para cada uma delas separadamente. O intervalo de confiança é dado pela equação

$$\mu = x \pm t_{N-1} \frac{s}{\sqrt{N}},$$

onde  $x$  é a média dos valores medidos,  $s$  é o desvio padrão amostral,  $N$  é o número de medidas e  $t_{N-1}$  é o valor de tabelado da variável aleatória  $t$  com  $N - 1$  graus de liberdade.

Como todas as amostras foram medidas em triplicata autêntica, todos os intervalos de confiança foram calculados para  $t$  com 2 graus de liberdade é igual a 2 ( $t = 4,303$ ). Foi adotada como hipótese nula que as amostras tenham vindo de uma população com média  $\mu$  igual ao valor fornecido no rótulo de cada amostra. A terceira coluna das **Tabela 3.2** a **3.4** apresentam os intervalos de confiança calculados para cada amostra.

De acordo com as **Tabela 3.2** a **3.4**, apenas o intervalo de confiança para a amostra nº 2 de KCl injetável não contém o valor rotulado de 19%. Pode-se afirmar, então, que existe evidência, no nível de 95% de confiança, de que a concentração média de KCl na amostra analisada é mesmo superior a 19% (isto é, a hipótese nula pode ser rejeitada). Entretanto, esta conclusão está baseada apenas três medidas, ou seja, dois graus de liberdade, e os indícios não são suficientes para justificar a rejeição dessa amostra nem aceitar as demais.

Desta forma, para se ter mais segurança sobre os resultados, foi realizado o teste  $t$  emparelhado a fim de verificar a influência da técnica



analítica sobre os resultados das análises. Neste caso, foi adotado como hipótese nula que a média das três diferenças entre os valores previstos pelo modelo e os valores de referência deve ser um ponto de distribuição  $t$  com média  $\Delta$  igual a 0. Para testar essa hipótese, os valores previstos pelos modelos e os valores de referência foram utilizados para estimar o ponto de distribuição  $t$  e, em seguida, compará-lo ao valor tabelado (na hipótese de que  $\Delta = 0$ ). O valor estimado de  $t$  é dado pela equação

$$t = \frac{d - \Delta}{s_d \sqrt{N}}$$

onde  $d$  é a média das diferenças entre os valores previstos e os de referência e  $s_d$  é desvio padrão das diferenças.

Os valores estimados de  $t$  são apresentados na última coluna das **Tabela 3.2 a 3.4**. Comparando-se estes valores estimados com o valor de  $t$  tabelado com 2 graus de liberdade ( $t = 4,303$ ), pode-se afirmar no nível de confiança de 95% que, de fato, apenas a amostra nº 2 de KCl injetável está fora das especificações, pois o  $t$  estimado é maior que o tabelado. Para todas as demais amostras, a hipótese nula pode ser aceita e, conseqüentemente, foi verificado que não há diferença estatística no nível de confiança de 95% entre a técnica analítica proposta e os respectivos métodos de referência de cada analito.

Portanto, os valores das concentrações previstos pelos modelos foram concordantes com os valores de referência, demonstrando, assim, a boa capacidade preditiva dos modelos PLS1 construídos.



*O beijo.* Gustav Klimt, 1907.

#### VELHO TEMA

*Vicente de Carvalho*

Eu cantarei de amor tão fortemente  
Com tal celeuma e com tamanhos brados  
Que afinal teus ouvidos, dominados,  
Hão de à força escutar quanto eu sustente.

Quero que meu amor se te apresente  
- Não andrajoso e mendigando agrados,  
Mas tal como é: risonho e sem cuidados,  
Muito de altivo, um tanto de insolente.

Nem ele mais a desejar se atreve  
Do que merece: eu te amo, e o meu desejo  
Apenas cobra um bem que se me deve.

Clamo, e não gemo; avanço, e não rastejo;  
E vou de olhos enxutos e alma leve  
À galharda conquista do teu beijo.

## CONCLUSÃO

## Capítulo 4

*“Não basta saber, é preciso também aplicar;  
não basta querer, é preciso também fazer.”*

Goethe

## 4. CONCLUSÃO

No trabalho ora descrito, foi avaliada a exploração do efeito Schlieren em sistemas FIA através da implementação de uma nova estratégia para a análise quantitativa de NaCl e glicose em soros e de KCl em injetáveis.

