

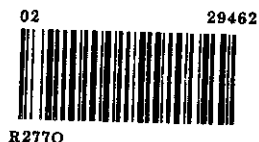
César Reis



**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO CATALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
Cr(VI) COM o-DIANISIDINA, USANDO PLANEJAMENTO COMBINADO
DE MISTURAS E VARIÁVEIS DE PROCESSO**

**Tese Apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual de Campinas,
Como Parte das Exigências do Curso de
Pós-Graduação, para Obtenção do Título
de Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. João Carlos de Andrade



**CAMPINAS
SÃO PAULO - BRASIL
SETEMBRO - 1996**

UNIDADE	J. Q.
N.º CHAMADA:	71/2000camp
V. Ex.	2000
TOMBO BC/	20.550
PROC.	21/91
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 1,00
DATA	10/01/91
N.º CPD	200097328-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R277o Reis, César
Otimização de método catalítico para a determinação de Cr(VI) com o-Dianisidina. usando planejamento combinado de misturas e variáveis de processo. / César Reis. -- Campinas, [SP : s.n.], 1996

Orientador: João Carlos de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Cromo(VI). 2. Misturas. 3. Espectrofotometria UV/VIS. 4. Otimização. I. Andrade, João Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Carlos de Andrade pela orientação, discussão e amizade.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa que assumiram a carga horária após a minha saída para treinamento.

À Assessoria de Assuntos Internacionais da Universidade Federal de Viçosa que através de trabalho competente oferece tranquilidade aos treinandos.

Aos professores Célio Pasquini, Adriana V. Rossi, Cláudio P. Jordão e Ieda S. Scarminio por comporem a banca examinadora desta tese.

Ao professor Rogério Custódio que marcou presença com a sua infinita paciência e ao professor Roy E. Bruns, o incansável pesquisador que muito nos ajudou.

O presente trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e da CAPES, às quais agradecemos.

À Da. Ema, pela competência com que organizava a limpeza do nosso laboratório, e a Iara e Paula pela grande ajuda no trabalho de cópias e encadernações.

Aos amigos Cláudio Cuelbas, Billy, Paulo Queirós, Débora Nakai, Ernesto e Aline, pelo incentivo.

A todos os colegas do Instituto de Química e em especial, à Nívea, Bellato e César Mello.

Enfim todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CÉSAR REIS, filho de Ananias Reis e Olinda Gonçalves Reis, nasceu em Campo Belo (MG) em 12 de outubro de 1959.

Em março de 1981, ingressou-se na Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em julho de 1986, com o título de Bacharel e Licenciado em Química.

Em março de 1987, iniciou o curso de mestrado em Agroquímica na mesma universidade.

Em março de 1988, iniciou seus trabalhos profissionais no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, como professor auxiliar, na área de Química Analítica.

Em outubro de 1991, finalizou o curso de mestrado em Agroquímica, obtendo o título de "*Magister Scientiae*".

Em agosto de 1992 iniciou o curso de doutorado em Química Analítica na Universidade Estadual de Campinas.

Cumpriu as exigências para a obtenção do título de Doutor em setembro de 1996.

ÍNDICE GERAL

Índice Geral	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Características Físicas, Químicas e Toxicológicas do Cromo	4
2.2. Métodos para Determinação de Cromo	7
2.2.1. Métodos Cinéticos Catalíticos de Análise	8
2.3. Otimização de Procedimentos em Química	13
3. EXPERIMENTAL	17
3.1. Material e Instrumentos Utilizados	17
3.2. Reagentes e Soluções	18
3.3. Planejamento de Misturas	20
3.4. Planejamento de Superfícies de Resposta	24
3.4. Estudo da Seletividade do Método	24
3.5.1. Análise Unifatorial de Interferentes	24
3.5.1. Análise Multifatorial de Interferentes	26
3.6. Determinação de Cromo em Amostras Reais	26
3.6.1. Preparação das Amostras	27
3.6.2. Extração do Cr(VI) com Metil Isobutil Cetona	27

3.6.3. Determinação de Cr(VI) no Extrato	28
3.6.4. Curva de Calibração	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Experimentos com Misturas	32
4.2. Estudo dos Efeitos das Variáveis de Processo	40
4.3. Análise de Superfícies de Resposta	45
4.4. Avaliação da Seletividade	49
4.4.1. Estudo Unifatorial dos Interferentes	49
4.4.2. Estudo Multifatorial dos Interferentes	57
4.5. Aplicação do Método a Amostras Reais	60
4.5.1. Extração do Cr(VI) com Metil Isobutil Cetona	61
4.5.2. Determinação do Cr(VI)	62
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	76
Apêndice 1	76
Apêndice 2	89
Apêndice 3	96

Índice de Figuras

Figura 3.1	Esquema do equipamento utilizado para leitura em cela de fluxo:(A ₁) Entrada da amostra com a válvula (V) desligada, (A ₂) entrada de água para limpeza da cela com a mesma válvula(V) ligada,(C) célula de fluxo, (D) frasco para descarte, (v) aquário, adaptada para este propósito.	18
Figura 3.2	Fórmula estrutural da o-dianisidina (3,3'Dimetoxibenzidina)	19
Figura 3.3	Aumento da absorvância da o-dianisidina com o tempo em 450 nm de uma solução contendo 0,05 mol/L do reagente em acetona.	19
Figura 3.4	Planejamento experimental para mistura restrito a uma subregião do "Simplex" devido a problemas experimentais. Os pontos 9 e 10 podem ser utilizados para testar os modelos de mistura	23
Figura 3.5	Representação do planejamento experimental "Split-Plot", no qual um experimento com misturas é feito em cada ponto de um arranjo fatorial.	23
Figura 4.1	Espectros de absorção da o-dianisidina a 0,05 mol/L em uma mistura água:acetona, a 70%:30% m/m: (A) na sua forma reduzida, (B) depois da reação de oxidação.	30
Figura 4.2	Gráficos mostrando o aumento da absorvância com o tempo de reação entre a o-dianisidina e o peróxido de hidrogênio: (A) para a reação não catalisada e, (B) para a reação catalisada	31
Figura 4.3	Superfícies de resposta para o modelo quadrático de misturas em cada ponto do fatorial. Nas regiões hachuradas estão todas as misturas que produzem maiores respostas.	41
Figura 4.4	Ilustração dos efeitos principais das variáveis: Z ₁ (a) e Z ₂ (b).	43
Figura 4.5	Gráficos dos efeitos de interação entre as variáveis z ₁ z ₂ (a) e z ₁ z ₃ (b).	44
Figura 4.6	Gráfico do efeito de interação de terceira ordem entre z ₁ , z ₂ , z ₃	44

Figura 4.7	Superfície de respostas para as variáveis Z1 (HCl) e Z3 (H ₂ O ₂), utilizando a Equação 15 com $Z2 = \sqrt[4]{2^3}$, mostrando o ponto de máxima absorvância	47
Figura 4.8	Curvas de calibração: [a], feita nas condições otimizadas, e [b] feita nas condições encontrada na literatura, (DOLMANOVA. et al., 1969).	48
Figura 4.9	Gráfico de probabilidade normal de todos os efeitos, enfatizando aqueles que são significativos.	58
Figura 4.10	Curva de calibração obtida nas mesmas condições em que foram submetidas as amostras após a dissolução	64
Figura A.1	Região experimental para experimentos fatorial e de misturas; (a) para duas variáveis e (b) para três variáveis.	78
Figura A.2	Ilustração do "Simplex-Lattice" (a) e "Simplex-Centroid" (b).	80
Figura A.3	Esboço da resposta em função das proporções entre os componentes da mistura em um sistema binário, (a) efeito aditivo, (b) efeito sinérgico e (c) efeito antagônico entre os dois componentes.	87
Figura A.4	O espaço experimental redefinido nos pseudocomponentes x'_1 , x'_2 e x'_3 .	88

Índice de Tabelas

Tabela 2.1	Exemplos de compostos encontrados para cada estado de oxidação do cromo.	6
Tabela 2.2	Classificação dos métodos cinéticos baseada no tipo de reação química empregada.	9
Tabela 3.1	Delineamento Experimental para Mistura	22
Tabela 3.2	Planejamento Fatorial Completo 2^3	22
Tabela 3.3	Níveis do planejamento de Superfícies de Resposta, para modelo quadrático, e seus respectivos valores em mol/L para Z_1 , Z_2 e Z_3 .	24
Tabela 3.4	Faixa de concentração utilizada no estudo unifatorial de 25 interferentes.	25
Tabela 3.5.	Níveis dos interferentes no planejamento fatorial 2^6 .	26
Tabela 4.1	Valores das respostas de Δ Abs, em absorvância, das duplicatas em cada ponto do planejamento "Split-Plot".	33
Tabela 4.2	Coefficientes dos modelos quadráticos obtidos para todos os pontos do fatorial.	35
Tabela 4.3	Análise de Variância para as respostas em absorvância do delineamento "Split-Plot".	36
Tabela 4.4	Coefficientes do modelo combinado e seus respectivos erros.	38
Tabela 4.5	Respostas para os ensaios do fatorial no ponto (1) do planejamento com misturas.	42
Tabela 4.6.	Tabela de Análise de Variância da resposta Δ Abs., mostrando também os valores dos efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 no ponto (0,7:0,3:0,0) da mistura.	43
Tabela 4.7	Delineamento para superfícies de resposta e resultados em absorvância.	46
Tabela 4.8.	Interferência produzida por Cr(III) e por Cu(II) na determinação de Cr(VI).	51

Tabela 4.9	Interferência produzida por Fe(III) e por Mo(VI) na determinação de Cr(VI).	52
Tabela 4.10	Interferência produzida pelos íons Co(II) e Zn(II) na determinação de Cr(VI).	53
Tabela 4.11	Interferência produzida pelos íons Mg(II) e H_2PO_4^- na determinação de Cr(VI)	53
Tabela 4.12	Interferência produzida por EDTA na determinação de Cr(VI).	55
Tabela 4.13	Interferência produzida pelos íons NH_4^+ e K^+ na determinação de Cr(VI).	55
Tabela 4.14	Interferência produzida por Na^+ na determinação de Cr(VI).	56
Tabela 4.15	Interferência produzida pelos íons Na^+ na determinação de Cr(VI), quando aqueles atuam em altas concentrações.	56
Tabela 4.16	Interferência produzida pelo tampão de biftalato de potássio, a pH 5, na determinação de Cr(VI).	57
Tabela 4.17	Análise de Variância do Planejamento Fatorial.	59
Tabela 4.18	Resultados das determinações de cromo em amostras naturais.	63
Tabela A.1	Tabela de Análise de Variância	83
Tabela A.2	Importância relativa dos coeficientes.	86
Tabela A.3	Tabela ANOVA para o modelo (2). O número de replicatas, tratamentos "main-plot" e tratamentos "sub-plot" são r, P e m, respectivamente.	91
Tabela A.4	Médias, diferenças entre as médias e suas variâncias.	94

RESUMO

O método cinético catalítico para a determinação de Cr(VI), foi otimizado em um meio reacional formado pela mistura dos solventes: água, acetona e dimetilformamida (DMF). Este método baseia-se na reação de oxidação da o-dianisidina com peróxido de hidrogênio, em meio fracamente ácido, utilizando Cr(VI) como catalisador.

Para esta otimização, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método, utilizaram-se planejamentos combinando variáveis de mistura, [água, acetona e DMF], e variáveis de processo, [HCl, o-dianisidina e H₂O₂] além da análise de superfícies de resposta. Os experimentos executados dentro dos limites estabelecidos por tais planejamentos, forneceram as condições otimizadas para o sistema tais como: variáveis de mistura, [70% m/m de água, 30% m/m de acetona e 0% m/m de DMF] e variáveis de processo, [6,0 x 10⁻⁴ mol/L de HCl, 1,9 x 10⁻² mol/L de o-dianisidina e 0,79 mol/L de H₂O₂]. Nestas condições verificou-se um aumento de três vezes na sensibilidade do método quando comparado com procedimentos utilizados por outros pesquisadores.

Os estudos dos interferentes feitos nas condições otimizadas, mostraram duas situações distintas. Na primeira, quando os interferentes foram estudados por um processo unifatorial, o Cr(III) e o Cu(II) causaram sérias interferências já na proporção de 2:1 em relação ao Cr(VI), enquanto que o Fe(III) interferiu a partir da relação de 15:1 e o EDTA a partir de 10:1. Outras espécies só interferiram em proporções acima de 100:1, relativamente ao Cr(VI). Por outro lado, quando foi feito um estudo multifatorial, o Cr(III) não apresentou efeito principal significativo e os efeitos de interação dos quais ele participou foram todos negativos, ao contrário do EDTA, que apresentou efeitos de interação positivos mas que também não produziu efeito principal significativo. Em vista da ação dos interferentes, torna-se necessário separar o Cr(VI).

Assim sendo, nas determinações de cromo total em amostras vegetais e amostras de águas residuais de indústria de celulose, foi acrescentado o processo de extração do Cr(VI). A extração, após oxidação do cromo, foi feita utilizando metil isobutil cetona em meio clorídrico.

Usando este procedimento, a precisão do método é de ±0,5%, no nível de concentração de 10 ng/mL de Cr(VI). Os limites de detecção e de quantificação, calculados por meio das medidas de absorvância de dez replicatas do branco de reagentes, foram de 1,1 ng/mL e 3,2 ng/mL, respectivamente. Os resultados obtidos com as amostras reais mostraram um desvio padrão relativo entre 1,2% e 3,0% em relação aos seus valores de referência.

ABSTRACT

The kinetic catalytic procedure for the determination of Cr(VI) based on the the *o*-dianisidine oxidation reaction with hydrogen peroxide in a weakly acid medium was optimized with respect to both the reactants [HCl, *o*-dianisidine and H₂O₂] and the solvent composition [water, acetone and N,N-dimethylformamide], in order to achieve higher sensitivities.

This was accomplished using a combined design approach involving mixture experiments having process variables, as well as surface response methodology.

The experiments, carried out within the experimental limits, resulted in optimized mixture variables [70% m/m of water, 30% m/m of acetone and 0% m/m of N,N-dimethylformamide] and process variables [HCl: 6.0×10^{-4} mol/L, *o*-dianisidine: 1.9×10^{-2} mol/L and H₂O₂: 0,79 mol/L]. Under these experimental conditions, the method sensitivity was increased three times, with respect to the procedure described in the literature.

Under the optimized conditions, the interfering species showed two distinct situations. Using the step by step approach, Cr(III) and Cu(II) presented serious interferences when present in the 2:1 proportion, while Fe(III) began to interfere at a ratio of 15:1 and EDTA at 10:1. The other interfering species studied presented interference only when above the ratio of 100:1 with respect to the concentration of Cr(VI). On the other hand, the multifactorial approach indicated that Cr(III) did not have a significant principal effect and its interaction effects were all negative. In contrast, EDTA showed positive interaction effects but did not present significative principal effect. The overall interference effects indicate the need of a previous Cr(VI) separation in real sample analysis. This was done in this work by extracting Cr(VI) in methylisobutylketone in hydrochloric acid medium.

The proposed procedure presented a relative standard deviation of $\pm 0.5\%$ at the level of 10 ng/mL of Cr(VI) and limits of detection and quantification of 1,1 ng/mL and 3,2 ng/mL, respectively. Waste waters and plant samples were employed to test the procedure proposed for Cr(VI) determination and the results presented relative standard deviations ranging from 1.2% to 3.0% with respect to the actual reference values for those samples.

1. INTRODUÇÃO

A otimização de procedimentos em química analítica, utilizando métodos estatísticos multifatoriais, tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores, visto que notáveis aumentos na sensibilidade e na seletividade, redução no tempo e no custo das análises e simplificação das operações laboratoriais podem ser conseguidas por processos de otimização, (BAYNE e RUBIN, 1986).

Com o crescente aumento na utilização de misturas de solventes como meio reacional, (PUNGOR et al., 1983; BEREK e BERKA, 1984 e BERSIER e BERSIER, 1985), torna-se necessário a utilização de planejamentos experimentais para misturas na otimização dos sistemas de reação. Em tais planejamentos, dois ou mais componentes são misturados em várias proporções, e as propriedades físicas e, ou químicas resultantes destas misturas são medidas. Assume-se, geralmente, que tais propriedades, aqui chamadas de respostas, são funções somente das proporções entre os componentes da mistura, (CORNELL, 1990b). Estas proporções não podem ser negativas e, se expressas como frações da mistura, devem somar a unidade. Tais restrições causa uma interdependência dos componentes (x_i) da mistura, dada pela expressão abaixo, sendo q o número de componentes.

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

Entretanto, em muitos experimentos, deparamos com situações onde outras variáveis, além dos componentes da mistura, também influenciam nas propriedades desta mistura, (CORNELL, 1988). Para tais variáveis (pH, Temperatura, Pressão, Concentração, etc.), que são chamadas variáveis de processo, (CORNELL e DENG, 1982), a condição de mistura dada pela

expressão acima não se aplica porque elas não fazem parte da mistura e, como estas variáveis são independentes, elas podem ser usadas em um planejamento fatorial. A combinação de planejamento para misturas e do fatorial, gera um novo tipo de planejamento denominado "Split-Plot", (WOODING, 1973). Neste tipo de experimento é possível constatar a existência de efeitos de interação entre as variáveis de processo e os componentes da mistura, o que torna mais versátil o procedimento de otimização de misturas de solventes como meio reacional em metodologias analíticas.

O elemento cromo apresenta efeitos distintos sobre os organismos de acordo com o seu estado de oxidação. Na sua forma trivalente, ele pode ser considerado elemento essencial na nutrição dos mamíferos, (ANDERSON et al., 1987), por outro lado na forma hexavalente ele é altamente tóxico devido ao seu elevado poder de oxidação, maior mobilidade e pela facilidade com que esta penetra no interior das células, (COHEN et al., 1993).

Por essas características particulares, o elemento cromo e seus compostos é relativamente um dos mais pesquisados sob o ponto de vista de metodologias de determinação. O método fotométrico da difenilcarbazida, (ONISHI, 1976), um dos mais utilizados, apresenta alta sensibilidade, atingindo um limite de detecção de 18 ng/mL segundo de ANDRADE et al., (1983). Entretanto em muitas matrizes, o nível de cromo está abaixo deste limite e são necessários métodos mais sensíveis tais como os métodos catalíticos de análise, (PEREZ-BENDITO e SILVA, 1988).

O método espectrofotométrico cinético catalítico para determinação de Cr(VI), primeiramente desenvolvido por BUSCARONS e ARTIGAS, (1957), utiliza a reação de oxidação da o-dianisidina (3-3'-dimetoxibenzidina) com peróxido de hidrogênio em meio fracamente ácido, tendo como catalizador o Cr(VI). DOLMANOVA et al., (1978) estudaram o efeito do meio orgânico-aquoso sobre esta reação sem, no entanto, utilizar planejamentos experimentais para mistura com o objetivo de otimizar alguma propriedade da reação.

Partindo-se desta exposição, constituíram-se os objetivos deste trabalho:

1. Otimizar das condições experimentais na determinação catalítica de Cr(VI) em misturas de solventes, utilizando planejamento "Split-Plot" e análise de

superfícies de resposta. No planejamento "Split-Plot", os solventes água, dimetilformamida e acetona, entram como componentes da mistura e os reagentes HCl, o-dianisidina e H₂O₂, como variáveis de processo.

2. Estudar da seletividade do método nas condições otimizadas, pelo processo do fator único e pelo processo multifatorial.

3. Eliminar as interferências por procedimentos de extração.

4. Determinação de cromo total como Cr(VI) em amostras de material vegetal e águas residuais.

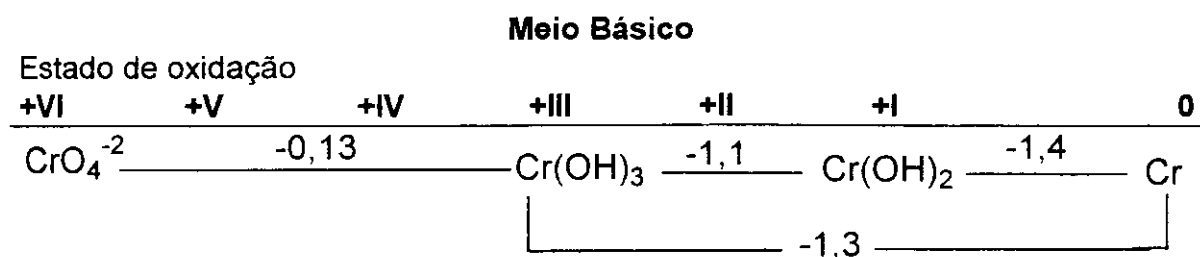
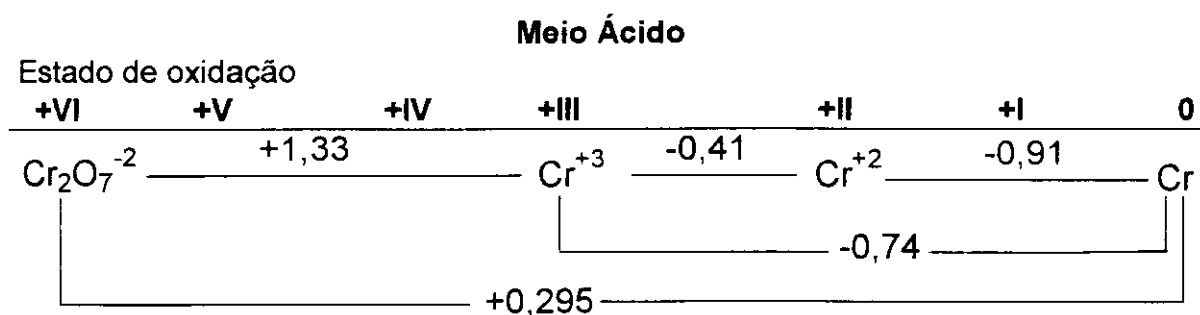
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características Físicas, Químicas e Toxicológicas do Cromo

A forma elementar do cromo foi primeiramente obtida a partir do mineral conhecido como crocoíta, $\text{PbO} \cdot \text{PbCrO}_4$, em 1798, pelo cientista francês Nicolas-Louis Vanquelin, (GREENWOOD e EARNSHAW, 1984). O nome cromo, derivado do grego "χρῶμα", croma que significa cor, foi dado ao elemento por causa da variedade de cores encontradas nos seus compostos.

Estima-se que a sua abundância na crosta terrestre está em torno de 122 $\mu\text{g/g}$. O mineral de maior ocorrência e conseqüentemente o de maior importância comercial é a cromita, $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$, que é encontrado em maior quantidade na África do Sul, que detém 36% de toda a reserva mundial, (STONE, 1987).

O cromo é o primeiro elemento de transição do grupo VIB. Na sua forma elementar ele é um metal branco, duro, brilhante e quebradiço, com ponto de fusão relativamente alto de 1890 °C. Nos compostos, ele pode existir com os estados de oxidação de -2 a 6. Os potenciais padrões de redução, em Volt, para os estados de oxidação mais comuns são esquematizados como se segue:



Os compostos de cromo trivalente são os mais estáveis e mais abundantes. Embora este estado de oxidação seja muito estável em soluções ácidas, ele é facilmente oxidado a Cr(VI) em soluções alcalinas, de acordo com o esquema acima. Ele ocorre principalmente como óxido (Cr_2O_3), também pode formar vários sais e complexos com ligantes inorgânicos e orgânicos, todos de grande estabilidade. Os compostos de cromo hexavalente são bem conhecidos como reagentes de laboratório pelo elevado poder de oxidação. O número de compostos conhecidos de Cr(VI) são relativamente limitados, incluindo os cromatos, $[\text{CrO}_4]^{2-}$, os dicromatos, $[\text{Cr}_2\text{O}_7]^{2-}$, trióxido de cromo, CrO_3 , oxialetos como CrO_3X^- e CrO_2X_2 ($\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}$ ou I), e CrOX_4 ($\text{X} = \text{F}$ ou Cl), e CrF_8 , (LEE, 1991).

Existem poucos compostos de Cr(V) e ainda assim são instáveis decompondo em compostos de Cr(III) e Cr(VI). Pode-se citar como exemplo, o K_3CrO_8 , um composto marron-avermelhado formado a partir da reação entre o Na_2CrO_4 e H_2O_2 em solução alcalina, O K_3CrO_8 contém o tetraperóxido $[\text{Cr}(\text{O}_2)_4]^{3-}$. Outro exemplo é o CrF_5 , que é um sólido vermelho, o qual é obtido pelo aquecimento dos elementos a 500°C or aquecendo CrO_3 com F_2 .

Os compostos de Cr(IV) são ainda mais raros e mais instáveis e a espécie mais conhecida é o óxido CrO_2 . Os outros compostos podem ser encontrados primariamente como misturas de óxidos com outros metais.

O Cr(II) é um poderoso agente redutor ($E^\circ = -0,41$), e somente em condições estritamente anaeróbicas ele se estabiliza em soluções aquosas. Em soluções ácidas ele pode reduzir lentamente a água liberando gás hidrogênio. Esta espécie é utilizada para remover traços de oxigênio em nitrogênio, (COTTON e WILKINSON, 1980). O estado de oxidação (+I) é muito raro e só existe quando estabilizado em um complexo como o perclorato de trispiridil cromo(I) $[\text{Cr}(\text{dipiridil})_3]^+\text{ClO}_4^-$.

Os compostos de Cr^0 são complexos envolvendo moléculas neutras doadoras de elétrons tais como CO e C_6H_6 , formando com o metal estruturas octaédricas. São solúveis em solventes orgânicos e podem ser estabilizados por sublimação sob pressão reduzida mas também oxidam-se a compostos contendo

cromo(I) como o cátion dibenzenocromo, $[\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_6)_2]^+$. Os estados de oxidação -I e -II são de pouca significância e seus compostos ocorrem como íons carbonilas. A Tabela 2.1. lista alguns compostos para cada estado de oxidação do cromo citados acima.