Para atingir esse objetivo, a metodologia proposta se baseia na diferença entre os índices de refração das zonas da amostra e do fluido carregador. É importante ressaltar que os perfis analíticos gerados por efeito Schlieren nesta abordagem são característicos para cada espécie analisada e só foram obtidos graças às condições de baixa vazão dos fluxos. Vazões maiores que as estabelecidas geraram sinais bastante ruidosos e completamente irreprodutíveis.

O desempenho da metodologia proposta foi avaliado por meio do registro dos perfis analíticos gerados por efeito Schlieren de soluções padrão de cloreto de sódio, glicose e cloreto de potássio e posterior quantificação das respectivas espécies em amostras reais de soros fisiológico e glicosado e KCl injetável. Tal avaliação foi realizada com a aplicação da técnica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), a qual empregou as soluções padrão para construção e validação dos modelos e utilizou as amostras reais para previsão de suas respectivas concentrações. Os resultados obtidos demonstraram a boa capacidade preditiva dos modelos PLS1 construídos, pois os valores das concentrações previstos pelos modelos foram concordantes com os valores de referência.

O software desenvolvido para a realização automática das análises é de fácil execução e diminui de certa forma os esforços humanos. Além disso, a estratégia proposta oferece uma alternativa economicamente viável frente ao emprego de fotômetros e espectrofotômetros comerciais, que são mais onerosos, uma vez que usa um fotômetro à base de LED e fototransistor como detector de radiação.

Portanto, diante dos resultados discutidos neste trabalho, verifica-se a viabilidade de implementação da exploração dos perfis analíticos gerados por efeito Schlieren para avaliar a qualidade de diversos outros materiais (fármacos, combustíveis, reagentes, etc.) ou para quantificar analitos nos mesmos.

A baixa geração de resíduos, a não utilização de reagentes e a não necessidade de manipulação prévia das amostras são vantagens intrínsecas da abordagem proposta.

#### **4.1 Propostas futuras**

Além do estudo dos principais parâmetros que influenciam na formação do efeito Schlieren enfatizadas neste trabalho, não foram realizados estudos mais detalhados acerca das características físico-químicas das amostras, vazões, características geométricas celas de fluxo e configurações de fluxo. Desta forma, estes parâmetros deverão ser observados de modo a gerar um banco de dados de perfis Schlieren com as características de cada material analisado.

Este banco de dados poderá constar, por exemplo, das medidas de área dos perfis, alturas de pico, larguras efetivas de banda, tempo de limpeza, etc. Estes parâmetros poderão ser consultados, por exemplo, para a verificação de qualidade dos materiais analisados ou para a calibração de novos sistemas.

Assim, pretende-se, de forma objetiva, como proposta de continuidade deste trabalho:

- Estudar como as propriedades físico-químicas dos materiais influem no perfil Schlieren e como estes perfis são modificados de acordo com as configurações de fluxo e características geométricas do sistema de detecção;
- Registrar os perfis analíticos gerados por efeito Schlieren dos mais diversos materiais, determinar parâmetros temporais como sinal de

pico, largura efetiva de banda, inflexões e lavagem do sistema e definir os intervalos de confiança destes parâmetros;

- Utilizar os parâmetros temporais na construção de um banco de dados para ser utilizado como referência de qualidade dos materiais (alimentos líquidos, fármacos, solventes, etc.);
- Utilizar o banco de dados elaborado para a construção de modelos quimiométricos que auxiliem na identificação e classificação de amostras desconhecidas utilizando-se métodos quimiométricos como PCA e SIMCA ou na avaliação da correlação existente entre os parâmetros que definem o perfil Schlieren e a concentração de analitos presentes nas amostras, utilizando-se recursos quimiométricos de calibração multivariada como MLR, PLS e PCR.



*Émile Zola.* (Detalhe) Édouard Manet, 1868.