Tabela 2.1. Exemplos de compostos encontrados para cada estado de oxidação do cromo^a.

Estado de oxidação	Configuração do orbital externo	Exemplos
-2	$[\text{Ar}]4s^13d^7$	$[\text{Cr}(\text{CO})_5]^{2-}$
-1	$[\text{Ar}]4s^13d^6$	$[\text{Cr}_2(\text{CO})_{10}]^{2-}$
0	$[\text{Ar}]4s^13d^5$	$\text{Cr}(\text{CO})_6$, $\text{Cr}(\text{bipy})_3$, $\text{Cr}(\text{metálico})$, ligas
+1	$[\text{Ar}]4s^03d^5$	$[\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_6)_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{bipy})_3]^+$
+2	$[\text{Ar}]4s^03d^4$	$\text{CrCl}_2(\text{MeCN})_2$, CrCl_2 , CrS , CrF_2 , CrI_2
+3	$[\text{Ar}]4s^03d^3$	Cr_2O_3 , CrCl_3 , $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{CN})_6]$
+4	$[\text{Ar}]4s^03d^2$	K_2CrF_6 , Sr_2CrO_4 , CrO_2 , CrCl_4
+5	$[\text{Ar}]4s^03d^1$	CrO_4^{3-} , CrF_5 , CrOCl_4^- , $\text{Ca}_3(\text{CrO}_4)_2$
+6	$[\text{Ar}]4s^03d^0$	K_2CrO_4 , CrO_2Cl_2 , CrO_3 , CrF_6

^a Adaptado de COTTON e WILKINSON, 1980.

A toxicidade do cromo está ligada ao seu estado de oxidação. Enquanto o Cr(III) é considerado elemento essencial para os mamíferos, por seu papel no fator de tolerância à glicose e metabolismo de lipídios e proteínas, o cromo hexavalente é altamente tóxico, (COHEN et al., 1993). Esta toxicidade é geralmente atribuída ao seu elevado poder de oxidação e maior mobilidade. Sob condições fisiológicas o cromo hexavalente existe como um oxianion que é facilmente transportado para o interior das células via mecanismos de transporte de ânion preexistente. Dentro da célula o Cr(VI) é reduzido aos intermediários Cr(V) e Cr(IV) até finalmente atingir a forma mais estável, Cr(III), causando danos à célula por meio destas reações. A citotoxicidade de ambas as espécies solúveis e insolúveis de Cr(VI) mostram-se de 100 a 1000 vezes maior do que a apresentada pelos compostos de cromo trivalente, (KATZ e SALEN, 1993).

O cromo é largamente utilizado em galvanoplastia, em sistemas trocadores de calor por resfriamento a água como inibidor de corrosão, em

indústria de pigmentos, em siderurgia, etc, (KIRK e OTHMER, 1979). Seu elevado uso aumenta sua disseminação no ambiente contaminando solo, água e ar. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos estabeleceu o limite máximo de cromo em água potável como sendo 50 ng/mL. A concentração de cromo hexavalente em águas potáveis nos EUA varia entre 3 e 40 ng/mL com uma média de 3,2 ng/mL, (GREENBERG et al., 1992). Como os níveis de cromo são muito baixos, principalmente para o estado hexavalente, os métodos de determinação destas espécies devem ser bastante sensíveis para que possam monitorá-las no ambiente.

2.2. Métodos Para Determinação de Cromo

Dentre os métodos para a análise de traços das espécies de cromo podemos citar alguns que utilizam fotometria no VIS, (ONISHI, 1976; ZELENSKY et al., 1987; KAMBUROV, 1991, e KUSNETSOV e BIRYUKOVA, 1993), espectrofotometria de absorção atômica, (JORHEM, 1993; FUNG e SHAM, 1994; SOARES et al., 1994; OKTAVEC et al., 1995, e SAHUQUILLO et al., 1995), fluorimetria, (CABRERA-MARTIN et al., 1986; KABASAKALIS, 1993 e LONGINOVA, et al., 1995), potenciometria e voltametria, (LINTSCHINGER et al., 1995; MANZOORI e SHEMIRANI, 1995 e POWELL et al., 1995). Os mais difundidos são aqueles que utilizam absorção atômica e espectrofotometria no VIS, destacando-se entre estes o método fotométrico da difenilcarbazida (DFC), (SAVVIN et al., 1993; EDGELL et al., 1994; STEIN e SCHWEDT, 1994 e PANNAIN e SANTELLI, 1995). Este método é praticamente específico para Cr(VI), sofrendo interferência apenas de Fe(III), V(V), Mo(VI), Cu(II) e Hg(I e II), quando presentes em concentrações bastante elevadas em relação ao Cr(VI), (MARCZENKO, 1976). Outra vantagem deste método é a possibilidade de especiar Cr(III) e Cr(VI), visto que a DFC não reage com o Cr(III). Desta maneira o Cr(VI) é determinado na presença do Cr(III). Depois de oxidada esta espécie, o cromo total é determinado e por diferença calcula-se o teor de Cr(III), (ROCHA, 1983). É um método bastante sensível segundo de ANDRADE et al., 1983. Entretanto quando necessitamos determinar Cr(VI) em matrizes como água do

mar, água potável e atmosferas urbanas, que apresentam níveis médios dessa espécie em torno de 0,5 ng/mL, (JONG e BRINKMAN, 1978), 1,2 ng/mL, (WATSON, 1994) e 28 ng/m³, (HODGES, 1976), respectivamente, precisam-se de métodos mais sensíveis para alcançar tais níveis de concentração. Notáveis aumentos de sensibilidade podem ser conseguidos pela utilização de métodos cinéticos catalíticos de análise, (PEREZ-BENDITO e SILVA, 1988).

2.2.1. Métodos Cinéticos Catalíticos de Análise

Os métodos cinéticos de análise caracterizam-se pelo fato das medidas serem feitas sob condições dinâmicas nas quais as concentrações dos reagentes e produtos são mudadas continuamente. A velocidade de formação do produto ou diminuição da quantidade de reagentes é usada como parâmetro analítico. A velocidade na qual uma reação química se desenvolve depende de fatores tais como temperatura, pressão ou concentração dos reagentes, assim como a presença de catalisadores, ativadores ou inibidores. Algumas reações como a neutralização de um ácido forte com uma base forte são tão rápidas que atingem o equilíbrio quase que instantaneamente, enquanto outras, embora termodinamicamente favoráveis, são tão lentas que variações nos componentes do sistema reativo não são detectadas mesmo depois de longo intervalo de tempo, como é o caso da reação entre o As(III) e o Ce(IV) à temperatura ambiente. Reações lentas como esta podem ser aceleradas pela escolha da temperatura adequada ou pela adição de catalisadores para baixar a barreira de energia de ativação. Desta maneira, os métodos cinéticos podem ser divididos em catalíticos e não-catalíticos, (Tabela 2.2.). Os métodos catalíticos são subdivididos de acordo com o tipo de reação envolvida, e os métodos não-catalíticos são classificados de acordo com a aplicação na determinação de uma espécie ou de várias espécies em uma mistura, (PEREZ-BENDITO e SILVA, 1988).

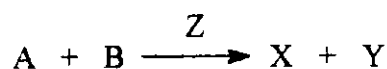
Tabela 2.2. Classificação dos métodos cinéticos baseada no tipo de reação química empregada^(a).

<u>Métodos Catalíticos</u>	
<u>Não-enzimáticos</u>	<u>Enzimáticos</u>
<ul style="list-style-type: none"> • São aplicados em sistemas homogêneos. • Utilizam reações redox, quimilunescência e complexação. • Pode ter o efeito do catalisador modificado por ativadores ou inibidores. • Aplicados também em titulações catalíticas. 	<ul style="list-style-type: none"> • São aplicados tanto em sistemas homogêneos quanto a heterogêneos com enzimas imobilizadas, (BOWERS 1982). • Pode ter o efeito da enzima modificado por ativadores ou inibidores.
Baseados no período de indução, (ZHU e GU, 1993)	
<u>Métodos não-catalíticos</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Determinação de espécies simples. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cinética diferencial para determinar os componentes de uma mistura, (LUQUE de CASTRO e VARCACEL CASES, 1984, e PÉREZ-BENDITO, 1984).

^(a) Adaptada de PEREZ-BENDITO e SILVA, 1988 E MOTTOLA, 1988.

O princípio do método catalítico ou catalimétrico baseia-se na medida do acréscimo da velocidade de uma determinada reação química, causado por uma catálise homogênea. O componente a ser determinado pode atuar como um catalisador ou, nos métodos indiretos como um inibidor ou ativador. A reação química cuja mudança na velocidade é dependente da concentração do catalisador e usada para determinar o teor de catalisador, ativador ou inibidor em uma amostra, é denominada de reação indicadora. Na maioria dos casos, somente a mudança na concentração de uma substância participante da reação é determinada, (substância indicadora). Essas variações vêm sempre acompanhadas de mudanças nas propriedades físicas mensuráveis tais como: absorvância, potencial, condutividade, etc., as quais permitem o monitoramento da velocidade da reação.

Para uma reação acelerada por um catalisador Z:



A velocidade da reação é:

$$v = \frac{dC_X}{dt} = \frac{dC_Y}{dt} = (k + k_Z C_Z^{n_Z}) C_A^{n_A} C_B^{n_B}$$

onde n_A , n_B e n_Z são ordens da reação para os substratos e o catalisador, e k , k_Z são constantes de velocidade para as reações não catalisadas e catalisadas, respectivamente. Como a velocidade v da reação e a concentração C_Z do catalisador para determinados intervalos de concentração, são diretamente proporcionais, $n_Z = 1$, a equação da velocidade resulta na seguinte função geral para determinações cinéticas catalíticas, admitindo que $k \rightarrow 0$:

$$C_Z = \frac{v}{C_A^{n_A} C_B^{n_B} k_Z} = \frac{1}{C_A^{n_A} C_B^{n_B} k_Z} \frac{dC_X}{dt}$$

x em C_x é usado para denotar a substância indicadora.

Os métodos de determinação podem ser classificados de acordo com a ordem cinética da reação indicadora em: (i) métodos diferenciais ou pseudo ordem zero que são aplicados quando as concentrações de A ou B são elevadas, e o grau de conversão pode ser desprezado, (ii) métodos integrais ou pseudo primeira ordem e segunda ordem, aplicados quando o grau de conversão não pode ser desprezado sob comparações com as concentrações iniciais (C_0) de A e, ou de B. Nas duas categorias podem ser usadas as técnicas da tangente ou velocidade inicial, tempo variável e tempo fixo, como mostrado na Tabela 2.3. O catalisador é então determinado por meio de curvas de calibração obtidas para os diferentes métodos. Dos métodos mencionados acima, o mais utilizado é o método do tempo fixo por ser de mais fácil operação e de fácil adaptação a sistemas de análise em fluxo, (YAMANE, 1986 e EIRAS, 1991).

Tabela 2.3. Características dos métodos diferencial e integral quanto à dependência sobre a concentração do catalisador^(a).

	Diferencial	Integral
Equação	$C_K = \frac{\Delta C_X}{\Delta t K_K C_{A_0} C_{B_0}}$	$C_K = \frac{\Delta \ln C_A}{\Delta t K_K C_{B_0}} \quad (b)$
Método da Tangente	$\frac{\Delta C_X}{\Delta t} \propto C_K$	$\frac{\Delta \ln C_A}{\Delta t} \propto C_K \quad (c)$
Tempo Fixo ($\Delta t = \text{cte.}$)	$\Delta C_X \propto C_K$	$\Delta \ln C_A \propto C_K$
Conc. Fixa (ΔC_X e $\Delta \ln C_A = \text{cte.}$)	$\frac{1}{\Delta t} \propto C_K$	$\frac{1}{\Delta t} \propto C_K$

^(a) Adaptada de MÜLLER, (1982).

^(b) O símbolo \propto significa "proporcional à".

^(c) C_{A_0} e C_{B_0} são concentrações iniciais de A e B respectivamente.

Relativamente poucos métodos catalíticos para a determinação de Cr(VI) são citados nas revisões, (MOTTOLA e PÉREZ-BENDITO, 1994). Alguns pesquisadores utilizam a oxidação do iodeto a iodo, por peróxido de hidrogênio ou bromato, como reação indicadora, auxiliados por diferentes sistemas de detecção. HADJIIOANNOU, (1968), utilizou a reação de oxidação do iodeto por peróxido de hidrogênio, na determinação catalítica de Cr(VI), com detecção espectrofotométrica do iodo formado na reação, em 365 nm. O método do tempo variável, (concentração fixa), foi utilizado neste experimento. O Cr(VI) foi determinado até concentrações de 0,2 µg/mL com erro relativo de 1,2%. No estudo de interferentes, o autor mostrou que o referido método é também usado para na determinação de Mo(VI) e W(VI).

Em trabalho recente, GU e WANG, (1995), estudando o comportamento deste mesmo sistema indicador com os catalisadores Cr(VI) e W(VI) observou que as curvas de velocidade para as duas espécies comportam de maneira independente. Com o auxílio de métodos estatísticos multivariados eles conseguiram determinar simultaneamente, Cr(VI) e W(VI) utilizando um método catalítico, o que não é comum, visto que métodos cinéticos diferenciais são usados em determinações multicomponentes.

Outros pesquisadores como WOLFF e SCHWING, (1976), também utilizaram a reação de oxidação do iodeto na determinação de Cr(VI) com um sistema de detecção amperométrico. A sensibilidade do método aumentou-se e o Cr(VI) e o W(VI) foram determinados a concentrações em torno de 5 ng/mL.

O método catalítico para Cr(VI), que baseia-se na oxidação da o-dianisidina foi primeiramente proposto por BUSCARÓNS e ARTIGAS, (1957), que iniciaram seus trabalhos em métodos de análise qualitativa de CrO_4^{2-} . Mais tarde DOLMANOVA et al., (1969), utilizando como agente oxidante o peróxido de hidrogênio, determinou microquantidades de Cr(VI) em AlCl_3 , estudando também os efeitos de vários interferentes químicos mostrando que o Cr(III) interfere na proporção de 1:1 em relação ao Cr(VI), podendo também ser determinado pelo mesmo método. O Cu(II) e o Fe(III) também apresentaram séria interferência.

Em trabalhos posteriores eles estudaram o efeito de ativadores sobre a reação catalisada, (DOLMANOVA et al., 1972), mecanismos da ação catalítica do íon cromo sobre o sistema reativo, (DOLMANOVA e SHEKHOVTSOVA, 1977) e o estudo do meio orgânico aquoso sobre a reação catalisada, (DOLMANOVA et al., 1978). Nesta última citação eles investigaram a influência de misturas binárias de água com cada um dos solventes, entre eles: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, etileno glicol, acetona e dimetilformamida, concluindo que os solventes que produziram melhores resultados, em relação à sensibilidade, foram a acetona e a dimetilformamida.

Os pesquisadores KNEEBONE e FREISER, (1975), em trabalho utilizando este mesmo método, determinaram Cr(VI) em atmosferas industriais eliminando o interferente Cr(III) e outros cátions pelo uso de resinas de troca iônica. A eficácia do método de eliminação dos interferentes foi coferida ao fato de que esses encontravam-se em concentração tão baixa como o próprio Cr(VI).

Os métodos catalíticos têm como desvantagem a baixa seletividade, (OTTO et al., 1978), terminologia recomendada pela IUPAC para denotar a extensão que um determinado método é livre de interferência por outra espécie química, (DEN BOEF e HULANICKI, 1983). muitas tentativas têm sido feitas para aumentar a seletividade de tais métodos como a otimização de procedimentos e o uso de técnicas de separação, (MÜLLER, 1995).

A maneira mais eficaz de eliminar os interferentes e, portanto, a que mais tem sido utilizada por vários pesquisadores, não só nos métodos cinéticos mas também em absorção atômica, (KUMPULAINEN e KOIVISTOINEN, 1977), é a extração com metil isobutil cetona em meio clorídrico. Metodologia que foi primeiramente proposta por KATZ et al., (1962), em estudos da separação de Cr(VI) por cetonas. Esta técnica de separação foi utilizada por MÜLLER et al., (1980), para determinação de cromo em soro sanguíneo pelo método catalítico da o-dianisidina. Após a mineralização e extração ele utilizava a própria solução orgânica contendo o Cr(VI) para catalisar a reação indicadora. Os resultados obtidos foi de 30 ng/mL de Cr(VI) por mililitros de soro sanguíneo com coeficiente de variação de aproximadamente 12%.

2.3. Otimização de Procedimentos em Química Analítica

A maioria dos procedimentos de laboratórios, durante ou após seu desenvolvimento, passa por um processo de otimização. Tais processos consistem em melhorar algum tipo de resposta de interesse do pesquisador estudando diferentes variáveis que, dentro do sistema, exercem influencia sobre aquele tipo de resposta, (BAYNE e RUBIN, 1986). As variáveis resposta podem ser o rendimento de uma reação química, a sensibilidade, a precisão e, ou a seletividade de uma determinação, custo operacional de uma análise, etc. Estas respostas são denominadas de variáveis dependentes, pois seus valores podem variar de acordo com os níveis assumidos por outras variáveis chamadas de variáveis independentes. Valores limitados das variáveis independentes formam o que se-chama, no campo da estatística, de região experimental, (CORNELL, 1990). Nesta região o pesquisador tem a liberdade de variar os níveis das variáveis com o objetivo de melhorar o quanto possível a(s) sua(s) resposta(s).

Existem duas maneiras de proceder a uma otimização, (BOSQUE-SENDRA et al., 1995), a primeira delas, mais utilizada e na maioria das vezes menos eficiente, consiste em variar apenas um fator de cada vez, mantendo os outros fixos. Este método é conhecido como método do fator único. A segunda,

mais eficiente e a que mais aproxima-se da realidade é o método multifatorial no qual todas as variáveis são estudadas simultaneamente, (BOX et al, 1978).

O método de otimização mais utilizado é o Simplex Sequencial, (SPENDLEY, et al., 1962; BROWN, 1990 e ROZYCKI, 1993), por ser uma técnica empírica que não requer o emprego de testes de significância, por permitir ao pesquisador desconhecer completamente a forma de relação matemática existente entre a resposta e as variáveis independentes e ainda serem capazes de otimizar sistemas controlados por um grande número de variáveis independentes.

A metodologia de superfícies de resposta que consiste de um grupo de técnicas usadas no estudo das relações entre uma ou mais respostas, e um número de variáveis como tempo, temperatura, pressão e concentração, (BOX et al., 1978), é também bastante utilizada em química analítica, (CAETANO et al., 1992; GONZALEZ-ARJONA e GUSTAVO-GONZALEZ, 1994, e BOSQUE-SENDRA et al., 1995).

Quando a resposta de interesse depende somente das proporções entre os componentes da mistura e não das suas quantidades, planejamentos para experimentação com misturas são necessários para otimizar o sistema, (CORNELL, 1990a).

Os planejamentos com misturas são comumente utilizados para otimizar misturas de solventes em cromatografia, pois a eficiência da separação depende das propriedades das misturas de solventes.

PALASOTA e DEMING, (1992), otimizaram uma fase móvel formada por três componentes, com o objetivo de predizer a composição do sistema de solventes que proporcionaria melhor separação de três aminoácidos, fenilalanina, tirosina e triptofano.

COENEGRACHT, et al., (1991), também utilizaram a metodologia de misturas no estudo da separação de drogas básicas e alcalóides utilizando um sistema quaternário de solventes formado por dietilamina, CHCl_3 , acetato de etila e metanol.

A utilização de misturas de solventes como meio reacional nos métodos de determinação tem aumentado gradativamente devido a possibilidade, através

deste recurso, de aumentar a sensibilidade, (GILBERT e PENNEY, 1983), e a seletividade das determinações, (MANJEREKAR e ARGEKAR, 1995), de proporcionar a determinação e, ou a utilização de substâncias imiscíveis ou insolúveis em água, (PUACZ, 1987) e a obtenção de novos métodos de determinação por meio da modificação dos parâmetros cinéticos das reações, (ADEYOJU et al., 1994).

O interesse por este assunto pode ser verificado na literatura através de algumas revisões envolvendo o uso de meio não aquoso e de misturas de solventes em polarografia e voltametria, (BERSIER e BERSIER, 1985), titulações redox (BEREK e BERKA, 1984) e envolvendo aplicações com eletrodos seletivos, (PUNGOR et al., 1983), que somam juntas um total de 1365 citações de trabalhos publicados de 1958 até 1985.

Se por um lado existe uma infinidade de trabalhos a este respeito, por outro, quando se trata da utilização de planejamentos experimentais para mistura na otimização do sistema de solventes, poucos são os pesquisadores que se ocuparam de utilizar este recurso.

EIRAS, et al., (1994), utilizaram um planejamento para misturas no estudo de efeito das misturas dos solventes água, etanol e metil isobutil cetona na determinação de Cu(II) por espectrofotometria de absorção atômica, obtendo uma mistura otimizada dos três solventes que proporcionou considerável aumento na sensibilidade do método.

Na determinação de molibdênio após extração em clorofórmio com α -bezoinoxima, CUELBAS, (1994), otimizou uma mistura contendo água, etanol e clorofórmio como meio reacional entre molibdênio e tiocianato, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método para determinação do molibdênio. Para isto ele utilizou um planejamento experimental para misturas denominado de "Simplex-Centroid", (SCHEFFÉ, 1963), na região de única fase do sistema. A mistura de solventes que produziu maior resposta, neste caso a intensidade da absorção do complexo molibdênio-tiocianato na região do visível, foi de 13%, 42% e 45% m/m em água, clorofórmio e etanol.

Nos experimentos com misturas, como já foi mencionado, as respostas são funções somente das proporções entre os componentes. Entretanto, em

muitos experimentos, deparamos com situações onde outras variáveis, além dos componentes da mistura, também influenciam nas propriedades do desta mistura, (CORNELL, 1988). Tais variáveis, (temperatura, tempo, pressão, concentração, etc.), são chamadas de variáveis de processo, (CORNELL e DENG, 1982). Neste caso, torna-se necessário que um planejamento combinando os dois tipos de variáveis seja feito para estudar os efeitos de ambos. Este planejamento é conhecido como "Split-Plot", (WOODING, 1973).

CORNELL e GORMAN, (1984), mostraram a utilização deste tipo de planejamento na otimização de procedimentos para a produção de patês de peixes, onde três espécies de peixes entraram como variáveis de mistura e como variáveis de processo, os tempos de fritura e de cozimento e a temperatura de cozimento.

Outra aplicação deste método foi demonstrada por DUINEVELD, et al., (1993), na formulação de medicamentos.

Embora, não tenha sido encontrado algum exemplo na literatura, relacionado à aplicação desta metodologia em química analítica, tal procedimento de otimização pode ser aplicada facilmente na otimização de reações químicas em misturas de solventes.

3. EXPERIMENTAL

Os experimentos foram efetuados empregando-se água deionizada e reagentes de pureza analítica. Os ensaios usados para o planejamento com misturas e superfície de respostas foram conduzidos em frascos de vidro com tampas de plástico, com capacidade para 30 mL. Todo material de vidro e de polietileno foi lavado com detergente, enxaguado em água corrente e em água deionizada. Os detalhes de todo o procedimento são mostrados a seguir:

3.1. Materiais e Instrumentos Utilizados

- As pesagens foram efetuadas em balança analítica Fischer Scientific modelo A-250.
- As medidas de pH foram realizadas utilizando-se um pHmetro CH-9101 Herisau modelo 691 da METROHM, com eletrodo combinado para pH.
- Um banho maria QUIMIS modelo 334-26 foi utilizado para manter a água destinada a extração do Cr(VI) da fase orgânica a 70°C.
- O aquecimento das soluções das amostras para reação de oxidação do Cr(III) para Cr(VI) foi feito em chapa de aquecimento QUIMIS modelo 215-42.
- A calcinação do material vegetal foi realizada em mufla marca Thermotec a 600 °C.
- As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro HITACHI U2000 acoplado com cela de fluxo de caminho ótico de 10 mm. Um esquema do equipamento para leitura em cela de fluxo, utilizando bomba de aquário para a sucção da amostra através da cela, é mostrado na Figura 3.1.

- As medidas volumétricas foram realizadas utilizando micropipetas, pipetas volumétricas e graduadas, balões e buretas, todos aferidos.

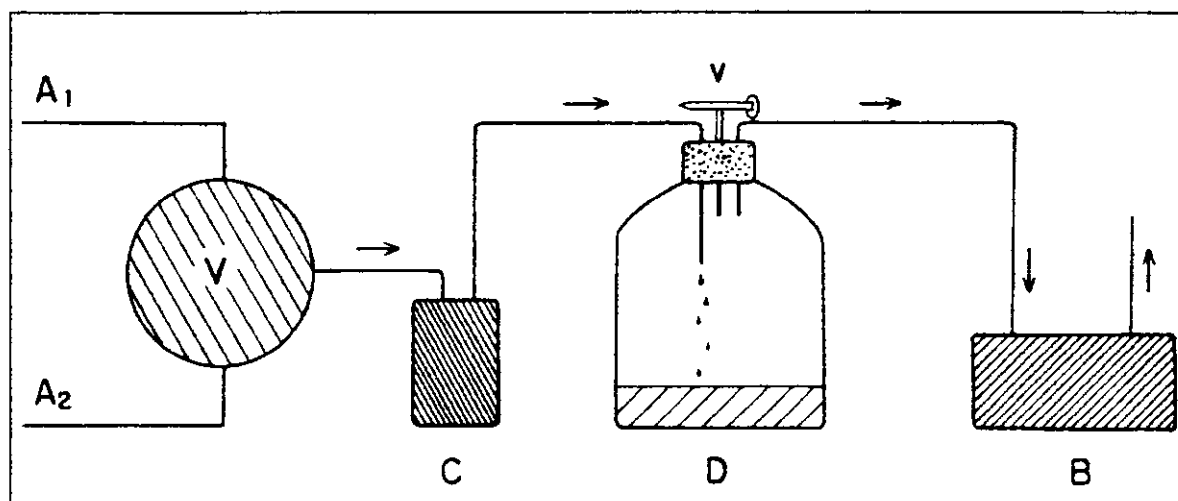


FIGURA 3.1. Esquema do equipamento utilizado para leitura em cela de fluxo: (A₁) Entrada da amostra com a válvula (V) desligada, (A₂) entrada de água para limpeza da cela com a mesma válvula (V) ligada, (C) cela de fluxo, (D) frasco para descarte, (v) válvula de controle manual para regular a vazão e (B) bomba de aquário, adaptada para este propósito.

3.2. Reagentes e Soluções

- A solução padrão de Cr(VI) 1000 µg/mL, foi preparada pela dissolução de 2,8289 g de K₂Cr₂O₇ >99,5% (MERCK) para dar um volume final de 1000 mL, aferido em balão volumétrico. Esta solução foi estocada em frasco de polietileno.
- As soluções de o-dianisidina (3, 3'-Dimetoxibenzidina) (Figura 3.2), 0,05 mol/L, foram preparadas dissolvendo 1,2215 g do reagente (ALDRICH), sem prévia purificação, em acetona ou dimetilformamida e os volumes completados para 100 mL em balão volumétrico com os respectivos solventes. As soluções foram armazenadas em frascos escuros. Mesmo com estas precauções, é recomendada a utilização das soluções por no máximo uma semana, de acordo com KNEEBONE e FREISER, (1975). Uma curva de absorvância

versus tempo para o-dianisidina estocada em geladeira, foi levantada a 450 nm para confirmar o limitado tempo de validade da solução, o resultado é mostrado na Figura 3.3.

- As soluções de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ foram obtidas dos padrões (SPEX) por diluições convenientes.

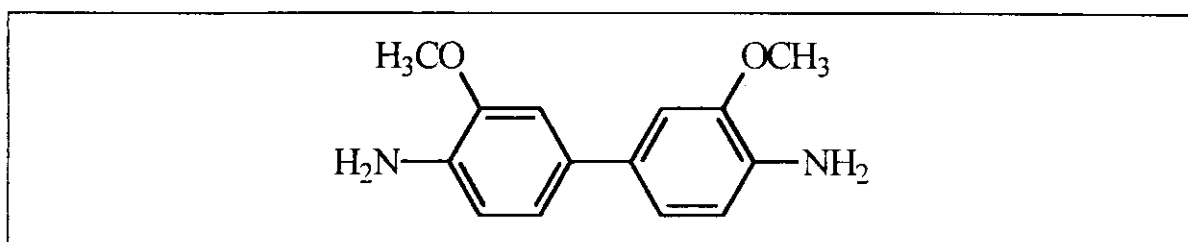


FIGURA 3.2. Fórmula estrutural da o-dianisidina (3,3'-Dimetoxibenzidina)

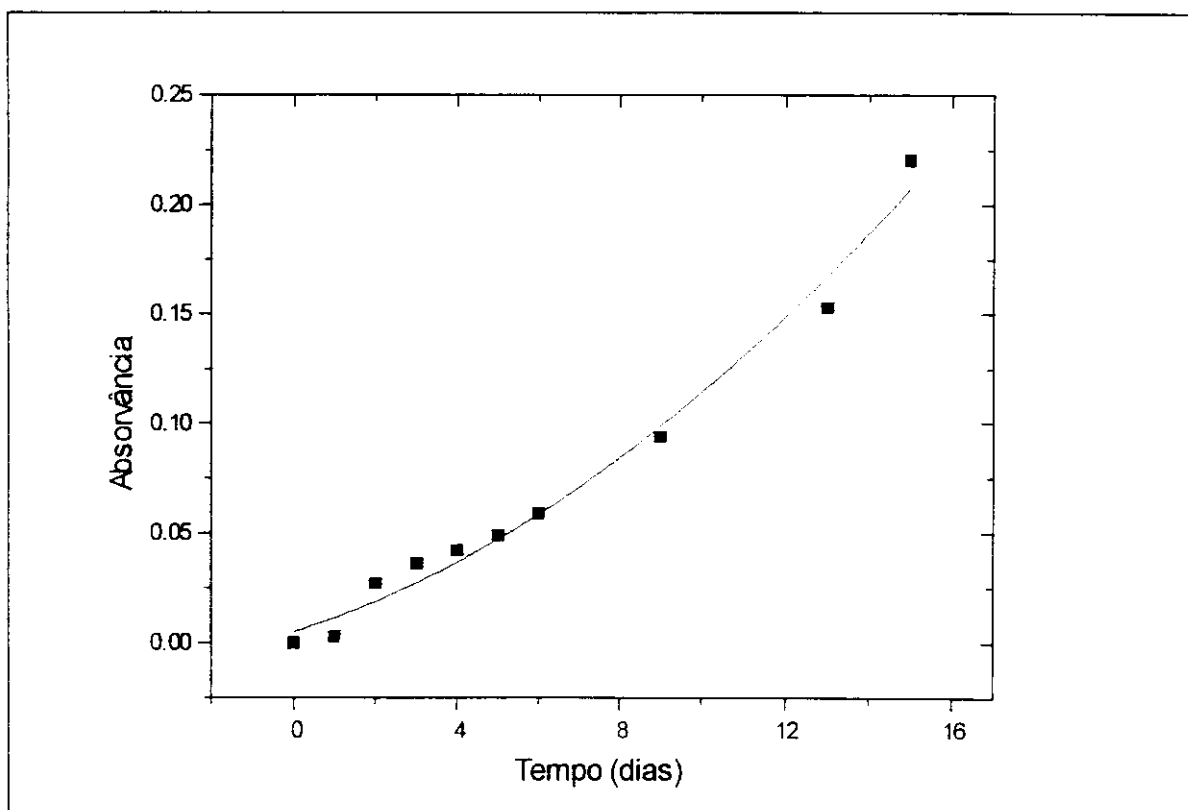


FIGURA 3.3. Aumento da absorvância da o-dianisidina com o tempo em 450 nm de uma solução contendo 0,05 mol/L do reagente em acetona.

- A solução de EDTA 0,1 mol/L foi obtida da dissolução de 3,722 g de EDTANa₂ (MERCK), em água e o volume completado para 100mL em balão volumétrico. Para o teste de interferência, esta solução foi diluída para 0,002 mol/L.
- A solução contendo H₂PO₄⁻, 1000 µg/mL em P, foi preparada pela dissolução de 4,394 g de KH₂PO₄ (MERCK) em água e o volume completado para 1000 mL em balão volumétrico.
- A solução contendo SO₄²⁻ na concentração de 1000 µg/mL em S, foi preparada pela dissolução de 4,430 g de Na₂SO₄ (Grupo Química) em água e o volume final completado para 1000 mL em balão volumétrico.
- A solução de (NH₄)₂S₂O₈ (Mallinckrodt), destinada à oxidação de todo o cromo a Cr(VI), foi preparada pela dissolução de 22,820 g do sal, em água, e o volume completado para 100 mL em balão volumétrico.
- A solução tampão de biftalato de potássio, HC₈H₄O₄⁻/C₈H₄O₄²⁻, 0,15 mol/L e pH = 5, foi preparada dissolvendo-se 3,060 g de KHC₈H₄O₄ (QEEL) em 50 mL de solução de NaOH 0,15 mol/L. Em seguida completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico, tendo o cuidado de antes confirmar o valor do pH usando um pHmetro.

3.3. Planejamento de Mistura

Em cada ponto de um fatorial completo 2³ para as variáveis de processo, representadas aqui por ácido clorídrico, (variável Z₁), o-dianisidina, (variável Z₂) e peróxido de hidrogênio, (variável Z₃), foi feito um planejamento para misturas com três componentes, água, (variável X₁), acetona, (variável X₂) e DMF, (variável X₃), o qual é mostrado na Figura 3.4. As restrições na região experimental para misturas formando uma figura irregular, foram inevitáveis devido a baixa solubilidade do reagente orgânico em água e a presença de componentes aquosos como HCl e H₂O₂. O planejamento combinado, denominado de "Split-

Plot", (WOODING, 1973), é mostrado na Figura 3.5. A Tabela 3.1 mostra as proporções em porcentagem de massa dos componentes das misturas junto com seus respectivos valores em pseudocomponentes denotados por X_1 , X_2 e X_3 . A Tabela 3.2 traz o fatorial completo 2^3 para as três variáveis de processo em mol/L e em variáveis escalonadas.

Os componentes das misturas foram adicionados, um-a-um, nos frascos de vidro, respeitando as suas proporções em massa para cada ponto do planejamento experimental.

As variáveis Z_1 e Z_3 , representadas pelas soluções de HCl 0,01 mol/L [50 μ L, (nível -), ou 500 μ L, (nível +)] e H_2O_2 9,7 mol/L [300 μ L, (nível -), ou 600 μ L, (nível +)] respectivamente e a solução de Cr(VI) a 4 μ g/mL (500 μ L), foram adicionadas como componente água, por serem soluções aquosas

A variável Z_2 , constituída pelas soluções de o-dianisidina 0,05 mol/L [300 μ L, (nível -), ou 600 μ L, (nível +)] em acetona ou DMF, entraram como componente acetona ou DMF, dependendo da proporção destes componentes na mistura em cada ponto do planejamento.

Depois de preparadas as misturas, sem a adição de H_2O_2 , foram adicionados 300 μ L ou 600 μ L deste reagente. Deixou-se a reação se processar por 20 minutos e fez-se a leitura em 450 nm. Os "brancos" foram preparados pelo mesmo procedimento, sem a adição de Cr(VI). A massa total da mistura foi de 10 gramas. Os experimentos contendo Cr(VI) foram feitos em duplicata e apenas uma medida para cada branco, perfazendo um total de 240 medidas. A temperatura do laboratório foi mantida aproximadamente a $(22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ com aparelhos de ar condicionado, não utilizando portanto, nenhum equipamento especial para regular a temperatura da mistura reacional.

TABELA 3.1. Delineamento experimental para mistura

Ensaio	COMPONENTES (% m/m)			PSEUDOCOMPONENTES		
	Água	Acetona	DMF	X ₁	X ₂	X ₃
1	70	30	0	5/8	3/8	0
2	20	80	0	0	1	0
3	20	0	80	0	0	1
4	70	0	30	5/8	0	3/8
5	45	55	0	5/16	11/16	0
6	20	40	40	0	1/2	1/2
7	45	0	55	5/16	0	11/16
8	45	27,5	27,5	5/16	55/160	55/160
9	57,4	21,3	21,3	374/800	213/800	213/800
10	32,5	16,9	50,6	5/32	169/800	253/400

TABELA 3.2. Planejamento fatorial completo 2³

Ensaio	VARIÁVEIS ORIGINAIS (mol/L)			VARIÁVEIS CODIFICADAS		
	HCl	o-dianisidina	H ₂ O ₂	Z ₁	Z ₂	Z ₃
1	5,0 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻³	0,29	-1	-1	-1
2	5,0 x 10 ⁻⁴	1,5 x 10 ⁻³	0,29	+1	-1	-1
3	5,0 x 10 ⁻⁵	3,0 x 10 ⁻³	0,29	-1	+1	-1
4	5,0 x 10 ⁻⁴	3,0 x 10 ⁻³	0,29	+1	+1	-1
5	5,0 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻³	0,58	-1	-1	+1
6	5,0 x 10 ⁻⁴	1,5 x 10 ⁻³	0,58	+1	-1	+1
7	5,0 x 10 ⁻⁵	3,0 x 10 ⁻³	0,58	-1	+1	+1
8	5,0 x 10 ⁻⁴	3,0 x 10 ⁻³	0,58	+1	+1	+1

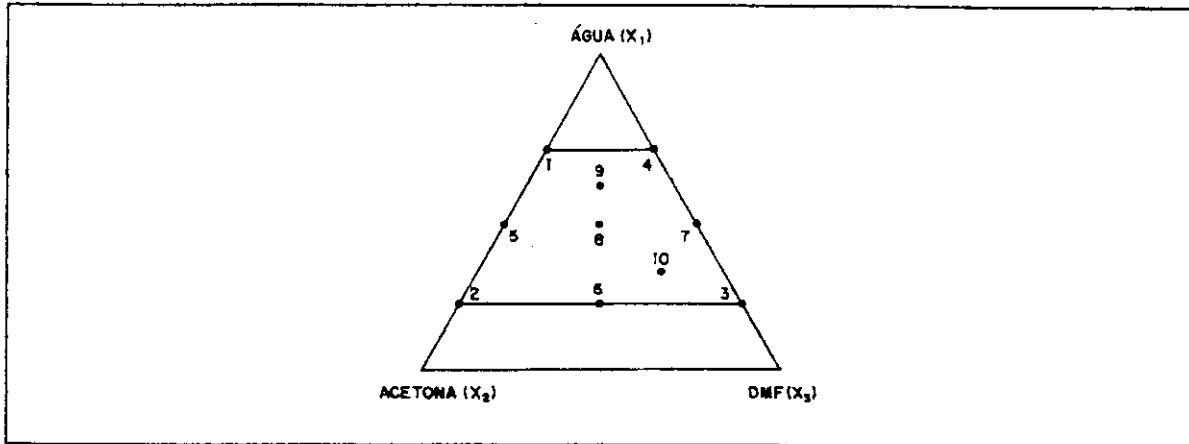


FIGURA 3.4. Planejamento experimental para mistura restrito a uma subregião do "Simplex" devido a problemas experimentais. Os pontos 9 e 10 podem ser utilizados para testar os modelos de mistura.

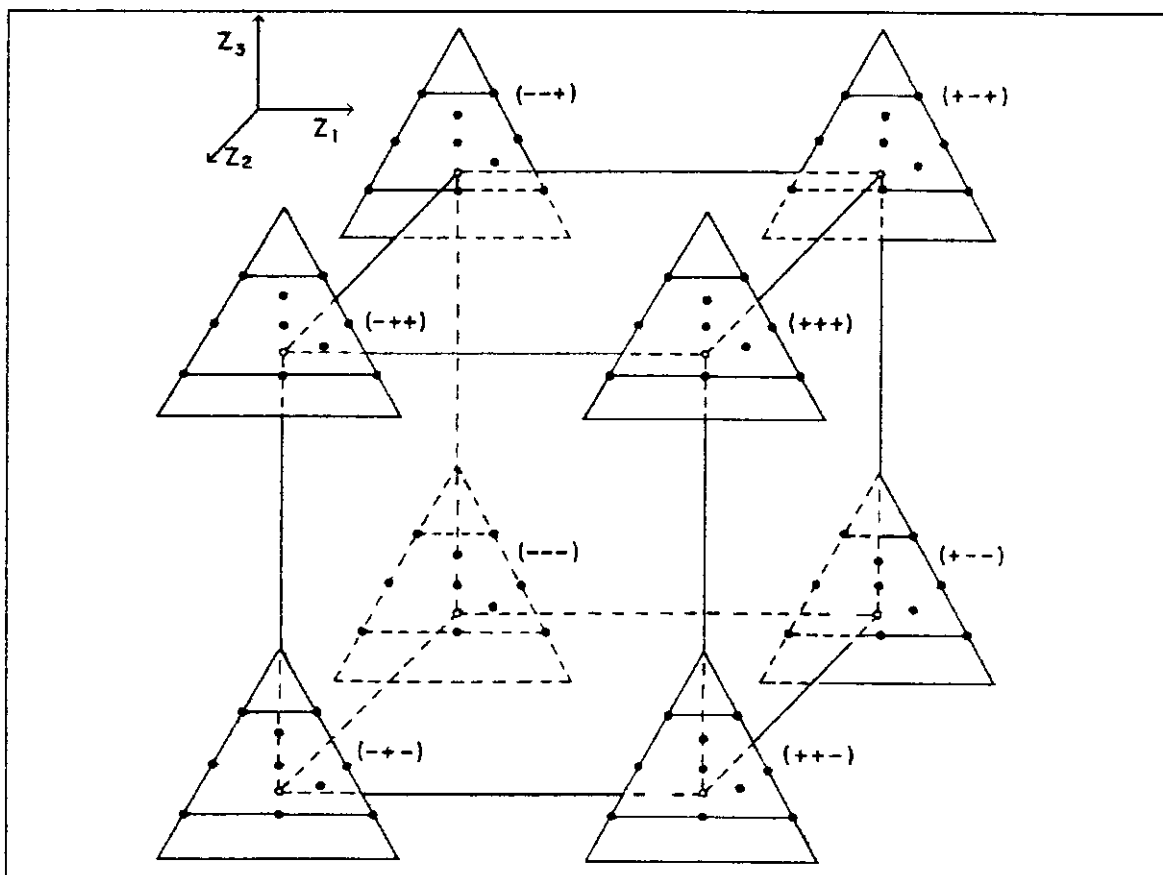


FIGURA 3.5. Representação do planejamento experimental "Split-Plot", no qual um experimento com misturas é feito em cada ponto de um arranjo fatorial.

3.4. Planejamento de Superfícies de Resposta

Através de um modelo linear obtido do fatorial no ponto (1) do experimento com misturas, fez-se o “caminho de ascensão ao máximo”, obtendo-se um planejamento para o modelo polinomial quadrático nas variáveis Z_1 (HCl), Z_2 (o-dianisidina) e Z_3 (H_2O_2), (BARROS NETO et al., 1995),. A Tabela 3.3 mostra os valores das variáveis em concentração (mol/L) para cada ponto do delineamento. Foram feitas quatro replicatas no ponto central, para estimativa do erro experimental, e os outros ensaios foram feitos sem replicatas.

TABELA 3.3. Níveis do planejamento de Superfícies de Resposta, para modelo quadrático, e seus respectivos valores em mol/L para Z_1 , Z_2 e Z_3 .

Níveis	HCl (Z_1)	o-dianisidina (Z_2)	H_2O_2 (Z_3)
	conc. (mol/L)		
$-\sqrt[4]{2^3}$	$4,6 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-2}$	0,45
-1	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-2}$	0,58
0	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78
1	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-2}$	0,97
$\sqrt[4]{2^3}$	$1,14 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-2}$	1,11

3.5. Estudo da Seletividade do Método

Neste estudo foram utilizadas duas estratégias: (i) estudo unifatorial, onde a análise de cada íon interferente foi efetuada separadamente e (ii) o efeito de cada íon e as interações entre eles utilizando-se um planejamento fatorial 2^6 .

3.5.1. Análise Unifatorial de Interferentes

A Tabela 3.4 traz o intervalo de concentração estudado para cada íon interferente.

TABELA 3.4. Faixa de concentração utilizada no estudo unifatorial de interferentes.

Interferente	Faixa de conc. do interfer. para cada 10 ng/mL de Cr(VI)			
	(µg/mL)		(mol/L)	
$C_8H_5O_4^-$ ^(a) , como $KHC_8H_4O_4$	_____	_____	10^{-5}	_____
Na^+ , como NaCl	_____	_____	0,05	_____
Cr(III), como $Cr(NO_3)_3$	0,01	_____	0,1	_____
Cu(II), como $Cu(NO_3)_2$	0,01	_____	0,08	_____
Fe(III), como $Fe(NO_3)_3$	0,1	_____	5	_____
Co(II), como $Co(NO_3)_2$	1	_____	5	_____
Zn(II), como $Zn(NO_3)_2$	1	_____	20	_____
Mg(II), como $Mg(NO_3)_2$	1	_____	20	_____
Mo(VI), como MoO_4^{2-}	0,25	_____	10	_____
EDTA, como EDTANa ₂	0,01	_____	1	_____
P(V), como KH_2PO_4	0,5	_____	6	_____
S(VI), como Na_2SO_4	1	_____	30	_____
NH_4^+ , como NH_4Cl	1	_____	200	_____
K^+ , como KCl	1	_____	200	_____
Na^+ , como NaCl	1	_____	50	_____

^(a) Foi utilizada uma solução tampão, $HC_8H_4O_4/C_8H_4O_4^{2-}$, a pH 5.

Nesta etapa os íons Cr(III), Cu(II), Fe(III), Co(II), Zn(II), Mg(II), Mo(VI), EDTA, $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} , NH_4^+ , K^+ , $C_8H_5O_4^-$ e Na^+ foram estudados um de cada vez. Concentrações crescentes dos interferentes foram adicionadas para uma concentração de Cr(VI) de 10 ng/mL. Os valores da absorvância foram medidos e registrados após 20 minutos.

3.5.2. Análise Multifatorial de Interferentes

Um planejamento fatorial completo 2^6 foi feito para as variáveis representadas por Cr(III), Cu(II), Fe(III), Zn(II), Mo(VI) e EDTA. Os níveis das variáveis foram estabelecidos a partir dos resultados obtidos no item 3.5.1. Estas espécies foram escolhidas devido a uma ação interferente mais pronunciada, importância em amostras de plantas e por participar de alguns tratamentos de amostras. O Cr(VI), assim como no estudo anterior, é mantido a uma concentração de 10 ng/mL. Os níveis dos interferentes são mostrados na Tabela 3.5.

TABELA 3.5. Níveis dos interferentes no planejamento fatorial completo 2^6 .

Íon Interferente	Níveis (ng/mL)		Relação entre conc. interfer./conc. Cr(VI)
	-	+	
Cr(III)	0	20	2
Cu(II)	0	20	2
Fe(III)	0	500	50
Zn(II)	0	1000	100
Mo(VI)	0	2000	200
EDTA	0	400	40

3.6. Determinação de Cromo em Amostras Reais

Duas amostras vegetais, uma fornecida pelo programa "International Plant-Analytical Exchange" (IPE) da Universidade de Wageningen (Holanda), (amostra 6378) e a outra, amostra de pimenteira (AP), com valor de referência para cromo, fornecida pelo "National Institute for Environmental Studies" (Japão), e duas amostras de água residual de indústria de celulose, que foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica em forno de grafite, foram utilizadas para demonstrar a aplicabilidade do método.

3.6.1. Preparação das Amostras

Foram pesadas 0,2000 gramas da amostra 6378 e 0,5000 gramas da amostra AP, com triplicatas, em cápsulas de porcelana e procedeu-se a uma pré-calcinação em placas de aquecimento. As cápsulas com as amostras foram transferidas para a mufla a 600 °C onde permaneceram por 5 horas. Após calcinação adicionaram-se 10 mL de solução de HCl 1:1 e aqueceu-se até a secura. Ao resíduo, previamente umedecido com água desionizada, foi adicionado 1 mL de solução HNO₃ concentrado, 10 mL de água desionizada e a mistura resultante foi filtrada para béqueres de 150 mL, lavando as cápsulas cuidadosamente com 20 mL de água desionizada. A cada amostra foram adicionados aproximadamente 5 mL de solução de amônia a 3 mol/L para elevar o pH para um valor entre 3 e 5. Todo cromo contido nas amostras foi então oxidado a Cr(VI) adicionando-se 2 mL de solução de persulfato de amônio a 1 mol/L e 2 mL de solução de AgNO₃ 30 µg/mL para catalisar a reação. Os béqueres foram cobertos com vidro de relógio e a solução foi aquecida por 30 minutos, sem ebulição. Logo em seguida, para cada amostra, procedeu-se à ebulição para decompor o excesso de persulfato. As amostras de água foram filtradas em papel Whatman 40 e alíquotas de 40 mL, em triplicatas, foram medidas, iniciando-se o tratamento na etapa de oxidação do Cr(III) a Cr(VI). Os brancos de cada amostra passaram pelo mesmo processo da amostra correspondente.

3.6.2. Extração do Cr(VI) por Metil Isobutil Cetona

O volume da solução da amostra foi acrescido para aproximadamente 50 mL de maneira que a concentração de HCl na solução ficasse em torno de 1 mol/L. Os béqueres foram colocados em banho de gelo juntamente com a metil isobutil cetona saturada com HCl 1 mol/L, até atingir equilíbrio térmico. As amostras foram transferidas para funis de separação, previamente resfriados em

refrigerador, e a extração foi feita sob agitação por aproximadamente 1 minuto com 10 mL de MIC. Esperou-se a separação das fases e descartou-se a fase aquosa. O Cr(VI) foi extraído da fase orgânica com 10 mL de água desionizada a 70 °C.

3.6.3. Determinação de Cr(VI) no Extrato

Pipetaram-se 4 mL do extrato para balão de 10 mL, 2 mL de solução tampão de biftalato de potássio 0,15 mol/L a pH 5, 3,5 mL de solução de o-dianisidina 0,05 mol/L em acetona, 0,7 mL de H₂O₂ 30% m/m e o volume completado com água. Esperou-se 20 minutos e fez-se a leitura espectrofotométrica, em 450 nm.

3.6.4. Curva de Calibração

Volumes de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µL, em três replicatas, de solução de Cr(VI) a 1 µg/mL, foram adicionados em béqueres de 150 mL e todo o procedimento citado anteriormente envolvendo oxidação do Cr(III), extração e determinação, foi executado para os padrões. O mesmo procedimento, sem a adição de Cr(VI), foi feito para o branco. Dez replicatas para o branco e para o ponto da curva contendo 10 ng/mL de Cr(VI) foram feitas, para estimar os limites de detecção e de quantificação e para avaliar a repetibilidade do método.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método cinético catalítico para determinação de cromo utilizado aqui baseia-se nos trabalhos de DOLMANOVA et al. (1969, 1978). Neste método o cromo (VI) atua como catalisador da reação de oxidação da o-dianisidina, por peróxido de hidrogênio, de maneira que a velocidade desta reação é diretamente proporcional à atividade daquela espécie para determinada faixa de concentração. Assim pode-se determinar microquantidades de Cr(VI).