"Devemos ouvir pelo menos uma pequena canção todos os dias, ler um bom poema, ver uma pintura de qualidade e, se possível, dizer algumas palavras sensatas." – Goethe

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **Capítulo 5**

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TROJANOWICZ, M. *Advances in flow analysis*. Weinheim: Wiley & Sons, **2008**.
- [2] RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H.; Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*. **781: 145, 1975**.
- [3] ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*. **19: 636, 1996**.
- [4] RŮŽIČKA, J. Flow injection analysis. From beaker to microfluidics. FIALAB Instruments Inc., **2009**. CD-ROM.
- [5] KOLEV, S. D.; McKELVIE, I. A. *Advances in flow injection analysis and related techniques (Comprehensive analytical chemistry - Vol. 54)*. Amsterdam: Wilson & Wilson's, **2008**.
- [6] VALCÁRCEL CASES, M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. *Automatic methods of analysis*. Amsterdam: Elsevier, **1988**.
- [7] LÁZARO, F.; LUQUE DE CASTRO, M. L.; VALCÁRCEL, M. Catalytic-fluorimetric determination of EDTA and iron(III) by flow injection analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **321: 467, 1985**.
- [8] FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Automatic determination of malate dehydrogenase activity by two flow injection modes. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **336: 676, 1990**.

- [9] CALATAYUD, J. M. *Flow injection analysis of pharmaceuticals: automation in the laboratory*. London: Taylor & Francis, **2003**.
- [10] THOMSEN, J.; JOHNSON, K. S.; PETTY, R. L. Determination of reactive silicate in seawater by flow injection analysis. *Analytical Chemistry*. **55: 2378, 1983**.
- [11] POJANAGAROON, T.; et al. Reverse flow injection spectrophotometric determination of iron(II) using norfloxacin. *Talanta*. **58: 1293, 2002**.
- [12] YEBRA-BIURRUN, M. C. *Flow injection analysis of marine samples*. New York: Nova Science, **2009**.
- [13] REIS, B. F.; et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta*. **293: 129, 1994**.
- [14] ROCHA, F. R. P.; et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*. **468: 119, 2002**.
- [15] AUFLITSCH, S.; et al. Determination of dissolved reactive phosphorus in estuarine waters using a reversed flow injection manifold. *Analyst*. **122: 1477, 1997**.
- [16] ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F. A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters. *Analytica Chimica Acta*. **409: 227, 2000**.



- [17] LYDDY-MEANNEY, A. J.; et al. A compact flow injection analysis system for surface mapping of phosphate in marine waters. *Talanta*. **58: 1043, 2002.**
- [18] WEEKS, D. A.; JOHNSON, K. S. Solenoid pumps for flow injection analysis. *Analytical Chemistry*. **68: 2717, 1996.**
- [19] GRUDPAN, K.; et al. Flow injection analysis usins an aquarium air pump. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **346: 882, 1993.**
- [20] LASER, D. J.; SANTIAGO, J. G. A review of micropumps. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. **14: R35, 2004.**
- [21] WOIAS, P. Micropumps: summarizing the first two decades. *Proceedings of International Society for Optical Engineering*. **4560: 39, 2001.**
- [22] RŮŽIČKA, J.; D., MARSHALL G. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*. **237: 239, 1990.**
- [23] BERGAMIN F<sup>o</sup>, H.; et al. Merging zones in flow injection analysis: part 1. Double proportional injector and reagent consumption. *Analytica Chimica Acta*. **101: 17, 1978.**
- [24] KRUG, F. J.; et al. Zone trapping in flow injection analysis: spectrophotometric determination of low levels of ammonium ion in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. **151: 39, 1983.**
- [25] PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of

- chromium(VI), ammonia and phosphorus. *Analytical Chemistry*. **57: 2575, 1985.**
- [26] DINIZ, M. C. T.; et al. Determination of phosphate in natural water employing a monosegmented flow system with simultaneous multiple injection. *Talanta*. **62: 469, 2004.**
- [27] REIS, B. F.; BERGAMIN F<sup>o</sup>, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. *Química Nova*. **16: 570, 1993.**
- [28] RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Recent developments in flow injection analysis: gradient techniques and hydrodynamic injection. *Analytica Chimica Acta*. **145: 1, 1983.**
- [29] ZAGATTO, E. A. G.; et al. A simple procedure for hydrodynamic injection in flow injection analysis applied to the atomic absorption spectrometry of chromium in steels. *Analytica Chimica Acta*. Vol. **181: 265, 1986.**
- [30] PRADOS-ROSALES, R. C.; LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Propelling devices: the heart of flow injection approaches. *Analytica Chimica Acta*. **461: 169, 2002.**
- [31] *IEEE 100: The Authoritative Dictionary of IEEE Standards Terms*. 7th ed. New York: Standards Information Network, IEEE Press, **2000.**
- [32] KIM, A. G.; MIQUEL, R. Measuring type of supernova distances and redshifts from their multi-band light curves. *Astroparticle Physics*. **28: 448, 2007.**