A o-dianisidina na sua forma reduzida em uma mistura de água e acetona, 30% (m/m) em acetona, é praticamente incolor. Já o produto da oxidação deste reagente apresenta uma banda de absorção da luz visível com um λ_{max} em 450 nm, (Figura 4.1). A medida em que a reação de oxidação se processa, um aumento na intensidade da absorção, medida em 450 nm, é registrada, possibilitando assim o monitoramento da taxa de reação com o tempo, (Figura 4.2). Neste trabalho, entretanto, não foi necessário monitorar a reação com o tempo. Foi suficiente apenas fazer uma leitura da absorvância em um tempo fixo para todas as amostras, o que no nosso caso foi fixado em 20 minutos. Desta maneira, o que realmente interessa é aumentar a diferença entre as absorvâncias das formas oxidadas na reação catalisada e não catalisada, mantendo-se um limite máximo de absorvância para a espécie obtida na reação catalisada dentro do permitido pela relação de Lambert e Beer. A sensibilidade do método é, então, limitada em princípio pela velocidade da reação catalisada, pois quanto maior for esta velocidade, menor será a quantidade de catalisador necessária para produzir um aumento considerável no valor da absorvância num determinado tempo. A cinética das reações são influenciadas, principalmente, pela temperatura,

concentrações dos reagentes e pelos solventes, (PEREZ-BENDITO e SILVA, 1988). Na maioria dos trabalhos que são estudados os efeitos de tais variáveis, isto é feito variando um fator de cada vez e mantendo os outros constantes. Esta metodologia pode fornecer valores para as variáveis que nem sempre produzem as melhores respostas, porque não fornece informações suficientes para prever os efeitos de interação entre as variáveis, (BOX et al., 1978). Desta maneira, resolveu-se estudar, simultaneamente, os efeitos das concentrações dos reagentes, HCl, o-dianisidina e H_2O_2 e dos solventes água, acetona e dimetilformamida (DMF), na reação de oxidação da o-dianisidina por peróxido de hidrogênio, mantendo-se a temperatura constante.

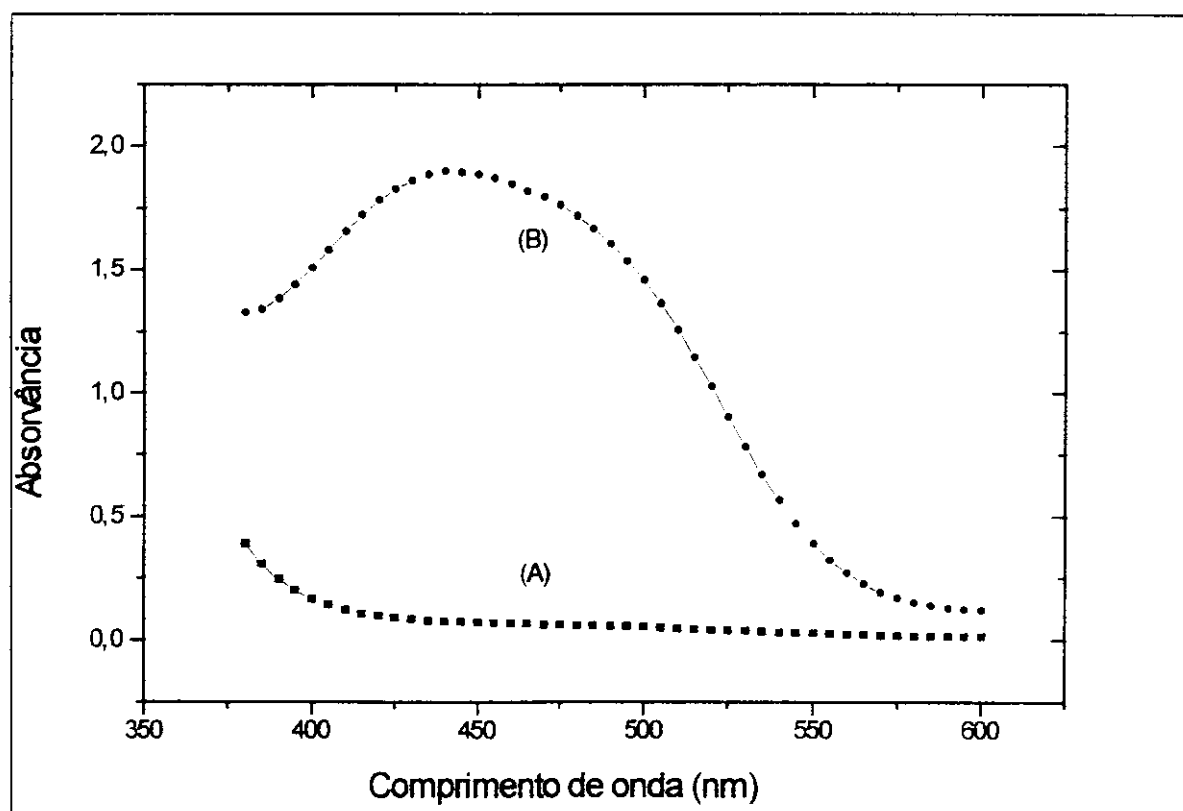


FIGURA 4.1. Espectros de absorção da o-dianisidina a 0,05 mol/L em uma mistura água:acetona, a 70%:30% m/m: (A) na sua forma reduzida, (B) depois da reação de oxidação.

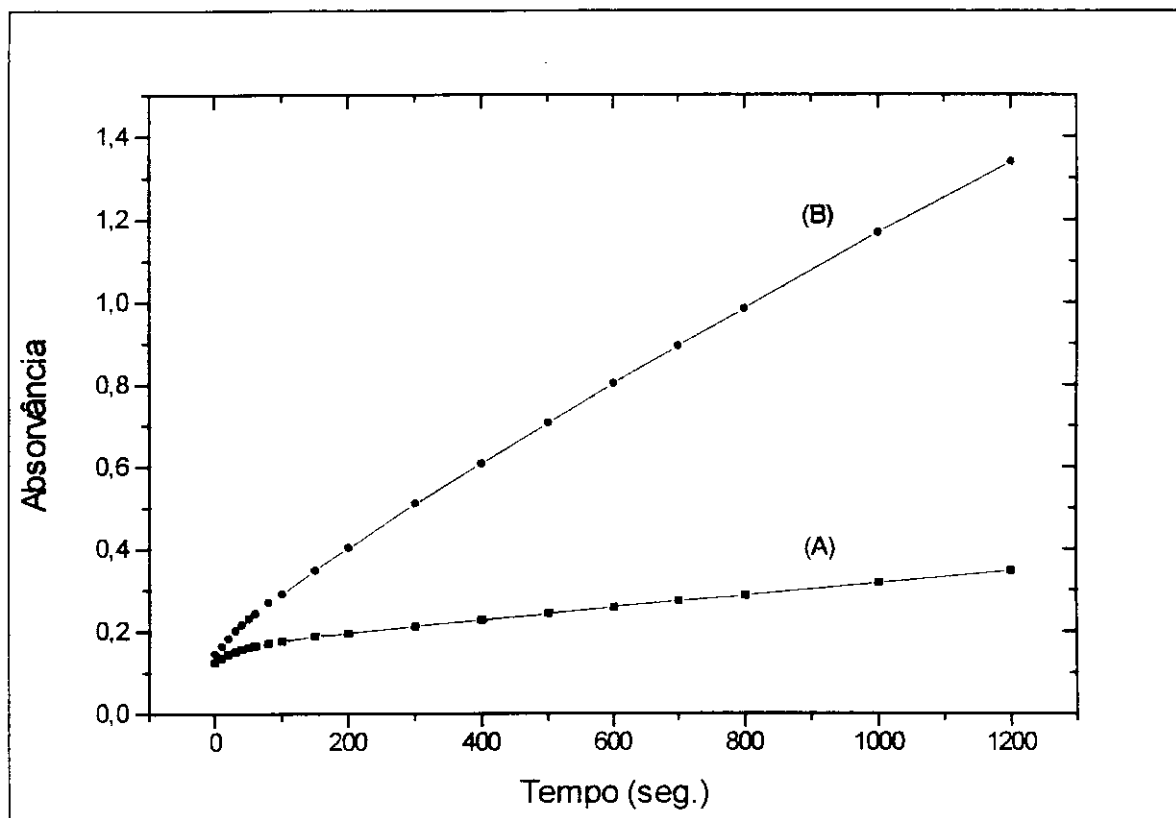


FIGURA 4.2. Gráficos mostrando o aumento da absorvância com o tempo de reação entre a o-dianisidina e o peróxido de hidrogênio: (A) para a reação não catalisada e, (B) para a reação catalisada.

O que normalmente se faz é otimizar a mistura de solventes, para uma determinada resposta, por meio de experimentação com misturas, (CORNELL, 1990a). Depois fixa-se a mistura otimizada e faz-se um planejamento para superfícies de resposta para os reagentes que não fazem parte da mistura, determinando assim suas concentrações que produzem as melhores respostas. Neste caso supõe-se que existe uma independência entre os componentes da mistura e as variáveis formadas pelos reagentes, aqui, HCl, o-dianisidina e H_2O_2 . Se tais variáveis, quando mudados os seus níveis, afetarem as propriedades dos componentes da mistura, elas devem ser incluídas em um planejamento combinando variáveis de misturas e de processo, designado por "Split-Plot", (WOODING, 1973), pois não se conhece até que ponto esta dependência entre os dois tipos de variáveis pode afetar a resposta do sistema.

4.1. Experimentos com Misturas

Na análise dos dados do experimento combinado, algumas questões devem ser respondidas, (CORNELL, 1990a):

- existem combinações de água, acetona e DMF que são mais aceitáveis, em relação à intensidade de absorção da o-dianisidina oxidada, do que misturas binárias destes solventes?
- Como uma mudança na concentração de ácido clorídrico, ou o-dianisidina ou peróxido de hidrogênio afeta tal resposta?
- Existem interações entre as variáveis de processo e os componentes da mistura?

e este tipo de planejamento pode fornecer informações suficientes para respondê-las.

Os resultados, em duplicatas, obtidos de acordo com o planejamento "Split-Plot", estão expostos na Tabela 4.1, onde as linhas representam os ensaios de mistura, "sub-plot", e as colunas os ensaios do fatorial completo 2^3 , "main-plot". Os valores mostrados na Tabela 4.1 são resultantes da diferença entre a absorvância devido ao produto da oxidação da o-dianisidina na reação catalisada por Cr(VI) e por este mesmo produto obtido na reação não catalisada, ou seja, $A(\text{Amostra}) - A(\text{branco})$, que foi chamado de ΔA .

Na obtenção do modelo combinado, primeiramente cada conjunto de respostas referentes ao tratamento experimental para misturas (colunas da Tabela 4.1) foi modelado de acordo com o polinômio abaixo (Equação 4.1), conhecido como modelo de Scheffé para misturas, (SCHEFFÉ, 1958), utilizando o método dos mínimos quadrados.

$$Y(x) = \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad (4.1)$$

TABELA 4.1. Valores das respostas de ΔA , em absorvância, das duplicatas em cada ponto do planejamento "Split-Plot".

Mistura	Ensaio do Planejamento Fatorial Completo 2 ³							
	---	+-	-+-	++-	--+	+-+	-++	+++
1	0,550	0,545	0,828	1,230	0,446	0,699	0,810	1,194
	0,534	0,558	0,732	1,233	0,409	0,654	0,777	1,251
2	0,227	0,096	0,290	0,183	0,184	0,111	0,279	0,203
	0,228	0,071	0,273	0,193	0,154	0,114	0,288	0,219
3	0,000	0,019	0,017	0,052	0,015	0,060	0,054	0,111
	0,000	0,021	0,014	0,049	0,010	0,051	0,046	0,120
4	0,199	0,141	0,446	0,429	0,333	0,205	0,507	0,462
	0,213	0,158	0,416	0,416	0,294	0,186	0,498	0,473
5	0,337	0,272	0,452	0,702	0,274	0,352	0,474	0,831
	0,340	0,254	0,425	0,663	0,272	0,359	0,486	0,832
6	0,030	0,122	0,102	0,193	0,039	0,144	0,115	0,206
	0,059	0,118	0,102	0,211	0,056	0,126	0,077	0,214
7	0,118	0,051	0,191	0,141	0,169	0,122	0,277	0,228
	0,115	0,059	0,170	0,114	0,161	0,100	0,232	0,250
8	0,269	0,153	0,385	0,349	0,249	0,242	0,409	0,524
	0,251	0,186	0,347	0,338	0,233	0,213	0,370	0,523
9	0,350	0,232	0,535	0,662	0,336	0,369	0,548	0,846
	0,328	0,238	0,480	0,574	0,287	0,370	0,492	0,751
10	0,059	0,114	0,191	0,182	0,042	0,178	0,192	0,270
	0,058	0,120	0,177	0,173	0,053	0,159	0,109	0,263

Portanto, oito equações foram obtidas, uma para cada ponto do fatorial. Encontram-se abaixo as equações do modelo de Scheffé, considerando apenas os termos significativos a um nível α de 0,01, com 14 graus de liberdade, onde os números entre parênteses representam os erros em cada coeficiente obtidos da matriz de variâncias e co-variâncias e do erro devido às replicatas.

Os resultados dos ajustes dos modelos são:

$$\text{Ponto (- - -)} \quad Y(x) = 0,526 x_1 + 0,203 x_2 \quad (4.2)$$

($\pm 0,097$) ($\pm 0,028$)

$$\text{Ponto (+ - -)} \quad Y(x) = 0,692 x_1 - 1,119 x_1 x_3 \quad (4.3)$$

($\pm 0,094$) ($\pm 0,217$)

$$\text{Ponto (- + -)} \quad Y(x) = 1,006 x_1 + 0,250 x_2 \quad (4.4)$$

($\pm 0,115$) ($\pm 0,033$)

$$\text{Ponto (+ + -)} \quad Y(x) = 1,607 x_1 + 0,175 x_2 - 2,307 x_1 x_3 \quad (4.5)$$

($\pm 0,137$) ($\pm 0,039$) ($\pm 0,316$)

$$\text{Ponto (- - +)} \quad Y(x) = 0,569 x_1 + 0,162 x_2 \quad (4.6)$$

($\pm 0,070$) ($\pm 0,020$)

$$\text{Ponto (+ - +)} \quad Y(x) = 0,744 x_1 - 1,046 x_1 x_3 \quad (4.7)$$

($\pm 0,113$) ($\pm 0,260$)

$$\text{Ponto (- + +)} \quad Y(x) = 0,985 x_1 + 0,266 x_2 \quad (4.8)$$

($\pm 0,103$) ($\pm 0,030$)

$$\text{Ponto (+ + +)} \quad Y(x) = 1,159 x_1 + 0,195 x_2 + 0,121 x_3 + 1,746 x_1 x_2 - 1,096 x_1 x_3 \quad (4.9)$$

($\pm 0,113$) ($\pm 0,033$) ($\pm 0,033$) ($\pm 0,260$) ($\pm 0,260$)

Escrevendo estas equações sob forma de tabela para posteriores interpretações tem-se a Tabela 4.2 que mostra os coeficientes dos modelos quadráticos de Scheffé para cada ponto do fatorial completo 2^3 .

TABELA 4.2. Coeficientes dos modelos quadráticos obtidos para todos os pontos do fatorial.

Pontos do Fatorial	Coeficientes do Modelo de Scheffé ^(a)					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃
- - -	0,526 (±0,097)	0,203 (±0,028)	—	—	—	—
+ - -	0,692 (±0,094)	—	—	—	-1,119 (±0,217)	—
- + -	1,006 (±0,115)	0,250 (±0,033)	—	—	—	—
+ + -	1,607 (±0,137)	0,175 (±0,039)	—	—	-2,370 (±0,316)	—
- - +	0,569 (±0,070)	0,162 (±0,020)	—	—	—	—
+ - +	0,744 (±0,113)	—	—	—	-1,046 (±0,260)	—
- + +	0,985 (±0,103)	0,266 (±0,030)	—	—	—	—
+ + +	1,159 (±0,113)	0,195 (±0,033)	0,121 (±0,033)	1,746 (±0,260)	-1,096 (±0,260)	—

^(a)significativos a um nível α de 0,01.

Em seguida, de acordo com o modelo (6.21, ver apêndice 2), (CORNELL, 1988), construiu-se a tabela de análise de variância, utilizando os resultados do planejamento completo dados na Tabela 4.1.

Os testes de significância na Tabela 4.3 mostram que existem importantes contribuições dos efeitos das variáveis de mistura (sub-plot), das variáveis de processo (main-plot) assim como da interação entre os dois tipos de variáveis. Desta maneira pode-se concluir que tanto as variações nas proporções entre os componentes da mistura (água, acetona, DMF), as variações nos níveis das variáveis de processo (HCl, o-dianisidina, H₂O₂) e a interação entre os componentes da mistura e as variáveis de processo têm um grau significativo no valor de ΔA nos sistemas estudados e conseqüentemente na velocidade da reação de oxidação da o-dianisidina.

Embora estes resultados indiquem existência de parâmetros significativos, no modelo completo (Equação 4.10), eles não especificam qual ou quais são mais importantes.

TABELA 4.3. Análise de Variância para as respostas em absorvância do delineamento "Split-Plot".

Fonte de var.	G.L.	Soma Quad.	Quad. Médio	F _{calc.}
Replicatas (R)	1	0,0045	0,0045	
Main-Plot (Z)	7	1,7322	0,2474	439*
Erro Main-Plot (RZ)	7	0,0039	0,0006	
Sub-Plot (X)	9	6,9664	0,7740	1980*
Interação (ZX)	63	1,3615	0,0216	55*
Erro Sub-Plot (E)	72	0,0281	0,0004	
Total	159	10,0967		

*significativos a um nível $\alpha = 0,01$

Assim torna-se necessário analisar os coeficientes deste modelo que foi ajustado utilizando o programa de computador SAS para Windows 6.10. Outra maneira de ajustar o modelo, para quem não dispõe do programa SAS, é pela utilização dos modelos de Scheffé¹, (Equações 4.2 a 4.9). A equação 4.10 representa o modelo ajustado aos dados experimentais mostrando apenas os termos significativos a um nível α de 0,01.

$$\begin{aligned}
 Y(x_1, x_2, x_3, z_1, z_2, z_3) = & \underset{(\pm 0,038)}{0,911}x_1 + \underset{(\pm 0,011)}{0,176}x_2 + \underset{(\pm 0,011)}{0,051}x_3 + \underset{(+0,088)}{0,466}x_1x_2 - \underset{(\pm 0,088)}{0,895}x_1x_3 \\
 & + \underset{(\pm 0,038)}{0,139}z_1x_1 - \underset{(\pm 0,011)}{0,044}z_1x_2 + \underset{(\pm 0,011)}{0,032}z_1x_3 + \underset{(\pm 0,088)}{0,266}z_1x_1x_2 - \underset{(\pm 0,088)}{0,513}z_1x_1x_3 + \underset{(\pm 0,048)}{0,188}z_1x_2x_3 \\
 & + \underset{(\pm 0,038)}{0,278}z_2x_1 + \underset{(\pm 0,011)}{0,045}z_2x_2 - \underset{(\pm 0,088)}{0,242}z_2x_1x_3 + \underset{(\pm 0,088)}{0,233}z_3x_1x_3 + \underset{(\pm 0,024)}{0,248}z_1z_3x_1x_2 \quad (4.10)
 \end{aligned}$$

¹ O procedimento para a obtenção do modelo combinado e da tabela ANOVA pode ser encontrado nos Apêndices 2 e 3.

A Tabela 4.4 mostra a Equação 4.10 em uma disposição que possibilita melhores interpretações.

Os parâmetros não nulos e relativamente mais altos, em valor absoluto, ajudam a descrever melhor os efeitos presentes entre as variáveis nos vários pontos do planejamento. Estes efeitos foram analisados por meio da Tabela 4.4.

Na linha de x_1 , observa-se que o efeito médio para o pseudocomponente (1), conforme seu valor positivo (0,911) indica que quanto maior a proporção de água, maior o valor de ΔA . Este ponto das misturas sofre influência positiva das variáveis de processo z_1 ou z_2 , ou seja, um aumento na concentração de ácido clorídrico ou de o-dianisidina causa um aumento no valor da absorvância dentro dos limites estabelecidos pelo planejamento. Observa-se também que uma variação na concentração de o-dianisidina deve afetar mais a resposta do que esta mesma variação na concentração de ácido clorídrico. A variação nos níveis de z_3 , ou seja, a mudança na concentração de H_2O_2 , não exerce influência significativa sobre as propriedades da mistura que proporcionam um aumento no valor de ΔA , assim como as interações z_1xz_2 , z_1xz_3 e z_2xz_3 .

Na linha de x_2 , o valor de (0,176) indica que há um aumento na resposta, em média, pelo aumento da proporção de acetona, quando comparado com a DMF (linha de x_3) que tem pouca influência na resposta com o valor de (0,051). Com o aumento na proporção de acetona, o HCl passa a exercer influência negativa na resposta e o efeito positivo da o-dianisidina diminui consideravelmente, como pode ser observado pelos valores dos coeficientes de z_1 e z_2 .

Quando os pseudocomponentes da mistura atuam juntos, ou seja, quando há interação entre tais variáveis (linha de x_1x_2 a x_2x_3 da Tabela 4.4), observa-se que para x_1x_2 temos uma contribuição positiva no valor médio da absorvância quando misturas binárias em partes iguais dos pseudocomponentes (1) e (2) estão atuando. Entretanto, se observarmos os resultados na Tabela 4.1, veremos que a média das respostas tomadas nos pontos (1) e (2) para mistura, (valor de 0,486), é praticamente a mesma tomada no ponto (5), (valor de 0,458), que

corresponde ao pseudocomponente x_1x_2 . Desta maneira pode-se concluir que está havendo um efeito aditivo e não sinérgico entre as variáveis x_1 e x_2 . Em outras palavras podemos dizer que o valor médio do coeficiente de 0,466 (Tabela 4.4) representa as contribuições dos dois componentes, água e acetona, quando estes entram com proporções de 45% e 55% em massa respectivamente, (ver Tabela 3.1).

TABELA 4.4. Coeficientes do modelo combinado e seus respectivos erros^(a).

	Média	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₁ Z ₂	Z ₁ Z ₃	Z ₂ Z ₃
X ₁	0,911 (±0,038)	0,139 (±0,038)	0,278 (±0,038)	—	—	—	—
X ₂	0,176 (±0,011)	-0,044 (±0,011)	0,045 (±0,011)	—	—	—	—
X ₃	0,051 (±0,011)	0,032 (±0,011)	—	—	—	—	—
X ₁ X ₂	0,466 (±0,088)	0,266 (±0,088)	—	—	—	0,248 (±0,024)	—
X ₁ X ₃	-0,895 (±0,088)	-0,513 (±0,088)	-0,242 (±0,088)	0,233 (±0,088)	—	—	—
X ₂ X ₃	—	0,188 (±0,048)	—	—	—	—	—

^(a) Significativos a um nível α de 0,01.

É importante ressaltar que ao comparar coeficientes em modelos de mistura, deve-se levar em consideração as ordens dos termos aos quais eles estão associados, pois valores elevados dos coeficientes dos termos quadráticos e cúbicos não implicam necessariamente em grandes efeitos quando comparados com os coeficientes dos termos lineares. Um coeficiente quadrático poderia ter quatro vezes o valor do coeficiente linear e ainda assim estaria descrevendo o mesmo efeito (SNEE, 1979). Então ao comparar o efeito médio de x_1x_2 , com o efeito médio de x_1 observa-se que x_1 contribui muito mais no valor da resposta.

Considerando-se apenas variáveis de processo verifica-se que o HCl, representado pela variável z_1 , e a interação entre z_1 e z_3 , HCl e H_2O_2 , influenciam positivamente a resposta média na mistura x_1x_2 , ou seja um aumento na concentração de HCl e, ou H_2O_2 produzem um aumento na velocidade da reação catalisada para a mistura x_1x_2 . A o-dianisidina não tem efeito sobre o aumento de ΔA neste ponto das misturas.

Na linha de x_1x_3 verifica-se que existe antagonismo entre a água e DMF, ou seja, menores valores de ΔA são obtidos quando a reação ocorre em uma mistura contendo 45% de água e 55% de DMF, (Tabela 3.1). Este efeito antagônico pode ser confirmado na Tabela 4.1, visto que o valor médio no ponto (7) para as misturas, de 0,156, é menor que a média das respostas tomadas nos pontos (3) e (4), que é de 0,191. Verifica-se também que a variável z_1 (HCl) contribui para diminuir o valor de ΔA , devido ao valor negativo de -0,513 assim como a o-dianisidina, conforme o valor do coeficiente de -0,242. Apenas neste ponto uma mudança no nível de z_3 (H_2O_2) exerce influência sobre a resposta.

E finalmente, a linha de x_2x_3 , que só tem um termo significativo, representa a influência positiva no valor da resposta no ponto 6 do delineamento para misturas. Este termo fornece o efeito da variável de processo z_1 (HCl) sobre a mistura dos pseudocomponentes que representam acetona e DMF, de maneira que quando a concentração de HCl é aumentada, há um aumento no valor de ΔA naquele ponto do delineamento com misturas.

De acordo com os resultados pode-se concluir que os efeitos dos solventes água e acetona, quando utilizados como meio reacional para a oxidação da o-dianisidina por peróxido de hidrogênio, são de aumentar a velocidade desta reação quando entram nas proporções dos pseudocomponentes x_1 ou x_2 . Quando misturadas, ou seja, quando utilizadas nas proporções do pseudocomponente x_1x_2 , verifica-se não haver nem sinergismo nem antagonismo e sim um efeito aditivo. Observa-se também uma tendência no aumento de ΔA quando aumentam-se as concentrações de o-dianisidina e ácido clorídrico em um meio reacional formado por 70% m/m de água e 30% m/m de acetona.

Após a análise do modelo combinado (Equação 4.10) passou-se a analisar as misturas separadamente para cada ponto do fatorial (modelos de Scheffé).

Observa-se por meio das Equações 4.2 a 4.9 que as misturas contendo maior proporção em água são responsáveis, quase que exclusivamente, pelo aumento do valor da resposta em todos os pontos do planejamento fatorial.

Embora exista interações entre as variáveis de processo e as de mistura, nota-se que o valor máximo de ΔA ocorreu no ponto (1) do planejamento para mistura em todos os níveis das variáveis de processo, conforme pode ser verificado na Figura 4.3. Este resultado sugere que misturas binárias contendo 70% m/m de água e 30% m/m de acetona dão melhores resultados quando utilizadas como meio reacional para a oxidação da o-dianisidina pelo peróxido de hidrogênio, o que vem concordar com o resultado do modelo combinado.

4.2. Estudo dos Efeitos das Variáveis de Processo

No item anterior, encontrou-se que a mistura água:acetona na proporção 70%:30% (m/m) constitui um meio no qual foi obtida maior velocidade da reação estudada, velocidade esta refletida no valor de ΔA . Foi feito então um estudo dos efeitos de HCl, o-dianisidina e H_2O_2 sobre a resposta, apenas para o ponto do planejamento "Split-Plot" correspondente a (70%, 30%, 0%) da mistura. Este ponto do planejamento completo foi transferido para a Tabela 4.5 para melhor entendimento dos efeitos.

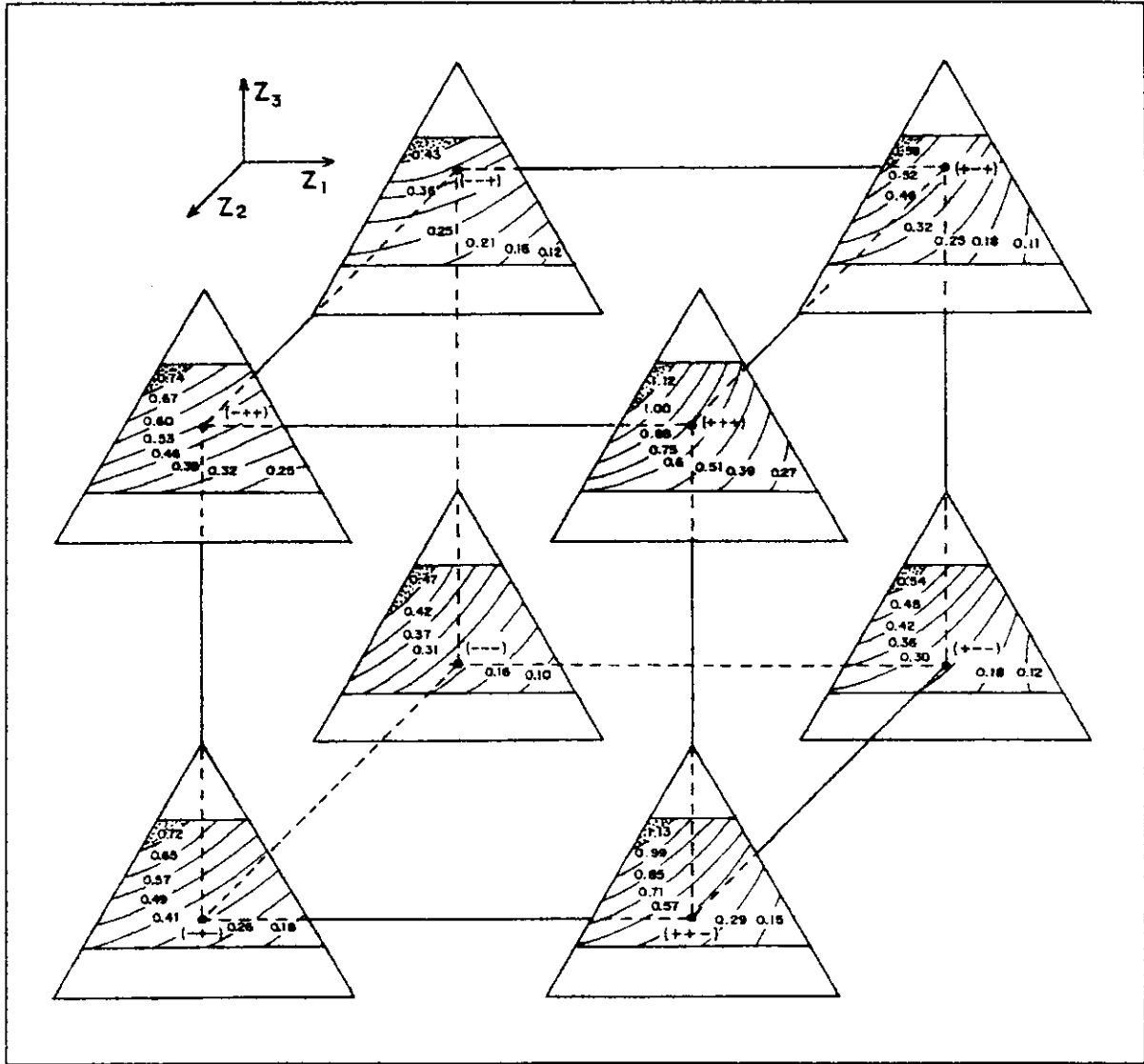


FIGURA 4.3. Superfícies de resposta para o modelo quadrático de misturas em cada ponto do fatorial. Nas regiões hachuradas estão todas as misturas que produzem maiores respostas

TABELA 4.5. Respostas para os ensaios do fatorial no ponto (1) do planejamento com misturas^(a).

Ensaio	Variáveis Codificadas			Respostas (Abs.)		
	Z ₁ (HCl)	Z ₂ (o-dian.)	Z ₃ (H ₂ O ₂)	y ₁	y ₂	média
1	-1	-1	-1	0,550	0,534	0,542
2	+1	-1	-1	0,545	0,558	0,552
3	-1	+1	-1	0,828	0,732	0,780
4	+1	+1	-1	1,230	1,233	1,232
5	-1	-1	+1	0,446	0,409	0,428
6	+1	-1	+1	0,699	0,654	0,677
7	-1	+1	+1	0,810	0,777	0,794
8	+1	+1	+1	1,194	1,251	1,223

^(a) Tabela obtida do ensaio (1) da Tabela 4.1.

Por meio da tabela de análise de variância (Tabela 4.6), obtida do planejamento fatorial (Tabela 4.5), podemos verificar que as variáveis z_1 e z_2 assim como as interações z_1z_2 , z_1z_3 e $z_1z_2z_3$ têm influência significativa na resposta. Isto significa que o HCl, a o-dianisidina e as interações entre HCl e o-dianisidina, HCl e H₂O₂ e a interação entre as três variáveis influenciam no valor de ΔA , quando o conjunto das variáveis de processo é estudado separadamente.

Conforme pode-se observar na Figura 4.4b, a o-dianisidina (z_2) isoladamente contribui para um grande aumento na resposta. A mesma contribuição positiva pode ser observada para o HCl (z_1), porém com menor intensidade quando comparado com a o-dianisidina, Figura 4.4a.

Para o efeito de interação entre o HCl e o-dianisidina, o aumento na resposta é maior quando a o-dianisidina está no nível alto, Figura 4.5a. Através da Figura 4.5b podemos observar que para a interação HCl e H₂O₂ (z_3) também há maior aumento na intensidade da absorvância quando o nível de H₂O₂ é maior, no entanto este efeito é muito pequeno quando comparado com o efeito de interação entre o HCl e o-dianisidina.

TABELA 4.6. Tabela de Análise de Variância da resposta ΔA , mostrando também os valores dos efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 mostrado na Tabela 4.5.

Fonte	Efeito	G.L	Soma Quad.	Quad. Médio	F
Z_1	0,285	1	0,324	0,324	298,54
Z_2	0,458	1	0,837	0,837	770,66
Z_3	0,004*	1	0,000	0,000	0,05
Z_1Z_2	0,156	1	0,097	0,097	89,03
Z_1Z_3	0,054	1	0,012	0,012	10,84
Z_2Z_3	-0,002*	1	0,000	0,000	0,01
$Z_1Z_2Z_3$	-0,066	1	0,017	0,017	15,80
Desvio		8	0,009	0,001	
Total		15	1,196		

*Não significativos a um nível α de 0,01

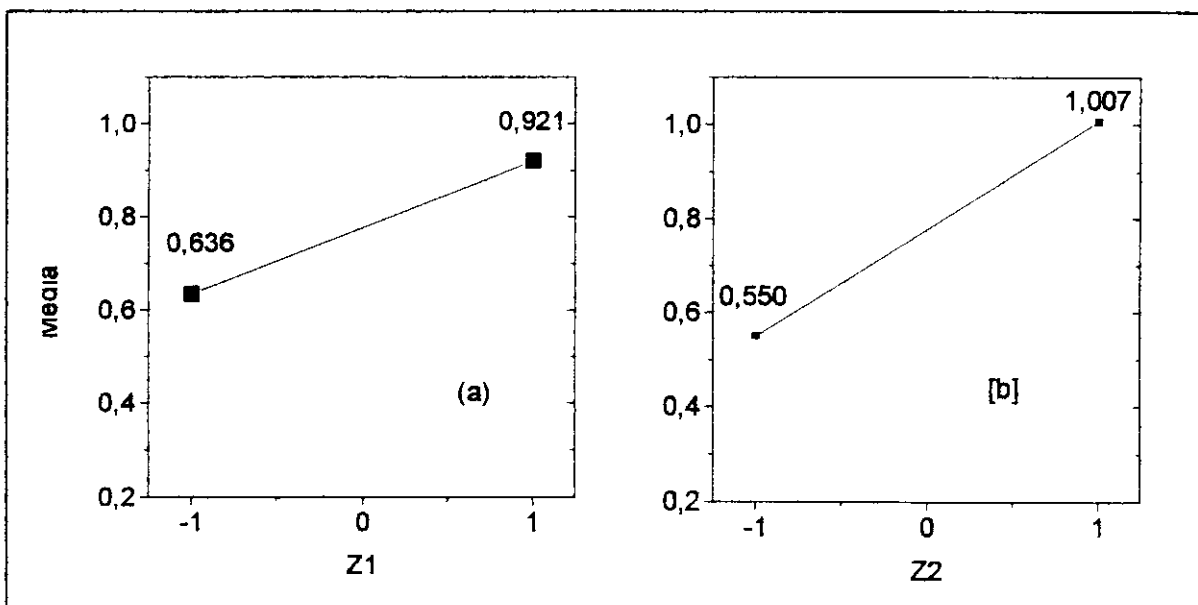


FIGURA 4.4. Ilustração dos efeitos principais das variáveis Z_1 , (a) e Z_2 , (b).

A interação entre as três variáveis contribui para uma queda no valor da resposta, porém é um efeito pequeno quando comparado com os efeitos principais, Figura 4.6.

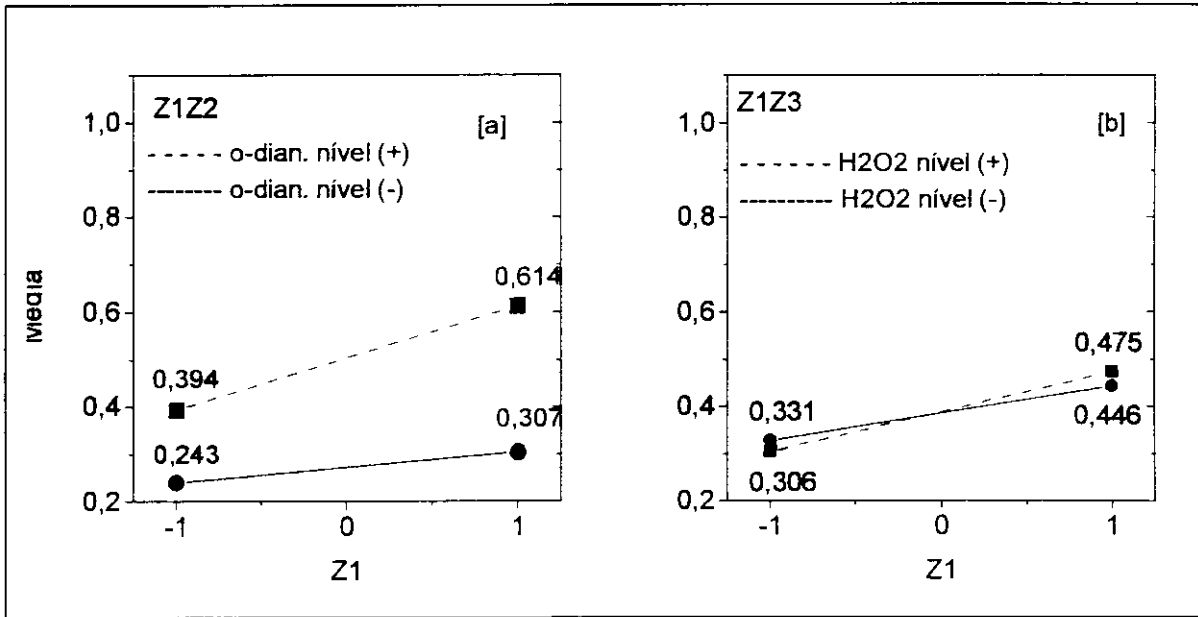


FIGURA 4.5. Gráficos dos efeitos de interação entre as variáveis z_1z_2 , (a) e z_1z_3 , (b).

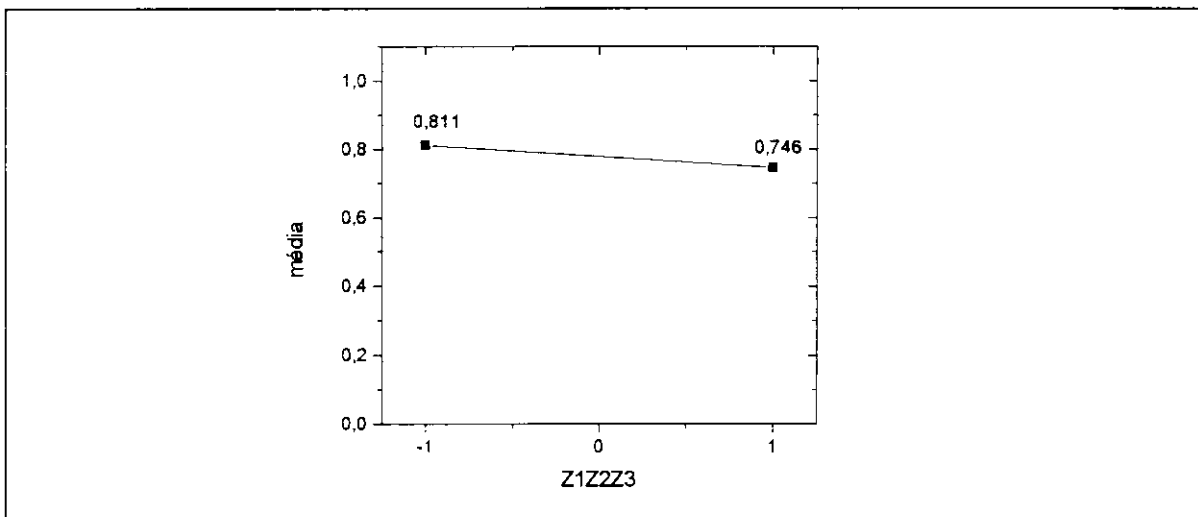


FIGURA 4.6. Gráfico do efeito de interação de terceira ordem entre z_1 , z_2 e z_3 .

Através dos resultados mostrados até aqui poderia-se dizer que as condições ótimas são: 70% (m/m) de água, 30% (m/m) de acetona e níveis altos de HCl, o-dianisidina e H₂O₂ que correspondem a 5 x 10⁻⁴ mol/L de HCL, 3 x 10⁻³ mol/L de o-dianisidina e 0,58 mol/L H₂O₂. Serão estas condições seguramente as melhores? De acordo com os experimentos com misturas pode-se assegurar que 70% (m/m) de água e 30% (m/m) de acetona produzem os melhores resultados, visto que estas condições não variam para todos os níveis estudados das variáveis de processo. O mesmo não pode ser afirmado a respeito das variáveis de processo, pois os resultados da Tabela 4.6 mostram que melhores respostas podem ser obtidas se os níveis de HCl e o-dianisidina forem aumentados. Então foi realizada uma exploração das variáveis HCl, o-dianisidina e H₂O₂ por meio de superfícies de resposta.

4.3. Análise de Superfícies de Resposta

O planejamento experimental para superfícies de resposta, (Tabela 4.7), foi obtido fazendo-se o "caminho de inclinação máxima", (BARROS NETO et al., 1995), para modelo linear ajustado aos dados da Tabela 4.5. O resultado, em Δ Abs., para cada ponto do planejamento é também mostrado na Tabela 4.7.

Tal planejamento permite ajustar o modelo polinomial quadrático. A equação deste modelo, mostrando apenas os coeficientes significativos a um nível α de 0,01, utilizando o teste T de Student, é a seguinte:

$$Y(z_1, z_2, z_3) = 0,858 + 0,095z_2 - 0,015(z_1)^2 - 0,012(z_2)^2 - 0,022(z_3)^2 - 0,018z_1z_2 - 0,022z_1z_3 - 0,011z_2z_3 \quad (4.11)$$

($\pm 0,002$) ($\pm 0,001$) ($\pm 0,001$) ($\pm 0,001$) ($\pm 0,001$) ($\pm 0,002$) ($\pm 0,002$) ($\pm 0,002$) ($\pm 0,002$)

O ponto de máximo para esta função, ou seja, os valores de z_1 , z_2 e z_3 que produzem maior resposta é: $z_1 = -4,8$; $z_2 = 7,3$ e $z_3 = 0,6$. Este ponto cai fora dos limites experimentais estudados para z_1 e z_2 e além disso $z_1 = -4,8$ corresponde a um valor negativo para concentração de HCl e $z_2 = 7,3$ resultaria em uma

concentração de o-dianisidina para a qual o reagente não é totalmente solúvel. Este problema foi resolvido fixando-se o nível da variável z_2 (o-dianisidina) no seu valor máximo estudado, $\sqrt[4]{2^3}$, que corresponde a uma concentração de $1,9 \times 10^{-2}$ mol/L. Depois, pela substituição do valor de z_2 na Equação 4.11 encontrou-se o ponto de máximo para as variáveis z_1 e z_3 . O resultado é mostrado na Figura 4.7.

TABELA 4.7. Delineamento para superfícies de resposta e resultados de ΔA em absorvância.

Ensaio	Variáveis Originais			Var. Codificadas			Resp.
	HCl	o-dian.	H ₂ O ₂	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Δ Abs.
1	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-2}$	0,58	-1	-1	-1	0,691
2	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$	0,58	1	-1	-1	0,731
3	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-2}$	0,58	-1	1	-1	0,900
4	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-2}$	0,58	1	1	-1	0,921
5	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-2}$	0,97	-1	-1	1	0,712
6	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$	0,97	1	-1	1	0,716
7	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-2}$	0,97	-1	1	1	0,931
8	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-2}$	0,97	1	1	1	0,811
9	$4,6 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78	$-\sqrt[4]{2^3}$	0	0	0,805
10	$1,14 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78	$\sqrt[4]{2^3}$	0	0	0,943
11	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-2}$	0,78	0	$-\sqrt[4]{2^3}$	0	0,660
12	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-2}$	0,78	0	$\sqrt[4]{2^3}$	0	1,004
13	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,45	0	0	$-\sqrt[4]{2^3}$	0,789
14	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	1,11	0	0	$\sqrt[4]{2^3}$	0,821
15	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78	0	0	0	0,856
16	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78	0	0	0	0,855
17	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78	0	0	0	0,853
18	$8,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,78	0	0	0	0,863

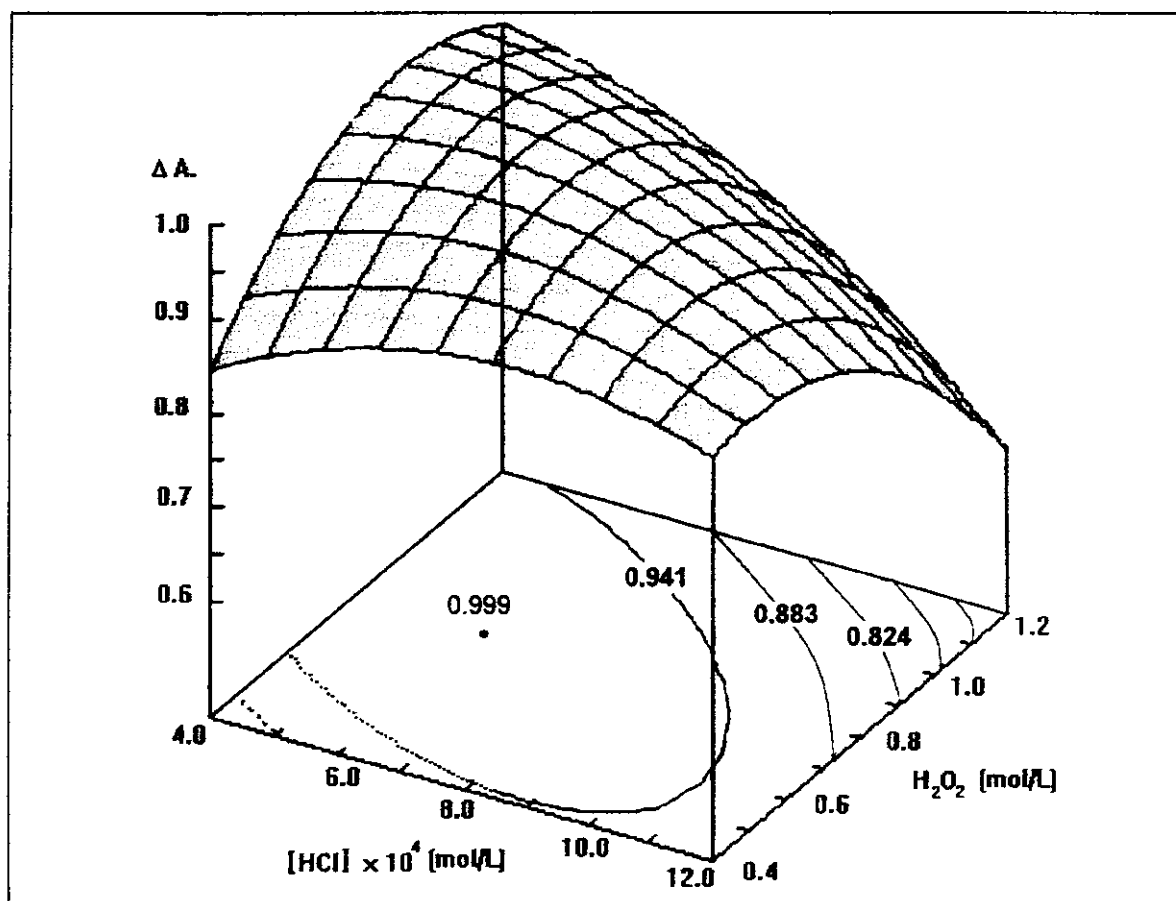


FIGURA 4.7. Superfície de respostas para as variáveis Z1 (HCl) e Z3 (H₂O₂), utilizando a Equação 4.11 com $Z2 = \sqrt[4]{2^3}$, mostrando o ponto de máxima absorvância.

De acordo com os resultados de mistura e superfícies de resposta pode-se chegar à conclusão de que as condições otimizadas para a determinação de cromo são as seguintes:

- Água = 70% m/m, Acetona = 30% m/m,
- HCl = $6,0 \times 10^{-4}$ mol/L, o-dianisidina = $1,9 \times 10^{-2}$ mol/L e H_2O_2 = 0,79 mol/L

Utilizando as condições otimizadas foi obtida a curva de calibração mostrada na Figura 4.8 que obedece a equação $A = 0,035 + 0,030C_{Cr}(\text{ng/mL})$ com $R^2 = 0,9996$. Nestas condições a faixa de linearidade se estende de 0,5 até 30 ng/mL.