- [33] SUN, X.; et al. A white light phosphor suitable for near ultraviolet excitation. *Journal of Luminescence*. **122-123: 955, 2007**.
- [34] SKEGGS, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. **28: 311, 1957**.
- [35] RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. The first decade of flow injection analysis: from serial assay to diagnostic tool. *Analytica Chimica Acta*. **179: 1, 1986**.
- [36] JOHNSON, C. The LED Museum, 1999. Disponível em: <<http://www.ledmuseum.org>>. Acessado em: 14 de setembro de 2010.
- [37] O'TOOLE, M.; DIAMOND, D. Absorbance based light emitting diode optical sensors and sensing devices. *Sensors*. **8: 2453, 2008**.
- [38] HAUSER, P. C.; CATES, N. E. An inexpensive detector for absorbance measurements in flow-injection analysis. *Journal of Chemical Education*. **73: 191, 1996**.
- [39] HAUSER, P. C.; RUPASINGHE, T. W. T.; CATES, N. E. A multi-wavelength photometer based on light-emitting diodes. *Talanta*. **42: 605, 1995**.
- [40] GAIÃO, E. N.; et al. Um fotômetro multi-LED microcontrolado, portátil e de baixo custo. *Química Nova*. **28: 1102, 2005**.
- [41] WORSFOLD, P. J.; CLINCH, J. R.; CASEY, H. Spectrophotometric field monitor for water quality parameters: the determination of phosphate. *Analytica Chimica Acta*. **197: 43, 1987**.

- [42] BENSON, R. L.; et al. Monitoring of dissolved reactive phosphorus in wastewaters by flow injection analysis. Part 2. On-line monitoring system. *Water Research*. **30: 1965, 1996.**
- [43] BETTERIDGE, D.; et al. A high sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuous-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per  $10^9$  level and a new method of refractometric determinations. *Analyst*. **103: 897, 1978.**
- [44] DASGUPTA, P. K.; et al. Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. *Talanta*. **40: 53, 1993.**
- [45] ELLIS, P. S.; et al. Multi-reflection photometric flow cell for use in flow injection analysis of estuarine waters. *Analytica Chimica Acta*. **499: 81, 2003.**
- [46] THOMMEN, C.; et al. Application of a capillary flow cell to sophisticated flow-injection systems. *Analytica Chimica Acta*. **234: 141, 1990.**
- [47] DASGUPTA, P. K.; et al. Light emitting diode-based detectors: absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell. *Analytica Chimica Acta*. **500: 337, 2003.**
- [48] TROJANOWICZ, M.; WORSFOLD, P. J.; CLINCH, J. R. Solid-state photometric detectors for flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. **7: 301, 1988.**
- [49] TAN, A.; et al. A multi-channel photometric detector for multi-component analysis in flow injection analysis. *Journal of*

- Automated Methods and Management in Chemistry.* **16: 71, 1994.**
- [50] TROJANOWICZ, M.; SZPUNAR-ŁOBIŃSKA, J. Simultaneous flow-injection determination of aluminium and zinc using LED photometric detection. *Analytica Chimica Acta.* **230: 125, 1990.**
- [51] DAVID, A. R. J.; McCORMACK, T.; WORSFOLD, P. J. A submersible battery-powered flow injection (FI) sensor for the determination of nitrate in estuarine and coastal waters. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry.* **21: 1, 1999.**
- [52] JOHNSON, K. S.; BEEHLER, C. L.; SAKAMOTO-ARNOLD, C. M. A submersible flow analysis system. *Analytica Chimica Acta.* **179: 245, 1986.**
- [53] DAVID, A. R. J.; et al. A submersible flow injection-based sensor for the determination of total oxidised nitrogen in coastal waters. *Analytica Chimica Acta.* **361: 63, 1998.**
- [54] HOOKE, R. "Of a New Property in the Air", Observation LVIII, 217-219. *Micrographia.* Londres: J. Martyn & J. Allestry, **1665.**
- [55] RIENITZ, J. Schlieren experiment 300 years ago. *Nature.* **254: 293, 1975.**
- [56] RIENITZ, J. Optical inhomogeneities: schlieren and shadowgraph methods in the seventeenth and eighteenth centuries. *Endeavour.* **21: 77, 1997.**