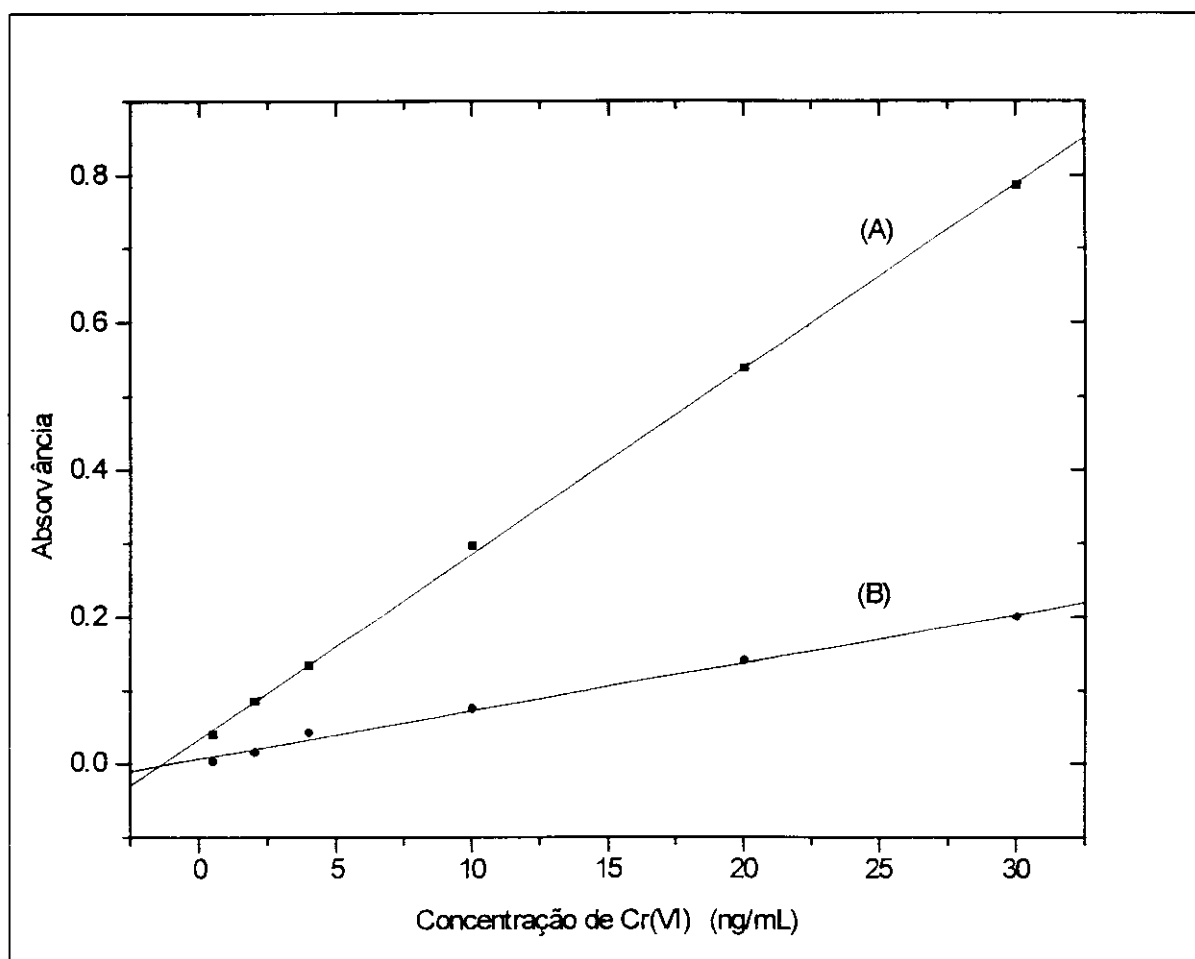


FIGURA 4.8. Curvas de calibração: [a], feita nas condições otimizadas, [b] feita nas condições encontradas na literatura, (DOLMANOVA et al., 1969).

4.4. Avaliação da Seletividade

De acordo com a IUPAC, (DEN BOEF e HULANICKI, 1983), seletividade é uma característica qualitativa que indica o grau ou extensão em que outras substâncias interferem na determinação de uma espécie por um dado procedimento. Um interferente é usualmente definido como um agente químico que causa um erro sistemático na determinação da espécie desejada e a magnitude da interferência poderia ser estabelecida em termos do desvio padrão.

Os métodos catalíticos são caracterizados por seus limites de detecção extremamente baixos, entretanto apresentam como desvantagem sua baixa seletividade, pois, a maioria das reações indicadoras são catalisadas por muitas espécies químicas, (MÜLLER, 1982).

A oxidação da o-dianisidina por peróxido de hidrogênio em meio fracamente ácido, além de ser catalisada por Cr(VI) é também catalisada por Cr(III), Cu(II), Fe(III), Co(II), Mo(VI), V(V) e Ni(II) segundo KNEEBONE e FREISER, (1975), Algumas espécies como H_2PO_4^- , Mg(II), EDTA e Zn(II) diminuem a velocidade da reação catalisada.

No estudo unifatorial de interferentes, o estabelecimento da faixa de concentração dos interferentes baseou-se no fato de algumas espécies estudadas apresentarem efeito de interferência positivo em baixas concentrações e negativo para concentrações mais altas, fenômeno relatado por MÜLLER, (1982), e que foi verificado neste trabalho com os cátions Co(II) e Zn(II), como será mostrado a seguir.

4.4.1. Estudo Unifatorial dos interferentes

A metodologia através da qual apenas um interferente é estudado de cada vez é a mais utilizada pelos pesquisadores, entretanto, estes estudos não permitem a verificação de efeitos de interação entre os interferentes que ocorreriam em amostras reais, (LEGRET e DIVET, 1988). Mas este fato não diminui a importância deste tipo de estudo, pois, através dele obtém-se a relação

entre o grau da interferência e a concentração da espécie interferente, que permite estabelecer os níveis de concentração daquela espécie em um posterior estudo multifatorial.

Para uma caracterização quantitativa da seletividade do método, os graus de interferência foram expressos por um número denominado Fator de Interferência, (de ANDRADE et al., 1985), definido como a razão entre o valor de ΔA devido à reação catalisada por Cr(VI) na presença do interferente e o valor de ΔA devido à mesma reação catalisada por Cr(VI) mas, na ausência do interferente. Este valor é portanto adimensional e demonstra a ausência de interferência se for igual à unidade. Se maior ou menor do que a unidade, ocorrem interferência positiva ou negativa, respectivamente.

Os íons Cr(III) e Cu(II) (Tabela 4.8) são sérios interferentes no método, pois numa relação de apenas 2:1 com o Cr(VI) eles já causam um aumento no sinal de mais de 15%. Neste caso, observa-se que o grau de interferência é proporcional à concentração de ambos, Cr(III) e Cu(II). O tipo de interferência causada por esses íons está relacionado com o poder de também catalisar a reação indicadora de acordo com acréscimo no sinal, quando Cr(VI) não está presente, produzido por 40 ng/mL de Cr(III) ou Cu(II). O resultado está de acordo com DOLMANOVA et al., (1972), que utiliza a mesma reação indicadora para determinar Cr(III) e segundo KNEEBONE e FREISER, (1975), a interferência do Cu(II) é atribuída à sua ação catalítica sobre a decomposição do peróxido de hidrogênio. O efeito no sinal, causado pela mistura, Cr(VI) e Cr(III), não é aditivo pois, a soma dos ΔA produzidos pelas espécies separadas é maior do que o ΔA da mistura. Neste caso está ocorrendo um decréscimo relativo no sinal da mistura.

O Fe(III) e o Mo(VI) (Tabela 4.9), interferem no método, para uma concentração de Cr(VI) a 10 ng/mL, a partir das concentrações de 150 ng/mL e 1000 ng/mL, respectivamente, e o fator de interferência aumenta em geral com o aumento da concentração dentro dos limites estudados.

TABELA 4.8. Interferência produzida por Cr(III) e por Cu(II) na determinação de Cr(VI).

Cr(VI):interfer.*	ΔA [Cr(III)]	Fator	ΔA [Cu(II)]	Fator
1 : 0	0,210	—	0,210	—
1 : 1	0,217	1,03	0,218	1,04
1 : 2	0,251	1,20	0,244	1,16
1 : 4	0,259	1,23	0,300	1,43
1 : 6	0,276	1,31	0,353	1,68
1 : 8	—	—	0,395	1,88
1 : 10	0,287	1,37	—	—
0 : 40 ng/mL	0,160	—	0,076	—

* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

O Fe(III) quando estudado separadamente, na concentração de 300 ng/mL, catalisou a reação causando um aumento de 0,047 no valor de ΔA . Este valor quando comparado com o ΔA produzido pela mistura Cr(VI):Fe(III) (Fe(III) na mesma concentração de 300 ng/mL) mostrou um efeito de interferência aditivo. O mesmo fenômeno pode ser observado para o Mo(VI) na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$. A interferência do Mo(VI) já era esperada, visto que este elemento pertence ao mesmo grupo do cromo, (grupo VIB da tabela periódica).

O Co(II) e Zn(II) (Tabela 4.10), apresentam características similares no grau de interferência em relação à concentração. Ambos causam um acréscimo na velocidade da reação para concentrações mais baixas, ($\approx 2 \mu\text{g/mL}$), mas a velocidade da reação cai para valores de concentração mais altos destes íons, ($\approx 15 \mu\text{g/mL}$). Quando o íon Zn(II) atua sozinho na reação, sem a presença do Cr(VI), observa-se que na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ seu efeito na velocidade da reação não catalisada é nulo mas torna-se negativo para uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. O Co(II) quando atua isoladamente na reação não catalisada a uma concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, produz um pequeno acréscimo na velocidade da reação, ($\Delta A = 0,011$), mas é menor do que o acréscimo causado quando este atua na reação catalisada, ($\Delta A = 0,042$), o que constata a não aditividade da interferência.

O Mg(II) e o H_2PO_4^- (Tabela 4.11), também apresentam comportamentos similares pois, ambos causam em geral, um decréscimo na velocidade da reação catalisada a medida que as suas concentrações são aumentadas. Quando estes íons atuam na reação não catalisada, produzem quedas nas velocidades das reações equivalentes àquelas observadas quando eles estão atuando nas reações catalisadas. Neste caso pode-se dizer que estas espécies interferentes atuam como inibidoras da reação indicadora, não apresentando inibição da ação catalítica do Cr(VI).

TABELA 4.9. Interferência produzida por Fe(III) e por Mo(VI) na determinação de Cr(VI).

Cr(VI):interfer.*	ΔA [Fe(III)]	Fator Fe(III)	ΔA [Mo(VI)]	Fator Mo(VI)
1 : 0	0,210	—	0,210	—
1 : 10	0,220	—	1,05	—
1 : 15	0,247	1,18	—	—
1 : 20	0,258	1,23	—	—
1 : 25	—	—	0,207	0,99
1 : 30	0,266	1,27	—	—
1 : 50	0,254	1,21	0,215	1,02
1 : 100	0,283	1,35	0,230	1,10
1 : 200	0,295	1,40	0,249	1,19
1 : 300	0,305	1,45	—	—
1 : 400	0,378	1,80	0,274	1,30
1 : 500	0,410	1,95	—	—
1 : 600	—	—	0,312	1,49
1 : 1000	—	—	0,352	1,68
0 : 300 ng/mL	0,047	—	—	—
0 : 4 $\mu\text{g/mL}$	—	—	0,069	—

* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

TABELA 4.10. Interferência produzida pelos íons Co(II) e Zn(II) na determinação de Cr(VI).

Cr(VI):interfer.*	ΔA [Co(II)]	Fator de Interf.	ΔA [Zn(II)]	Fator de Interf.
1 : 0	0,210	—	0,210	—
1 : 100	0,233	1,11	0,251	1,20
1 : 200	0,252	1,20	0,251	1,20
1 : 400	0,255	1,21	0,251	1,20
1 : 600	0,251	1,20	0,238	1,13
1 : 1000	0,206	0,98	0,211	1,00
1 : 1500	0,197	0,94	0,190	0,90
1 : 2000	—	—	0,162	0,77
0 : 2 $\mu\text{g/mL}$	0,011	—	-0,005	—
0 : 20 $\mu\text{g/mL}$	—	—	-0,050	—

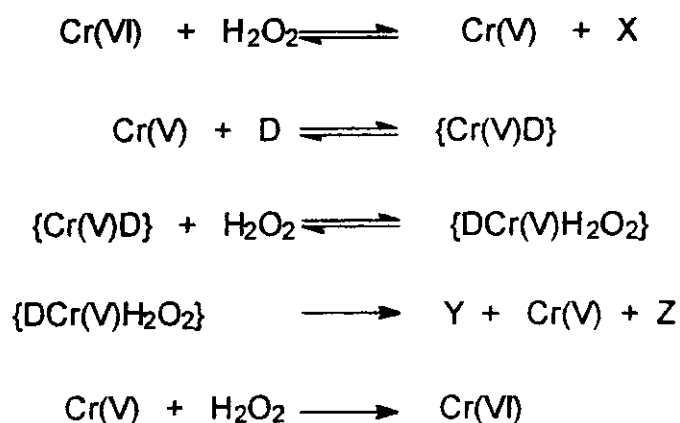
* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

TABELA 4.11. Interferência produzida pelos íons Mg(II) e H_2PO_4^- na determinação de Cr(VI)

Cr(VI):interfer.	ΔA [Mg(II)]	Fator de Interf.	ΔA (H_2PO_4^-)	Fator de Interf.
1 : 0	0,210	—	0,210	—
1 : 50	—	—	0,211	1,00
1 : 100	0,194	0,92	0,205	0,98
1 : 200	0,192	0,91	0,201	0,96
1 : 400	0,194	0,92	0,199	0,95
1 : 600	0,187	0,89	0,191	0,91
1 : 1000	0,148	0,70	0,183	0,87
1 : 1500	0,126	0,60	—	—
1 : 2000	0,108	0,51	—	—
0 : 6 $\mu\text{g/mL}$	-0,019	—	-0,021	—

* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

O EDTA (Tabela 4.12), atua no sistema diminuindo a velocidade da reação catalisada causando séria interferência no método. Ao contrário do que ocorre com o Mg(II) e o H_2PO_4^- , o EDTA atua na reação inibindo a ação do catalisador. Foi comprovado que quando o EDTA atua na reação não catalisada, o seu efeito de inibição da velocidade da reação é desprezível em relação ao efeito produzido na reação catalisada, ambos na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. De maneira que a reação não catalisada praticamente não é afetada pelo EDTA. Esta interferência pode ser atribuída à complexação do Cr(V) pelo EDTA porque, segundo DOLMANOVA e SHEKOVTSOVA, (1977), o Cr(V) entra na reação da seguinte maneira:



D = o-dianisidina

X, Y, Z = produtos da reação

Os cátions (NH_4^+ e K^+ , Tabela 4.13; Na^+ , Tabela 4.14) têm comportamentos similares quanto à influência no sinal. As três espécies causam um pequeno acréscimo no valor de ΔA quando estão atuando com concentrações iguais a 100 ng/mL que não pode ser considerado como interferência.

O estudo para os íons Na^+ para a faixa de concentrações mais altas (Tabela 4.15), mostra que quando utilizam-se soluções de NaCl até 0,5 mol/L não observa-se grandes variações no valor de ΔA . Isto sugere que a força iônica produzida pela dissociação deste sal não tem muita influência na velocidade da reação catalisada.

TABELA 4.12. Interferência produzida por EDTA na determinação de Cr(VI).

Cr(VI) : interferente*	ΔA (EDTA)	Fator de interferência
1 : 0	0,210	—
1 : 1	0,198	0,94
1 : 2	0,196	0,93
1 : 4	0,195	0,93
1 : 6	0,195	0,93
1 : 10	0,187	0,89
1 : 20	0,183	0,87
1 : 40	0,169	0,80
1 : 100	0,160	0,76
0 : 1 $\mu\text{g/mL}$	0,005	—

* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

TABELA 4.13. Interferência produzida pelos íons NH_4^+ e K^+ na determinação de Cr(VI).

Cr(VI):interfer.*	ΔA (NH_4^+)	Fator de Interf.	ΔA (K^+)	Fator de Interf.
1 : 0	0,210	—	0,210	—
1 : 100	0,224	1,07	0,221	1,05
1 : 200	0,223	1,06	0,210	1,00
1 : 400	0,208	0,99	0,202	0,96
1 : 600	0,207	0,99	0,204	0,97
1 : 1000	0,196	0,93	0,193	0,92
1 : 1500	0,200	0,95	0,189	0,90
1 : 2000	0,198	0,94	0,191	0,91
1 : 3000	0,195	0,93	0,200	0,95
1 : 6000	0,195	0,92	0,196	0,93
1 : 10000	0,196	0,93	0,197	0,94
1 : 20000	0,198	0,94	0,196	0,93

* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

TABELA 4.14. Interferência produzida pelos íons Na^+ na determinação de Cr(VI) .

Cr(VI) : interferente*	$\Delta A (\text{Na}^+)$	Fator de interferência
1 : 0	0,210	—
1 : 100	0,228	1,09
1 : 200	0,218	1,04
1 : 400	0,213	1,01
1 : 600	0,213	1,01
1 : 1000	0,209	1,00
1 : 1500	0,213	1,01
1 : 2000	0,211	1,00
1 : 3000	0,205	0,98
1 : 4000	0,208	0,99
1 : 5000	0,206	0,98

* Uma parte de Cr(VI) representa uma concentração de 10 ng/mL do elemento.

TABELA 4.15. Interferência produzida pelos íons Na^+ na determinação de Cr(VI) , quando esses atuam em altas concentrações.

Cr(VI) : Na^+ (ng/mL : mol/L)	$\Delta A (\text{Na}^+)$	Fator de Interferência
10 : 0,08	0,206	0,98
10 : 0,10	0,210	1,00
10 : 0,15	0,219	1,04
10 : 0,20	0,208	0,99
10 : 0,30	0,222	1,06
10 : 0,50	0,214	1,02

E finalmente, na Tabela 4.16, temos o resultado do estudo da interferência do biftalato de potássio. A interferência deste sistema foi testada usando-se uma solução tampão a $\text{pH} = 5$ para verificar o efeito da concentração dos ânions e não da concentração hidrogeniônica, o qual já foi demonstrado no estudo de superfícies de respostas no item 4.3. No procedimento para determinação de

cromo em amostras reais, esta solução é adicionada ao meio onde se processa a reação indicadora, (oxidação da o-dianisidina), com a finalidade de elevar e manter o pH entre 4 e 5. O objetivo do estudo da interferência deste tampão é encontrar a concentração máxima que poderia ser utilizada sem causar grandes variações na resposta do sistema já otimizado, visto que esta espécie não participou do procedimento de otimização do método (item 4.1). Observa-se que para valores de concentração até 0,03 mol/L, há um decréscimo de cerca de 2% no valor de Δ Abs. Com este estudo foi possível estabelecer que concentrações de até 0,03 mol/L deste tampão podem ser utilizadas sem afetar a resposta do sistema otimizado, o qual é indispensável após o procedimento de extração.

TABELA 4.16. Interferência produzida pelo tampão de biftalato de potássio, a pH 5, na determinação de Cr(VI)^(a).

$\text{HC}_8\text{H}_4\text{O}_4^-/\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4^{2-}$ (mol/L)	ΔA	Fator de interferência
0	0,210	—
1×10^{-5}	0,221	1,05
1×10^{-4}	0,217	1,03
1×10^{-3}	0,215	1,02
1×10^{-2}	0,210	1,00
2×10^{-2}	0,206	0,98
3×10^{-2}	0,205	0,98
4×10^{-2}	0,195	0,93
5×10^{-2}	0,185	0,88

^(a) a concentração de Cr(VI) para este estudo, também foi mantida em 10 ng/mL.

4.4.2. Estudo Multifatorial de Interferentes

Os experimentos obedecendo a um planejamento fatorial completo com dois níveis e seis variáveis (Tabela 3.5) foram feitos para alguns interferentes, com o objetivo de avaliar o grau de interferência, quando eles estão atuando juntos. A Figura 4.9 ilustra os efeitos ordenados em um gráfico de probabilidade

normal, (MONTGOMERY, 1991). Todos os efeitos que situam-se ao longo da linha são estatisticamente iguais a zero, enquanto os efeitos maiores estão colocados fora da linha. Estes efeitos são produzidos por Cu(II), Fe(III), Fe(III)XEDTA, Zn(II), Cu(II)XFe(III), Mo(VI), Cu(II)XMo(VI), Cu(II)XMo(VI)XEDTA, Fe(III)XMo(VI), Cr(III)XFe(III) e Cr(III)XMo(VI). A Tabela 4.17 mostra a análise de variância dos efeitos e confirma que apenas aqueles dispostos fora da linha na Figura 4.9 são significativos quando submetidos ao teste F a um nível $\alpha = 0,01$.

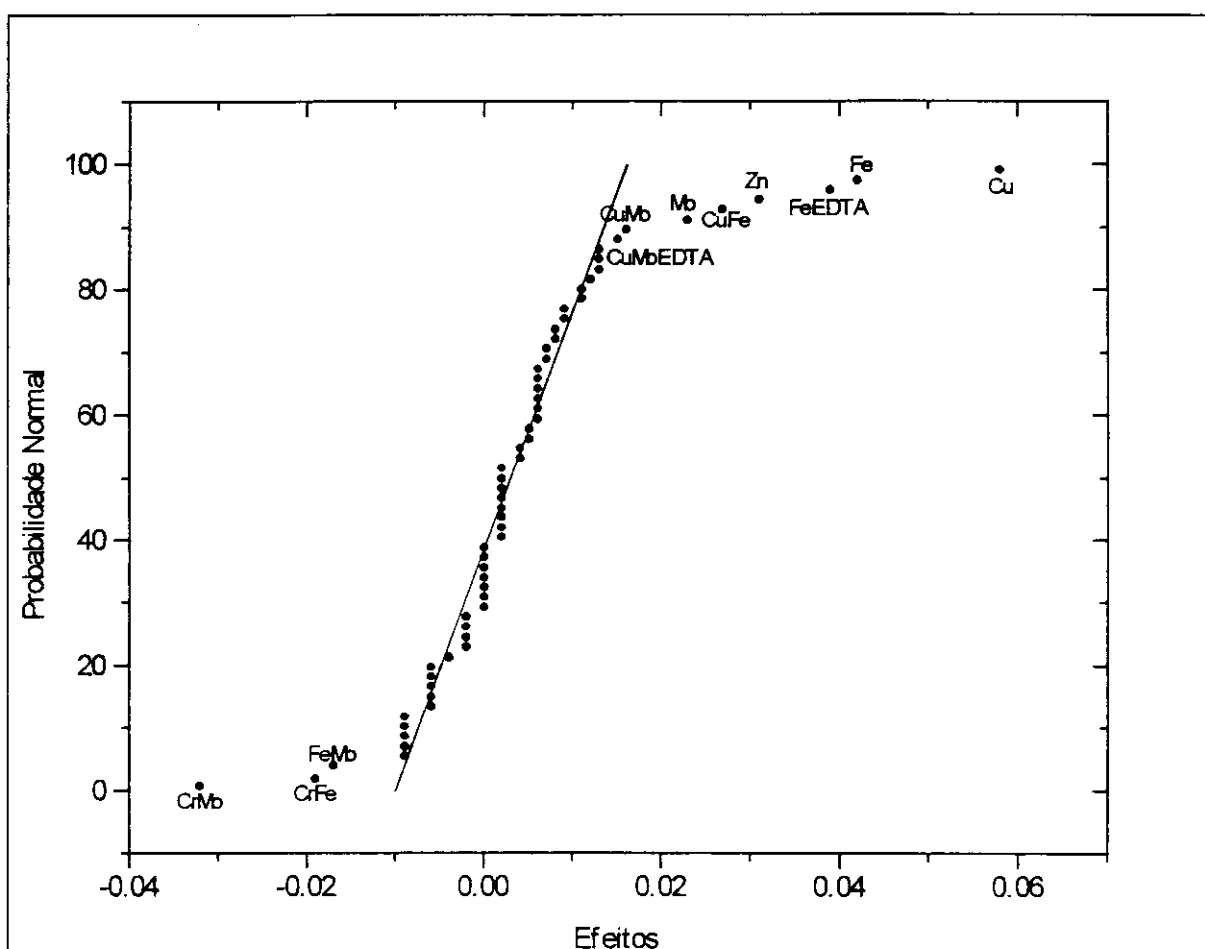


FIGURA 4.9. Gráfico de probabilidade normal de todos os efeitos, enfatizando aqueles que são significativos.

O efeito principal do Cu(II), que tem o maior valor numérico, significa que quando a concentração de Cu(II) é aumentada de 0 para 20 ng/mL, o valor de ΔA aumenta em 0,057. Este valor é comparável àquele obtido no estudo unifatorial quando o Cu(II) entra na proporção de 2 : 1 em relação ao Cr(VI), (ver Tabela

4.8). O Cu(II) apresenta ainda interações de segunda ordem com o Fe(III) e o Mo(VI), ou seja, quando estes agentes interferentes estão atuando juntos, o acréscimo no valor de ΔA produzido por eles é maior do que a soma dos valores de ΔA produzidos com cada um isoladamente, mostrando que os efeitos são sinérgicos e não aditivos.

O efeito principal do Fe(III) tem interpretação semelhante ao do Cu(II) e também comparável àquele valor obtido do estudo unifatorial para a relação Fe(III):Cr(VI) igual a 50:1, (ver Tabela 4.9). O Fe(III) também interage positivamente com o EDTA, que não tem efeito principal significativo e no estudo unifatorial ele atua diminuindo o sinal analítico, mas aqui, quando interage com o Fe(III), ajuda a aumentar o sinal. Novamente existe a evidência de um efeito de sinergismo entre as espécies estudadas.

TABELA 4.17. Análise de Variância do Planejamento Fatorial.

Efeitos*	Fonte de Variação	Soma Quad.	G. L.	Quad. Méd.	F _{calculado}
0,057	Cu(II)	0,1029	1	0,1029	114,33
0,042	Fe(III)	0,0552	1	0,0552	61,33
0,031	Zn(II)	0,0289	1	0,0289	32,11
0,023	Mo(VI)	0,0156	1	0,0156	17,33
-0,019	Cr(III)xFe(III)	0,0107	1	0,0107	11,89
0,027	Cu(II)xFe(III)	0,0247	1	0,0247	27,44
-0,032	Cr(III)xMo(VI)	0,0213	1	0,0213	34,78
0,016	Cu(II)xMo(VI)	0,0091	1	0,0091	10,11
-0,017	Fe(III)xMo(VI)	0,0082	1	0,0082	9,11
0,039	Fe(III)xEDTA	0,0466	1	0,0266	51,78
0,015	Cu(II)xMo(VI)xEDTA	0,0065	1	0,0065	7,22
—	Erro	0,0572	63	0,0009	—
—	Total	0,4697	127	—	—

* Significativos a um nível α de 0,01.