- [57] SETTLES, G. S. *Schlieren and shadowgraph techniques: Visualizing phenomena in transparent media*. Berlin: Springer-Verlag, **2001**.
- [58] TOEPLER, A. *Beobachtungen nach einer neuen optischen Methode*. Bonn: Maximilian Cohen und Sohn, **1864**.
- [59] BEEVERS, R. B. Polymer characterization by refractometry. *Journal of Polymer Science*. **12: 1407, 1974**.
- [60] WILMS, J.; WEIGAND, B. Composition measurements of binary mixture droplets by rainbow refractometry. *Applied Optics*. **46: 2109, 2007**.
- [61] MEISEN, S.; WINGENDER, J.; TELGHEDER, U. Analysis of microbial extracellular polysaccharides in biofilms by HPLC. Part I: development of the analytical method using two complementary stationary phases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **391: 993, 2008**.
- [62] McBRADY, A. D.; SYNOVEC, R. E. Microfabricated refractive index gradient based detector for reversed-phase liquid chromatography with mobile phase gradient elution. *Journal of Chromatography A*. **1105: 2, 2006**.
- [63] LAPA, R. A. S.; et al. A multicommutated flow system with on-line compensation of the Schlieren effect applied to the spectrophotometric determination of pindolol. *Analytica Chimica Acta*. **366: 209, 1998**.

- [64] ZAGATTO, E. A. G.; et al. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. **234: 153, 1990**.
- [65] KRUG, F. J.; et al. Turbidimetric determination of sulphate in plant digests and natural waters by flow injection analysis with alternating streams. *Analytica Chimica Acta*. **145: 179, 1983**.
- [66] ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Overcoming the Schlieren effect in flow injection spectrophotometry by introduction of large sample volumes. Determination of chloride in the electrolyte of lead-acid batteries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **8: 625, 1997**.
- [67] KRUG, F. J.; et al. Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry. *Analyst*. **102: 503, 1977**.
- [68] DIAS, A. C. B.; et al. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. *Talanta*. **68: 1076, 2006**.
- [69] McKELVIE, I. D.; et al. Elimination of the Schlieren effect in the determination of reactive phosphorus in estuarine waters by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **351: 265, 199**.
- [70] McKELVIE, I. D.; MONBET, P. Dados não publicados, **2007**. Em: KOLEV, S. D.; McKELVIE, I. A. *Advances in flow injection analysis and related techniques (Comprehensive Analytical Chemistry - Vol. 54)*. Amsterdam: Wilson & Wilson's, **2008**.
- [71] YAMANE, T. e SAITO, M. Simple approach for elimination of blank peak effects in flow-injection analysis of samples

- containing trace analyte and an excess of another solute. *Talanta*. **39: 215, 1992.**
- [72] JAMBUNATHAN, S.; et al. Optical fiber coupled light emitting diode based absorbance detector with a reflective flow cell. *Talanta*. **50: 481, 1999.**
- [73] LIU, H.; DASGUPTA, P. K. Dual-wavelength photometry with light emitting diodes. Compensation of refractive index and turbidity effects in flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **289: 347, 1994.**
- [74] EOM, I. Y.; DASGUPTA, P. K. Frequency-selective absorbance detection: refractive index and turbidity compensation with dual-wavelength measurement. *Talanta*. **69: 906, 2006.**
- [75] STEWARD, J. E. Refractive index gradients in stopped-flow and temperature-jump kinetics and liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. **53: 1125, 1981.**
- [76] EVANS, C. E.; SHABUSHING, J. G.; MCGUFFIN, V. L. Experimental and theoretical model of refractive index artifacts in absorbance detection. *Journal of Chromatography A*. **459: 119, 1988.**
- [77] GOMES, D. M. C.; et al. Spectrophotometric determination of iron and boron in soil extracts using a multi-syringe flow injection system. *Talanta*. **66: 703, 2005.**
- [78] MISHRA, S. K.; DASGUPTA, P. K. Capillary scale light emitting diode based multi-reflection absorbance detector. *Talanta*. **605: 166, 2007.**



- [79] SANTOS, S. R. B.; ARAÚJO, M. C. U.; BARBOSA, R. A. An automated FIA system to determine alcoholic grade in beverages based on Schlieren effect measurements using an LED-photocolorimeter. *Analyst*. **27: 324, 2002.**
- [80] COSTA, R. S.; et al. A novel strategy to verification of adulteration in alcoholic beverages based on Schlieren effect measurements and chemometric techniques. *Microchemical Journal*. **78: 27, 2004.**
- [81] WIJK, A.; KALBERG, B. Determination of glycol in aircraft ground deicing/anti-icing fluids using flow injection with refractive index detection. *Talanta*. **41: 395, 1994.**
- [82] PAWLISZYN, J. Properties and applications of the concentration gradient sensor to detection of flowing samples. *Analytical Chemistry*. **58: 3207, 1986.**
- [83] PAWLISZYN, J.; WU, J. Moving boundary capillary electrophoresis with concentration gradient detection. *Journal of Chromatography A*. **559: 111, 1991.**
- [84] HANNING, A.; ROERADE, J. A spectroscopic refractometer for temperature-independent refractive index detection. *Analytical Chemistry*. **69: 1496, 1997.**
- [85] BERGINS, C.; NOWAK, M.; URBAN, M. The flow of a dilute cationic surfactant solution past a circular cylinder. *Experiments in Fluids*. **30: 410, 2001.**

- [86] WU, X. Z.; et al. Development of a novel detector for flow injection analysis based on optical beam deflection induced by the reaction heat. *Analytical Sciences*. **10: 203, 1994**.
- [87] HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. **500: 365, 2003**.
- [88] KARLBERG, B.; TORGRIP, R. Increasing the scope and power of flow-injection analysis through chemometric approaches. *Analytica Chimica Acta*. **500: 299, 2003**.
- [89] KOŚCIELNIAK, P. Univariate calibration techniques in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. **438: 323, 2001**.
- [90] SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Quantitative determinations in conventional flow injection analysis based on different chemometric calibration strategies: a review. *Analytica Chimica Acta*. **438: 335, 2001**.
- [91] GEMPERLINE, P. *Practical guide to chemometrics*. Boca Raton: Taylor & Francis, **2006**.
- [92] VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics*. Boca Raton: Taylor & Francis, **2009**.
- [93] KRAMER, R. *Chemometric techniques for quantitative analysis*. New York: Marcel Dekker, **1998**.
- [94] MASSART, D. L.; et al. *Data handling in science and technology 20A: handbook of chemometrics and qualimetrics, part A*. Oxford: Elsevier, **1997**.

- [95] BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta*. **500: 185, 2003**.
- [96] WEISBERG, S. *Applied linear regression*. New York: Wiley & Sons, **1985**.
- [97] NAES, T.; et al. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. Chichester: NIR Publications, **2002**.
- [98] BRERETON, R. G. *Applied chemometrics for scientists*. Chichester: Wiley & Sons, **2007**.
- [99] KALIVAS, J. H.; LANG, P. M. *Mathematical analysis of spectral orthogonality*. New York: Marcel Dekker, **1994**.
- [100] MARK, H. *Principles and practices of spectroscopic calibration*. New York: Wiley & Sons, **1991**.
- [101] Farmacopeia Brasileira (Fascículo 3 da Parte II). 4ª ed. Monografia N° 1113.07-0, **2002**.
- [102] Farmacopeia Brasileira (Fascículo 3 da Parte II). 4ª ed. Monografia N° 1023.05-5, **2002**.
- [103] Farmacopeia Brasileira (Fascículo 3 da Parte II). 4ª ed. Monografia N° 0627.01-1, **2002**.
- [104] BEEBE, K. R.; RANDY, J. P.; SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: a practical guide*. New York: Wiley & Sons, **1998**.
- [105] SIMÕES, S. S. *Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e*

*calibração multivariada*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Tese de doutorado, 83p.

- [106]** OLIVIERI, A. C.; et al. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. *Pure and Applied Chemistry*. **78: 633, 2006.**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)