O comportamento do Mo(VI) seria similar àqueles apresentados pelos íons Fe(III) e Cu(II) se apenas seu efeito principal fosse considerado, entretanto existe um efeito antagônico quando a interação entre Fe(III) e Mo(VI) é analisada, mostrando que quando estas espécies estão atuando juntas há uma tendência a diminuição no valor de ΔA . Mais uma vez ocorreria um engano se apenas o estudo unifatorial fosse considerado, onde seria de se esperar que quando o Fe(III) e Mo(VI) atuassem juntos o sinal aumentasse, visto que no estudo unifatorial ambos causam interferência positiva. No entanto ocorre o contrário!

Fato interessante ocorre com o Cr(III), que no estudo unifatorial se mostra como um sério interferente já na proporção Cr(III):Cr(VI) de 2:1, (ver Tabela 4.8). Quando atua em conjunto com outros interferentes, seu efeito principal torna-se insignificante e os efeitos de interação Cr(III)xFe(III) e Cr(III)xMo(VI) são negativos, ou seja, ele atua diminuindo o grau de interferência destas espécies quando todas estão atuando simultaneamente. Por outro lado, o EDTA que apresenta efeito inibidor da reação catalisada quando estudado separadamente, aqui não apresenta efeito principal significativo e as interações, ao contrário do que se poderia esperar, foram todas positivas, podendo-se dizer que de uma certa forma ele atua como um ativador da reação catalisada, quando atua simultaneamente com as espécies que interagiram positivamente com ele.

Não se busca explicações para os fenômenos ocorridos neste estudo, pois não há informações suficientes para tais explicações. O fato é que tais fenômenos ocorrem e estudos desta natureza vêm mostrar o quanto desvia-se da realidade quando estuda-se isoladamente cada interferente.

4.5. Aplicação do Método a Amostras Reais

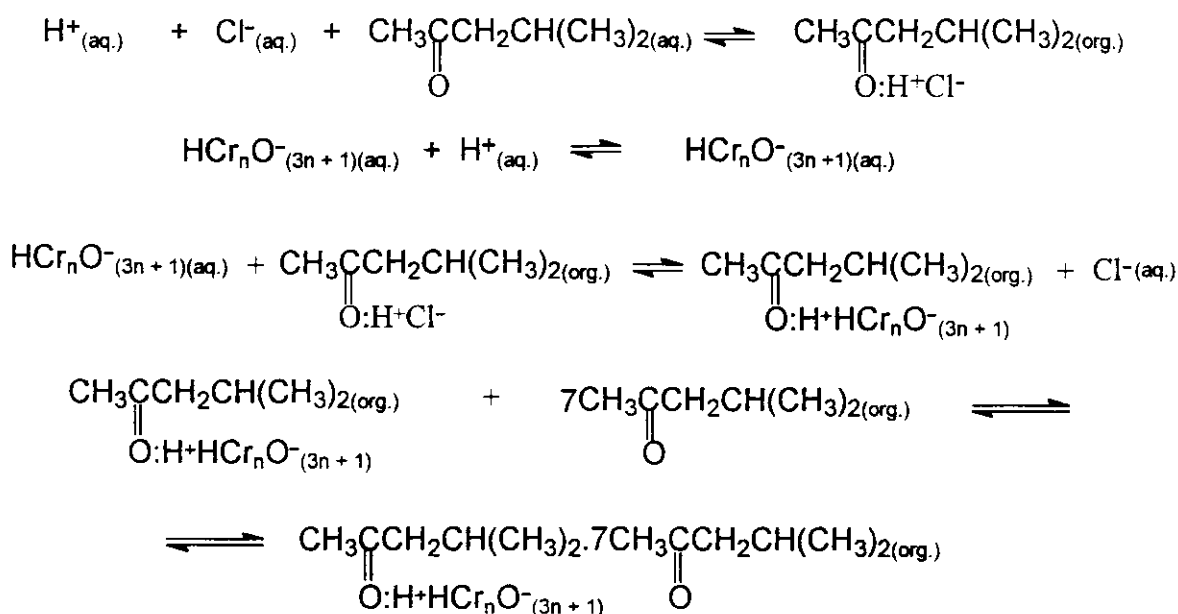
De acordo com a discussão no item 4.4. comprova-se que o método cinético catalítico para determinação de Cr(VI) utilizando o-dianisidina, está sujeito a vários interferentes, o que está de acordo com trabalhos anteriores, (DOLMANOVA et al., 1973; KNEEBONE e FREISER, 1975 e MÜLLER et al., 1980). Desta maneira, torna-se necessário a eliminação destes interferentes, ou

seja, aumentar a seletividade do método, (MÜLLER, 1982). A adição de agentes mascarantes como complexantes não é recomendada neste trabalho pois, existem cátions e ânions interferentes e não seria possível anular o efeito de todos. Além disso, complexantes tais como EDTA, como mostrado na Tabela 4.12., afetam também a reação catalisada. A utilização de resina troca catiônica recomendada por KNEEBONE e FREISER, (1975), funciona quando as espécies inteferentes estão na forma catiônica e em baixas concentrações. Quando a amostra requer tratamento inicial, assim como uma amostra vegetal que necessita ser decomposta, a concentração catiônica do meio torna-se elevada decorrente da adição de ácidos e haverá competição destas espécies com os interferentes, pelos sítios de troca da resina, inviabilizando o procedimento.

Diante dos problemas apresentados por esses dois procedimentos de eliminação de interferentes, optou-se pela extração do Cr(VI), em meio clorídrico, com metil isobutil cetona (MIC) que apresenta alta seletividade para esta espécie, (KATZ et al., 1962).

4.5.1. Extração de Cr(VI) com Metil Isobutil Cetona (MIC)

Segundo KATZ et al., (1962), a extração de Cr(VI) a partir de soluções aquosas de ácido clorídrico com MIC, envolve a formação de uma espécie extraível, provavelmente um ânion policromato monoprótico. Há a formação de um "receptor" na fase orgânica, sugerido como uma cetona protonada, onde ocorre uma troca da espécie extraível da fase aquosa com o ânion da fase cetônica e a solvatação da espécie extraída da fase aquosa no meio orgânico, tornando-a mais estável. O mecanismo sugerido por KATZ et al., (1962), é o seguinte:



De acordo com o mecanismo, o equilíbrio pode ser deslocado para a fase aquosa pelo aumento do pH, ou seja, o Cr(VI) contido na fase orgânica pode ser reextraído para fase aquosa. Segundo PILKINGTON e SMITH, (1967), como a extração é também favorecida em baixas temperaturas, eles fizeram a reextração ("striping") do Cr(VI) da fase orgânica utilizando água a 70 °C. Baseando-se neste trabalho, um procedimento similar foi adotado no presente trabalho.

4.5.2. Determinação de Cromo

O cromo total foi determinado nas soluções, como Cr(VI), após oxidação e extração com MIC, conforme procedimento detalhado no item 3.5 da parte experimental. Devido a falta de padrões certificados disponíveis, a exatidão do método foi verificada por meio de amostras com valores de referência. Os resultados apresentados na Tabela 4.18. mostram que o maior erro relativo calculado é de -3,0% mas que o valor médio encontrado para a mesma amostra encontra-se dentro da faixa de aceitação do IPE¹. O resultado de referência para

¹ Bimonthly Report 91.1 - January/February 1991. International Plant-analytical Exchange (IPE), OIC Dr. V. Houba, P. O. Box 8005, 6700 EC Wageningen - The Netherlands.

esta amostra fornecido pelo IPE, é dado em termos da mediana, pois este valor é resultante de dados de diversos laboratórios e diferentes procedimentos analíticos.

TABELA 4.18. Resultados das determinações de cromo em amostras naturais.

Amostra	Cr ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Média \pm CV (%)	Cr ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	erro relat. (%)
	4856			
6378	4612	4725 \pm 2,6	4872* \pm 571	-3,0
	4706			
	1348			
AP	1290	1277 \pm 6,1	1300	-1,2
	1193			
	13,3			
Água1	12,2	12,8 \pm 4,7	13,1	-2,3
	12,9			
	13,2			
Água2	13,0	13,0 \pm 1,5	13,2	-1,5
	12,9			

* Mediana dos valores, intervalo de aceitação do IPE para a amostra 6378 é [4301— 5443] $\mu\text{g/kg}$.

As variações nos conjuntos de medidas, (Tabela 4.18), são dadas pelos coeficientes de variação (CV), que foram menores do que os encontrados por DOLMANOVA et al., (1972) e MULLER et al., (1980), que utilizaram o mesmo método para determinação de Cr em amostras de arsenito de gálio e soro sanguíneo, respectivamente, e obtiveram variações em torno de 12% para níveis de concentração comparáveis aos níveis das amostras de água na Tabela 4.18. Os teores de cromo encontrados nas amostras de água, (Tabela 4.18.) quando comparados com a determinação por espectrometria de absorção atômica utilizando forno de grafite, apresentaram erros relativos de apenas -2,3% e -1,5%, o que dá uma boa margem de confiabilidade.

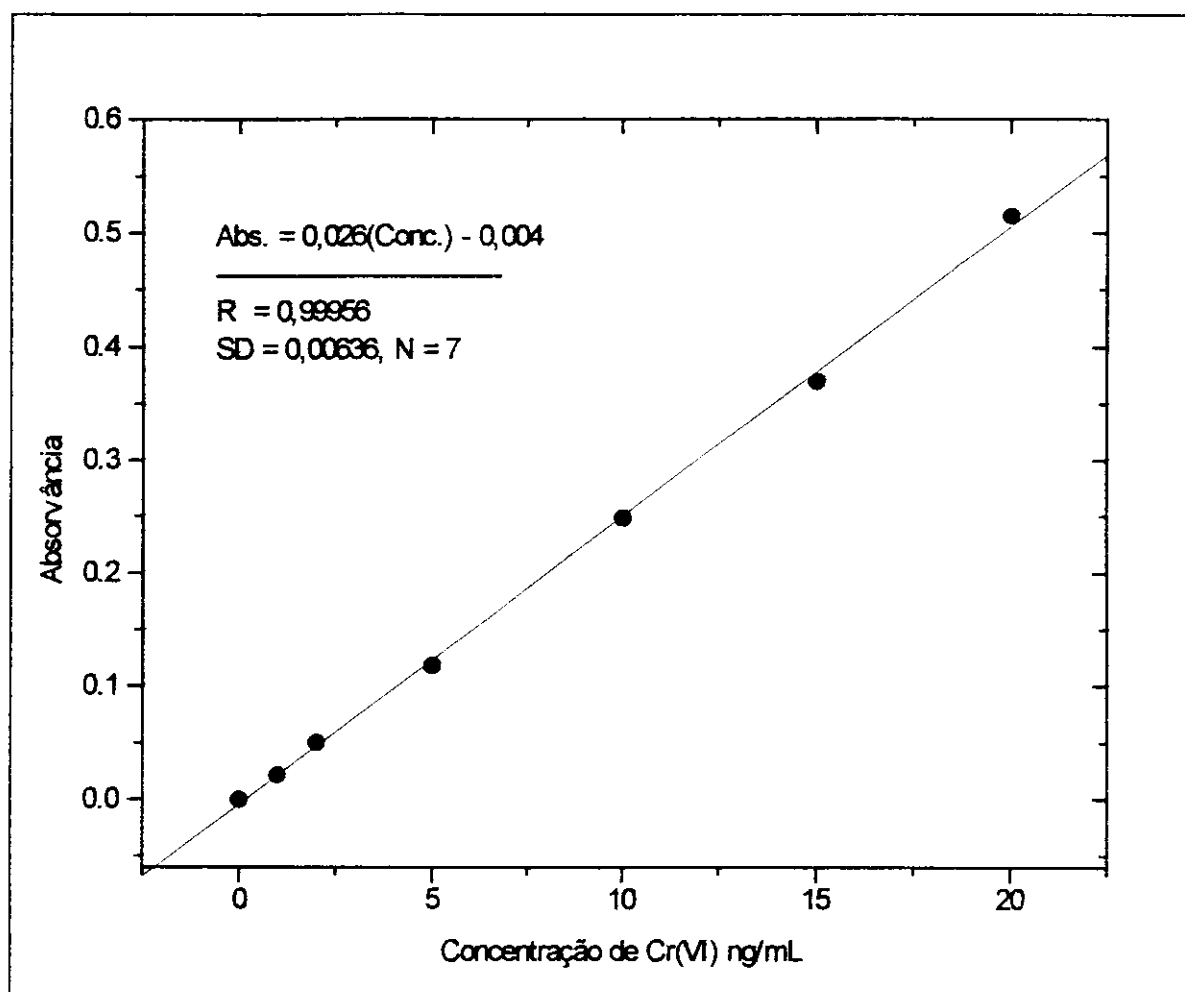


FIGURA 4.10. Curva de calibração obtida nas mesmas condições em que foram submetidas as amostras após a dissolução.

A precisão do método foi determinada por meio do desvio padrão relativo, obtido de dez replicatas no ponto da curva de calibração, (Figura 4.10), correspondente a 10 ng/mL. Nesta concentração o desvio padrão relativo foi de 0,5%. Os limites de detecção e de quantificação, (ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT, 1980), foram calculados através do desvio padrão dos valores das absorvâncias obtidas de dez replicatas do branco de reagentes, submetidas às condições de oxidação e extração, foram 1,1 ng/mL e 3,2 ng/mL respectivamente.

CONCLUSÕES

O planejamento combinado de misturas e variáveis de processo permitiu a otimização das condições experimentais tais como: solventes (variáveis de mistura) e reagentes (variáveis de processo), além de fornecer informações a respeito da interação entre estes dois tipos de variáveis. Isto comprova que este tipo de planejamento combinado oferece mais vantagens quando maiores informações são necessárias a respeito do comportamento das variáveis.

Os efeitos de interação entre os dois tipos de variáveis não causaram um deslocamento da região de máxima resposta dentro do espaço experimental para misturas. Desta maneira pode-se concluir que para este experimento as mesmas condições otimizadas poderiam ser obtidas utilizando planejamento para misturas e superfícies de resposta separadamente.

O estudo da seletividade do método mostrou que melhores informações em relação ao comportamento das espécies interferentes podem ser obtidas quando é feito por procedimentos multifatoriais. Tais procedimentos mostraram a existência de significantes efeitos de interação entre os interferentes, resultando em efeitos antagônicos e sinérgicos dentro de um mesmo sistema. Deste estudo pode-se concluir que quando as espécies interferentes estão atuando simultaneamente, o Cr(III) não pode ser considerado como um interferente considerando apenas seu efeito principal, o mesmo ocorrendo com o EDTA. Portanto, interpretações errôneas em relação a seletividade do método podem ser feitas se apenas experimentos unifatoriais forem utilizados.

O procedimento de extração não afetou a otimização do sistema como pode ser visto pelas curvas de calibração feitas antes e depois da extração.

Foi possível por meio do procedimento otimizado, determinar cromo total na forma de Cr(VI) em matrizes de água e material vegetal com erro relativo de

no máximo 3%. O método apresentou precisão de 0,5% para o nível de concentração de 10 ng/mL de Cr(VI) e limites de detecção e quantificação de 1,1 ng/mL e 3,2 ng/mL respectivamente.

O procedimento de determinação é simples não necessitando termostatar o meio reacional, bastando apenas um aparelho de ar condicionado no recinto do laboratório.

Os resultados obtidos vêm confirmar a validade do método otimizado dentro das limitações experimentais e mostrar a importância da utilização de métodos estatísticos multivariados na otimização de metodologias em química analítica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT**, Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry, *Anal. Chem.*, 52: 2242, 1980
- ADEYOJU, O.; IWUOHA, E. I. & SMYTH, M. R.** Kinetic Study of the Inhibitory Effects of Methyl Isothiocyanate on a Peroxidase-modified Platinum Electrode in Non-aqueous Media. *Anal. Lett.* 27(11): 2071, 1994.
- ANDERSON, R. A.; POLANSKY, M. M.; BRYDEN, N. A.; BHATHENA, S. J. & CANARY, J.** Effects of Supplemental Chromium on Patient with Symptoms of Reactive Hypoglycemia. *Metabolism.* 36: 351, 1987.
- BAREK, J. & BERKA, A.** Redox Titrants in Non-aqueous Media. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 15(2): 163, 1984.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S. & BRUNS, R. E.** *Planejamentos e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.
- BAYNE, C. K. & RUBIN, I. B.** *Practical Experimental Designs and Optimization Methods for Chemists*. Deerfield Beach: VCH Publishers, 1986.
- BERSIER, P. M. & BERSIER, J.** Applied Polarography and Voltammetry of Organic in Practical Day-to-day Analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 16(2): 81, 1985.
- BOSQUE-SENDRA, J. M.; NECHAR, M.; CUADROS-RODRIGUES, L. & MOLINA-MOLINA, M. F.**, Optimization of Analytical Methods by Using Doehlert's Designs, *Anal. Proc.* 32(9): 375, 1995.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. & HUNTER, J. S.** *Statistics for Experiments*. USA: John Wiley & Sons, Inc. Chap. 15, 1978.
- BOWERS, L. D.** Immobilized Enzymes in Chemical Analysis, *Trends Anal. Chem.* 1(8): 191, 1982.

- BRENNAN, M. C. and SVEHLA, B.** Flow Injection Determination of Boron, Copper, Molybdenum, Tungsten and Zinc in Organic Matrices with Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry. *Fresenius Zh. Anal. Chem.* 335: 893 - 899, 1989.
- BROWN, C.** Chemometrics, *Anal. Chem.* 62: 84R, 1990.
- BUSCARÓNS, F. & ARTIGAS, J.** Detection and Colorimetric Determination of CrO_4^{2-} Ion with o-Dianisidine. *Anal. Chim. Acta*, 16: 452 - 454, 1957.
- CABRERA-MARTIN, A.; DURAND, J. S. & RUBIO-BARROSO, S.** Fluorimetric Determination of Chromium at Low Levels with 3-Hydroxyflavone and Application of the Method to Steels. *Anal. Chim. Acta* 183: 263, 1986.
- CAETANO, M.; GOLDING, R. E. & REY, E. A.** Factorial Analysis and Response Surface of a Gas Chromatography Microwave-Induced Plasma System for the Determination of Halogenated Compounds. *Journal Anal. At. Spectrom.* 7(6): 1007, 1992.
- CAREL, A. B. and WIMBERLEY, J. W.** An improved Method for Determination of Molybdenum in Plants, Soils and Rocks. *Anal. Lett.* 15(A5): 493 - 505, 1982.
- SCHEFFÉ, H.** The Simplex Centroid Design for Experiments With Mixtures. *Journal Royal Stat. Soc.* B25: 235 - 263, 1963.
- COENEGRACHT, P. M. J.; DIJKMAN, M.; DUINEVELD, C. A. A.; METTING, H. J.; ELEMA, E. T. & MALINGRE, T. M.** New Quaternary Mobile Phase System for Optimization of TLC Separation of Alkaloids Using Mixture Designs and Response Surface Modelling. *Journal Liq. Chromatogr.* 14(16-17): 3213, 1991.
- COHEN, M. D.; KARGACIN, B.; KLEIN, C. B. & COSTA, M.** Mechanisms of Chromium Carcinogenicity and Toxicity. *Critical Rev. Toxicol.* 23(3): 255 - 281, 1993.
- CORNELL, J. A.** Analysing Data from mixture Experiments Containing Process Variables: A Split-Plot Approach. *Journal Qual. Technol.* 20(1): 2 - 23, 1988.
- CORNELL, J. A.** Experiments With Mixtures: A Review. *Technometrics*, 15(3): 437, 1973.
- CORNELL, J. A.**^(a) *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1990.
- CORNELL, J. A.**^(b) *How to Apply Response Surface Methodology*. USA., A-R Editions, Inc. V. 8, 1990.

- CORNELL, J. A.**^(e) *How to Run Mixture Experiments for Product Quality*. The ASQC basic referenc in quality control: v. 5, Wisconsin, 1990.
- CORNELL, J. A.** Process Variables in the Mixture Problem for Categorized Components. *J. Am. Statist. Assoc.* 66: 42 - 48, 1971.
- CORNELL, J. A. & DENG, J. C.** Combining Process Variables and Ingredient Components in Mixing Experiments. *J. Food Sci.* 47: 836 - 848, 1982.
- CORNELL, J. A. & GORMAN J. W.** Fractional Design Plans for Process Variables in Mixture Experiments. *Journal Qual. Technol.* 16(1): 20, 1984.
- COTTON, F. A. & WILKINSON, G.** *Advanced Inorganic Chenistry, A Comprehensive Text*, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- CROSIER, R. B.** Mixture Experiments: Geometry and Pseudocomponents. *Technometrics*, 26(3): 209, 1984.
- CUELBAS, C. J.** *Uso de Misturas de Solventes para a Determinação de Molibdênio com Tiocianato: Estudo das Condições de Extração Líquido-líquido por Fase Únicano Sistema Água-etanol-clorofórmio*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas (SP), 1994.
- de ANDRADE, J. C.; ROCHA, J. C.; PASQUINI, C. & BACCAN, N.** Effect of on-line Complex Formation Kinetics on the Flow Injection Analysis Signal: The Spectrophotometric Determination of Chromium(VI). *Analyst*, 108: 621, 1983.
- DEN BOEF, G. & HULANICKI, A.** Recommendations for the Usage of Selective, Selectivity and Related Terms in Analytical Chemistry, *Pure Appl. Chem.* 55(3): 553, 1983.
- DOLMANOVA, I. F. & SHEKHOVTSOVA, T. N.** Mechanism of Catalytic Acton of Chromium in the Oxidation of o-Dianisidine by hydrogen Peroxide, *Zh. Analit. Khim.* 32: 1546, 1977.
- DOLMANOVA, I. F.; BALSHOVA, T. A.; SHEKHOVTSOVA, T. N. & PESHKOVA, V.** Kinetic Determination of Trace Amounts of Chromium in Gallium Arsenide. *Zh. Analit. Khim.* 27: 1848, 1972.
- DOLMANOVA, I. F.; ZOLOTOVA, G.A.; SHEKHOVTSOVA, T. N.; BUBELO, V. D. & KURDYUKOVA, N. A.** Effect of Aqueous Organic Media on the Chromium(III)-Catalyzed Oxidation of o-Dianisidine by Hydrogen Peroxide. *Zh. Analit. Khim.* 27: 1848, 1978.

- DOLMANOVA, I. F.; ZOLOTOVA, G.A.; TARASOVA, L. V. and PESHKOVA, V. M.** Determination of Microamounts of Chromium(VI) by Means of the Catalytic Oxidation of o-Dianisidine by Hydrogen Peroxide. *Zh. Analit. Khim.* 24: 1035 - 1039, 1969.
- DUINEVELD, C. A. A.; SMILDE, A. K. & DOORNBOS, D. A.** Designs for Mixture and Process Variables Applied in Tablet Formulations. *Anal. Chim. Acta*, 277: 455, 1993.
- EDGE, K. W.; LONGBOTTON, J. E. & JOYCE, R. J.** Ion Chromatographic Method for Dissolved Hexavalent Chromium in Drinking Water Groundwater, and Industrial Wastewater Effluents: Collaborative Study. *Journal A. O. A. C. Int.* 77(4): 994, 1994.
- EIRAS, S. P.** *Determinação Catalítica de Molibdênio em Plantas, Usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado com Detecção Espectrofotométrica.* Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 1991.
- EIRAS, S. P.; ZAMORA, P. G. P. & REIS E. L.** Estudo do Efeito de Misturas de Solventes na Determinação Espectrofotométrica por Absorção Atômica. *Quim. Nova*, 17(5): 369, 1994.
- FUNG, Y. S. & SHAM, W. C.** Determination of Chromium(VI) in River Water Samples by Electrothermal Atomic-absorption Spectrometry. *Analyst* 119(5): 1029, 1994.
- GILBERT, T. R. & PENNEY, B. A.** Determination of Trace Elements in non-aqueous Samples by d.c. Plasma Emission spectrometry. *Spectrochim. Acta*, Part 8, 38(1-2): 297 - 302, 1983.
- GOLDSTEIN, G.; MANNING, D. L. & MENIS, O.** Spectrophotometric Determination of Molybdenum as the Quercetin Complex in an Alpha-Benzoinoxime-Chloroform-Ethyl Alcohol Medium. *Anal. Chem.*, 30: 539 - 342, 1958.
- GONZALEZ-ARJONA, D. & GUSTAVO-GONZALEZ, A.** Computational Method for Evaluating and Optimizing Response Surface Curves Based on Mixture Designs, *Anal. Chim. Acta*, 293(1-2): 205, 1994.
- GOODGAME, D. M. L. & JOY, A. M.** Relatively Long-Lived Chromium(V) Species are Produced by the Action of Glutathione on Carcinogenic Chromium(VI). *Journal Inorg. Biochem.*, 26: 219, 1986.

- GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S. & EATON, A. D.** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, pg. 3-58, 18 th Edition, Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1992.
- GREENWOOD, N. N. & EARNSHAW,** *Chemistry of the Elements*, Republic of Singapore, Maxwell Macmillan International Editions, 1984.
- GU, Z. C. & DE WANG, X.** The Application of Principal Component Regression on Simultaneous Multicomponent Determination Through a Single Catalytic Kinetic Run. *Talanta* 42(2): 205, 1995.
- HODGES, L.** *Environmental Pollution*, Holt, USA, Rinehart and Winston, 1973.
- JORHEM, L.** Determination of Metals in Foodstuffs by Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing: NMKL Interlaboratory Study of Lead, Cadmium, Zinc, Copper, Iron, Chromium and Nickel. *Journal A. O. A. C. Int.* 76(4): 798, 1993.
- KABASAKALIS, V.** Fluorimetric Chromium(VI) and Chromium(III) Speciation with Crystal Violet. *Anal. Lett.* 26(10): 2269, 1993.
- KAMBUROV, A.** Extraction-photometric Determination of Chromium(VI) with Thiazolyl Blue. *Zh. Anal. Khim.* 46(8): 1538, 1991.
- KATZ, S. A. & SALEM, H.** The Toxicology with Respect to its Chemical Speciation: a Review, *Journal Appl. Toxicol.* 13(3): 217 - 224, 1993.
- KHALIFA, H. & ISMAIL, I. A.** Use of Arsenite Reduction in Potentiometric Methods for Arsenic(III) or Higher Valent Lead, Manganese, Chromium and Vanadium in Some Industrial Products, *Microchem. Journal*, 28(4): 522, 1983.
- KIRK, R. E. & OTHMER, D. F.** *Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 6, pgs 103 - 116, USA, John Wiley & Sons, Inc., 1979.
- KNEEBONE, B. M. & FREISER, H.** Determination of Chromium(VI) in Industrial Atmospheres by a Catalytic Method. *Anal. Chem.* 47(3): 595 - 598, 1975.
- KUMPULAINEN, J. & KOIVISTOINEN, P.** Chromium Content of Some Finnish Cereals Determined by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Acta Agric. Scand.* 27: 35, 1977.
- KUZNETSOV, V. V. & BIRYUKOVA, O. V.** Peroxo-complexes of Chromium(VI), Molybdenum(VI) and Vanadium(V) in Photometric Flow-injection Analysis. *Zh. Anal. Khim.* 48(4): 592, 1993.
- LEE, J. D.** *Concise Inorganic Chemistry* New York, Chapman & Hall, 1991.

- LINTSCHINGER, J.; KALCHER, K.; GOSSLER, W. & NOVIC, M.** Simultaneous Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) by Reversed-phase Ion-pair HPLC with Chromium-specific Detection, *Fresenius' Journal Anal. Chem.* 351(7): 604, 1995.
- LONGINOVA, E. V.; DIMITRIENKO, S. G.; RUNOV, V. K.; JORDANIDY, T. G. & ZOLOTOV, Yu. A.** Solid-state Luminescent Chromium(VI) Sensor Based on Rhodamine Dyes and Polyurethane Foams; Sorption-fluorimetric Analysis. *Zh. Anal. Khim.* 50(4): 423, 1995.
- LUQUE DE CASTRO, M. D. & VARCACEL CASES, M.** Simultaneous Determinations in Flow Injection Analysis, *Analyst*, 109(4): 413, 1984.
- MANJAREKAR, S. V. & ARGEKAR, A. P.** Cation Exchange Chromatographic Separation of Zinc in Mixed Solvents and Non-aqueous Hydrobromic Acid Media. *Anal. Lett.* 28(9): 1711 - 1727, 1995.
- MANZOORI, J. L. & SHEMIRANI, F.** Determination of Chromium(VI) and Total Chromium by Inductively Coupled Plasma Atomic-emission Spectrometry After Preconcentration Using Solvent Extraction and Back-extraction. *Journal Anal. Atomic Spectrom.*, 10(10): 881, 1995.
- MONTGOMERY, D. C.** *Design and Analysis of Experiments*. Singapore, John Willey & Sons, Inc., 1991.
- MOTTOLA, H. A.** *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, USA, John Willey & Sons, Inc., 1988.
- MÜLLER, H.** Catalytic Methods of Analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 13(4): 312, 1982.
- MÜLLER, H.** Catalytic Methods of Analysis: Characterization, Classification and Methodology, *Pure & Appl. Chem.* 67(4): 601, 1995.
- MÜLLER, H.; MATTUSCH, J. & WERNER, G.** Extraktions Katalymetrische Bestimmung von Chrom(VI), *Mikrochim. Acta*, II: 340, 1980.
- ONISHI, H.** *Photometric Determination of Traces of Metals. Part IIA: Individual Metals, Aluminium to Lithium*. Chapter 10, 4 th Edition, USA, John Wiley & Sons, 1986.
- OKTAVEC, D. LEHOTAY, J. & HORNACKOVA, E.** Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) in Underground Water and Waste Water by Flame and Grafite-furnace AAS. *Atomic Spectrosc.* 16(2): 92, 1995.

- OLSEN, K. B.; WANG, J.; SETLADJI, R. & LU, J. M.** Field Screening of Chromium, Cadmium, Zinc, Copper and Lead in Sediments by Stripping Analysis, *Environ. Sci. Technol.* 28(12): 2074, 1994.
- OTTO, M.; MUELLER, H. & WERNER, G.** Selectivity of Catalytic Methods of Determination. *Talanta* 25(3): 123, 1978.
- OTTO, M.; SCHOBEL, G. & WERNER, G.** Kinetic-Catalytic Determination of Vanadium in Non-aqueous Solvents. *Anal. Chim. Acta*, 147: 287, 1983.
- PALASOTA, J. M. & DEMING, S. M.** Mixture Designs Applied to the Study of the Liquid-Chromatographic Separation of L-phenylalanine, L-tyrosine and L-tryptophan. *Anal Chim. Acta*, 270(1): 13, 1992.
- PEREZ-BENDITO, D.** Inorganic Differential Kinetic Analysis: A Review, *Analyst*, 109(7): 891, 1984.
- PEREZ-BENDITO, D. & SILVA, M.** *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*. Chichester, England, John Wiley & Sons, 1988.
- POWEL, M. J.; BOOMER, D. W. & WIEDERIN, D. R.** Determination of Chromium Species in Environmental Samples Using High-pressure Liquid Chromatography Direct Injection Nebulization and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 67(14): 2474, 1995.
- PUACZ, W.** Gas-chromatographic determination of divalent sulphur compounds using the catalysed iodine azide reaction in non-aqueous media. *Fresenius' Zh. Anal. Chem.* 329(1): 43 - 46, 1987.
- PUNGOR, E.; TÓTH, K.; KLATSMÁNYI, R. & IZUTZ, K.** Applications of Ion-selective Electrodes in Nonaqueous and Mixed Solvents. *Pure Appl. Chem.* 55(12): 2029, 1983.
- REIS, C. & de ANDRADE, J. C.** Experimentos com Misturas Utilizando Cromatografia em Papel. *Quim. Nova*, 19(3): 313 - 319, 1996.
- RIGHEZZA, M. & CHRÉTIEN, J. R.** Factor Analysis of Experiments Design in Chromatography. *Cromatographia*, 36: 125 - 129, 1993.
- ROCHA, J. C.** *Determinação Sequencial de Cr(III) e Cr(VI) por Injeção em Fluxo Contínuo*. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, 1983.
- ROZYCKI, C.** Application of the Simplex Method for Optimization of the Analytical Methods, *Chem. Anal.* 38(6): 681, 1993.

- SAHUQUILLO, A.; RUBIO, R.; RAURET, G. & GRIEPINK, B.** Determination of Total Chromium in Sediments by FAAS. *Fresenius' Journal Anal. Chem.* 352(6): 572, 1995.
- SCHEFFÉ, H.** Experiments With Mixtures. *J. Royal Stat. Soc.*, B20: 344 - 360, 1958.
- SCHEFFÉ, H.** The Simplex Centroid Design for Experiments With Mixtures. *Journal Royal Stat. Soc.*, B25: 235, 1963.
- SNEE, R. D.** Experiments With Mixtures. *CHEMTEC*, 9: 702 - 710, 1979.
- SOARES, M. E.; LOURDES-BASTOS, M. & FERREIRA, M. A.** Determination of Total Chromium and Chromium(VI) in Animal Feeds by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Journal Anal. Atomic Spectrom.* 9(11): 1269, 1994.
- SPENDLEY, W.; HEXT, G. R. & HIMSWORTH, F. R.** Sequential Application of Simplex Designs in Optimization and Evolutionary Operation, *Technometrics*, 4(6): 441, 1962.
- STONE, C. W.** *Evolution of Chromium Ore Fields*. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1987.
- VAMBEL, P. F.; GILLIARD, J. A. & TILQUIM, B.** Chemometrics Optimization in Drug Analysis by HPLC: A Critical Evaluation of the Quality Criteria Used in the Analysis of Drugs Purity. *Chromatographia*, 36: 120 - 124, 1993.
- VANICKOVA, M.; LABUDA, A. J. & HOLFBAUEROVA, H.** Voltametric Determination of Chromium Traces in Gallium Arsenide, *Zh. Anal. Khim.* 47(5): 890, 1992.
- WATSON, C. A.** *Official and Standardized Methods of Analysis*, USA: The Royal Society of Chemistry, 3rd edition, pg. 277, 1994.
- WOLFF, C. M. & SCHWING, J. P.** Effet Catalytique des Chromate, Molybdate et Tungstate sur la Réaction d'Oxydation de l'iodure par le Bromate: Applications Analytiques, *Bull. Soc. Chim. France*, N° 5-6: 675, 1976.
- WOODING, W. M.** The Split-Plot Designs. *J. Qual. Technol.* 5: 16 - 33, 1973.
- ZELENSKY, I.; ZELENSKA, V. & KANIANSKY, D.** Isotachophoretic Determination of Chromium(VI) at Low Parts-per-billion Concentrations. *Journal Chromatogr.* 18(1): 111, 1987.

ZHU, Z. & GU, Z. Simultaneous Determination of Iodide and Nitrite by Catalytic Kinetics, *Analyst*, 118(1): 105, 1993.

YAMANE, T. Catalytic Kinetic Methods of Analysis with Flow Injection System. *Journal Flow Injection Anal.* 3(2): 1986.

APÊNDICE 1

Conceitos Básicos de Misturas

As abordagens teóricas a seguir são baseadas nos trabalhos de SCHEFFÉ, (1958, 1963); SNEE, (1979); CROSIER, (1984) e CORNELL, (1973,1990 a, c).

Mistura é um termo usado para definir uma formulação ou uma composição de determinadas substâncias. Um experimento com misturas é aquele no qual dois ou mais componentes são misturados, em quaisquer proporções, e uma resposta é obtida para cada conjunto de componentes. Assume-se geralmente que esta resposta é função somente das proporções (massa, volume, etc.) dos componentes presentes na mistura e não da quantidade total da mistura.

O propósito geral em um experimento com misturas é tornar possível, por meio de superfícies de respostas, a estimativa das propriedades de um sistema multicomponente, a partir de um número limitado de observações. Essas observações são obtidas de combinações pré-selecionadas dos componentes na tentativa de se determinar quais delas otimizam a resposta, de alguma maneira.

Ao contrário dos experimentos com fatorial, onde as variáveis (concentração, pH, temperatura, etc.) são independentes, no problema de misturas os componentes representam proporções e, neste caso, não são independentes e o espaço experimental, denominado de "simplex", terá dimensão de uma unidade a menos do que o número de componentes (q) usado na formulação, ou seja, igual a $(q - 1)$. Esta restrição é consequência da interdependência dos componentes (x_i) da mistura dada pela equação (A.1). Portanto a representação geométrica do espaço experimental para " q "

componentes consiste de todos os pontos (vértices, arestas, faces, etc.) de uma figura regular de dimensão $(q - 1)$.

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q \quad (\text{A.1})$$

Em uma mistura binária, a equação (A.1) é representada por uma reta ($x_1 + x_2 = 1$) e cada ponto desta reta corresponde a uma mistura diferente. Embora todo o espaço dentro do quadrado (Figura A.1a) possa ser estudado em experimentos nos quais as variáveis são independentes, em experimentação com misturas o espaço fica restrito aos pontos da reta. As variações nas respostas das propriedades das misturas em função das proporções dos componentes podem ser representadas por curvas traçadas acima desta reta.

Para misturas de três componentes, ($q = 3$), o "simplex" é um triângulo equilátero, formado por um plano diagonal contido em um cubo, onde a soma das proporções de x_1 , x_2 e x_3 em qualquer ponto do triângulo também é igual a um. Sistemas em que x_1 , x_2 e x_3 são independentes, (ex. $x_1 =$ concentração, $x_2 =$ temperatura e $x_3 =$ pH), todos os pontos do cubo podem ser utilizados no experimento, (Figura A.1b). Os pontos situados sobre os vértices do triângulo correspondem aos componentes puros e sobre os lados à misturas binárias. Os pontos contidos no interior do triângulo correspondem à possíveis misturas ternárias. As respostas provenientes das propriedades das misturas, podem ser representadas por uma superfície acima do triângulo, que é mais facilmente analisada fazendo-se sua projeção no plano e mostrando-se as linhas de contorno.

Se o número de componentes na mistura for igual a quatro, ($q = 4$), o "simplex" é um tetraedro e as mesmas inferências podem ser feitas para esta figura. Com o aumento do número de componentes (q), a dimensão do "simplex" aumenta, mas as mesmas regras continuam sendo aplicáveis.

Para ajustar modelos matemáticos, alguns conjuntos de pontos pré-selecionados são escolhidos. A esses conjuntos de pontos, que são combinações das proporções dos componentes da mistura, denominam-se planejamento experimental.

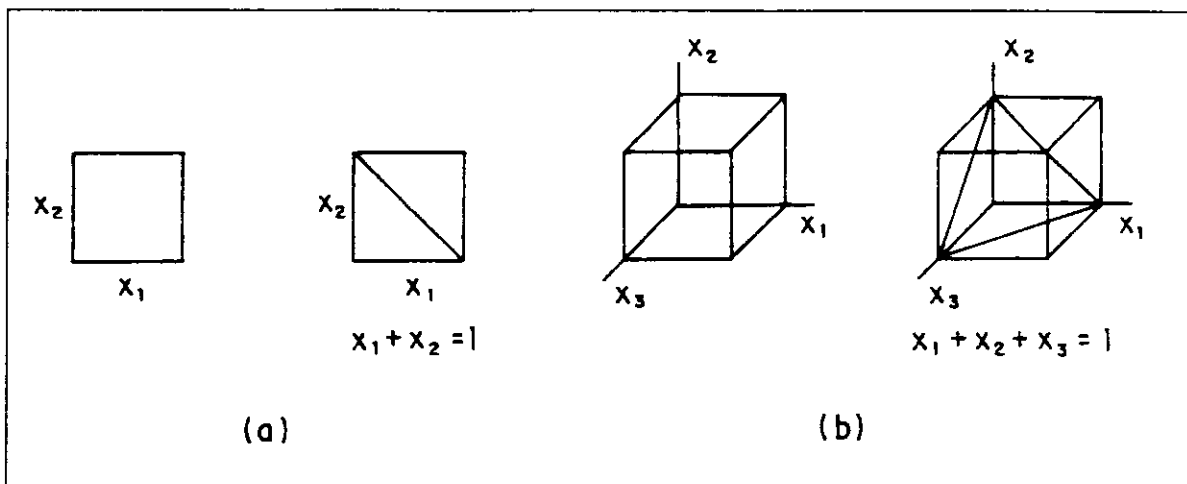


FIGURA A.1. Região experimental para experimentos fatorial e de misturas; (a) para duas variáveis e (b) para três variáveis.

Como as propriedades dos modelos usados para estimar a função resposta depende do planejamento experimental, este deve cobrir toda a região de interesse, permitir uma estimativa do erro experimental e testar o modelo quanto ao ajuste.

Um delineamento com essas características pode ser aquele no qual os pontos estão posicionados uniformemente sobre o "simplex". Tal planejamento é chamado de "Simplex-Lattice" e foi desenvolvido por Scheffé em 1958. Consiste de um arranjo simétrico de pontos que são referidos como $\{q, m\}$, onde (q) é o número de componentes na mistura e (m) é o grau do polinômio a ser ajustado. As proporções assumidas por cada componente dá um número de pontos igual a $(m + 1)$ simetricamente espaçados de 0 até 1. Então, todas as possíveis combinações (misturas) dos componentes podem ser consideradas, utilizando-se as proporções da equação (A.2) para cada componente. Por exemplo, para um sistema com três componentes, $(q = 3)$, a figura geométrica para todas as possíveis misturas é um triângulo equilátero. Suponha que cada componente possa assumir os valores 0, $1/3$, $2/3$ e 1, onde $(m = 3)$, sendo $i = 1, 2, 3$ e 4.

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \quad (\text{A.2})$$

Pela equação A.2 calcula-se que o "Simplex-Lattice" consiste de um arranjo de dez pontos nos vértices, lados e centro do triângulo (Figura A.2a). Estes pontos podem ser representados por:

$$(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0); (0, 1, 0); (0, 0, 1); (1/3, 2/3, 0); (1/3, 0, 2/3); (0, 1/3, 2/3); (2/3, 1/3, 0); (2/3, 0, 1/3); (0, 2/3, 1/3); (1/3, 1/3, 1/3)$$

Os três pontos (1, 0, 0), (0, 1, 0) e (0, 0, 1) representam os componentes puros e estão situados nos vértices do triângulo. Os pontos (1/3, 2/3, 0), (1/3, 0, 2/3), (0, 1/3, 2/3), (2/3, 1/3, 0), (2/3, 0, 1/3), (0, 2/3, 1/3) representam as misturas binárias dos componentes e localizam-se nos lados do triângulo e o ponto (1/3, 1/3, 1/3), situado no centro do triângulo, representa a mistura dos três componentes.

O total de ensaios no "Simplex-Lattice" é definido pelo número de componentes (q) e pelo grau do polinômio (m), e podem ser facilmente determinados por meio da expressão A.3.

$$C_{q+m+1}^m = \frac{(q+m-1)!}{m!(q-1)!} \quad (\text{A.3})$$

Um outro delineamento experimental, denominado "Simplex-Centroid" (Figura A.2b), envolve observações consistindo de todos os subconjuntos dos (q) componentes, mas somente nas misturas onde esses componentes aparecem em iguais proporções. No "Simplex-Centroid" um número de $(2^q - 1)$ observações são utilizadas, o que reduz o número de experimentos e ainda permite ajustar um modelo denominado cúbico especial.

Com o objetivo de obter equações de regressão, modelos matemáticos devem ser ajustados aos dados obtidos do planejamento experimental. Em procedimentos com superfícies de resposta envolvendo variáveis independentes, experiências têm demonstrado que Y pode ser estimado utilizando um polinômio derivado de uma série de Taylor. Então para duas variáveis x_1 e x_2 , um modelo quadrático poderia ser a equação A.4.

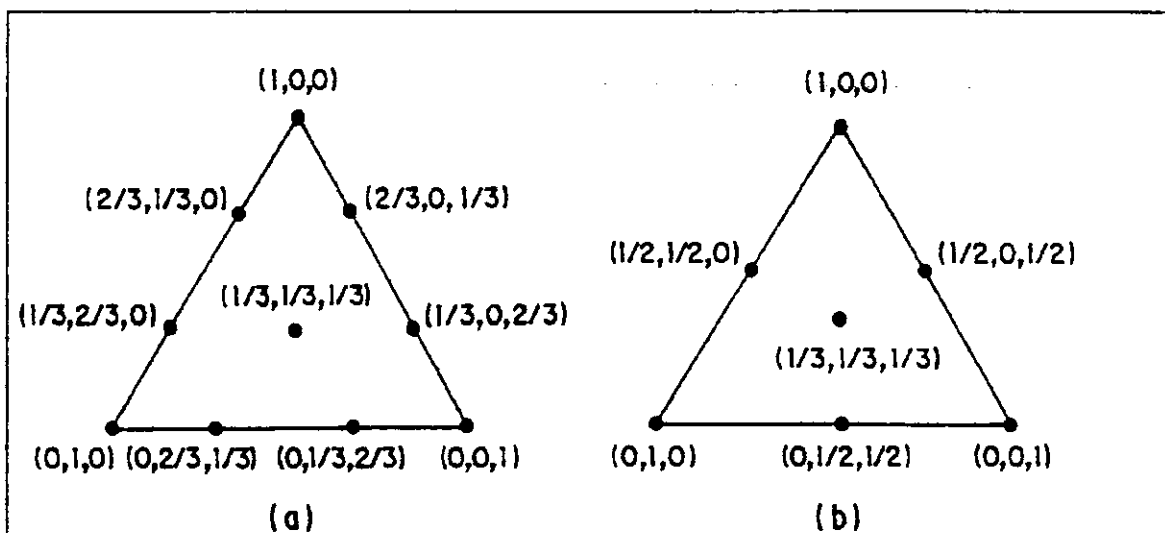


FIGURA A.2. Ilustração do “Simplex-Lattice” (a) e “Simplex-Centroid” (b).

$$Y(x_1, x_2) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (A.4)$$

Entretanto, quando a condição para misturas é aplicada ao modelo polinomial, a equação A.4 se torna:

$$Y(x_1, x_2) = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_{12}^*x_1x_2 \quad (A.5)$$

onde:

$$b_1^* = b_0 + b_1 + b_{11}$$

$$b_2^* = b_0 + b_2 + b_{22}$$

$$b_{12}^* = b_{12} - b_{11} - b_{22}$$

Desta forma os modelos para mistura têm menos coeficientes a serem estimados do que os polinômios comumente utilizado em análise de superfícies de resposta. Em particular, o termo constante b_0 foi removido do modelo. De uma maneira geral, são sugeridas as seguintes formas polinomiais para misturas, omitindo os asteriscos:

Linear

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q$$

Quadrático

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1,q}x_{q-1}x_q$$

Cúbico Especial

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1,q}x_{q-1}x_q + b_{12\dots q}x_1x_2\dots x_q$$

Cúbico Completo

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1,q}x_{q-1}x_q + c_{12}x_1x_2(x_1 - x_2) + c_{13}x_1x_3(x_1 - x_3) + \dots + c_{q-1,q}x_{q-1}x_q(x_{q-1} - x_q) + b_{12\dots q}x_1x_2\dots x_q$$

Quando os valores da resposta são obtidos dos pontos do planejamento experimental, os coeficientes “b” dos modelos podem ser estimados utilizando o método dos mínimos quadrados, por meio da equação matricial,

$$\mathbf{B} = (\mathbf{X}^t \cdot \mathbf{X})^{-1} \cdot \mathbf{X}^t \cdot \mathbf{Y} \quad (\text{A.6})$$

onde **Y** é um vetor coluna de dimensão (N x 1) contendo os valores da resposta para cada mistura. Cada linha da matriz **X**, de dimensão (N x p), corresponde a uma mistura e contém a mesma ordem vertical no vetor **Y**, enquanto que **B** é um vetor coluna de dimensão (p x 1) formado pelos coeficientes do modelo. Sendo p o número de parâmetros no modelo.

Na estimativa dos coeficientes estão envolvidos erros que devem ser determinados, para que se calcule o nível de significância estatística destes coeficientes. Assumindo-se que os erros são independentes entre si e uniformemente distribuídos, a estimativa das variâncias dos coeficientes podem ser dadas pela diagonal principal da matriz de variância e covariância dos elementos de **B**, de dimensão (p x p), (Equação A.7).

$$\text{var}(\mathbf{B}) = (\mathbf{X}^t \cdot \mathbf{X})^{-1} S_p^2 \quad (\text{A.7})$$

e,

$$S_p^2 = \frac{\sum_{l=1}^n \sum_{u=1}^r (y_{lu} - \hat{y}_l)^2}{\sum_{l=1}^n (r_l - 1)} \quad (\text{A.8})$$

sendo

n = número de conjuntos experimentais.

r = repetições

t = número de repetições dentro de cada conjunto experimental.

S_p^2 = variância global

Em um dado experimento, pode-se obter, por exemplo, os modelos quadrático e cúbico especial para explicar as propriedades do seu sistema de misturas. Para escolher um dentre os modelos propostos, a significância estatística é um dos critérios mais usados, a qual pode ser avaliada fazendo-se uma análise de variância para cada modelo. A análise de variância dá informações separadas para cada fonte de variação. A variação total no conjunto de dados é chamada de “soma dos quadrados total”, SQT, dada por

$$SQT = \sum_{u=1}^N (y_u - \bar{y})^2 \quad (\text{A.9})$$

estando associada a $(N - 1)$ graus de liberdade, enquanto que a “soma dos quadrados dos desvios” dos valores observados, (y_u) , em relação aos valores estimados, (\hat{y}_u) , é:

$$SQD = \sum_{u=1}^N (y_u - \hat{y}_u)^2 \quad (\text{A.10})$$

com $(N - p)$ graus de liberdade e a diferença entre as somas de quadrados é a “soma dos quadrados da regressão” SQR, que pode ser escrita como

$$SQR = SQT - SQD = \sum_{u=1}^N (\hat{y}_u - \bar{y})^2 \quad (\text{A.11})$$

com $(p - 1)$ graus de liberdade.

A SQR representa a porção da SQT atribuída a equação de regressão ajustada.

Em notação matricial estas fórmulas são descritas por:

$$SQT = Y'Y - \frac{(UY)^2}{N} \quad (\text{A.12})$$

$$SQD = Y'Y - B'X'Y \quad (\text{A.13})$$

$$SQR = B^t X^t Y - \frac{(UY)^2}{N} \quad (\text{A.14})$$

onde U é um vetor de dimensão (1xN) com todos os elementos iguais a um. Os resultados da análise de variância são geralmente mostrados em forma de tabela, assumindo-se que o modelo ajustado contém p termos, (Tabela A.1).

TABELA A.1. Tabela de Análise de Variância

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma do Quadrados	Quadrado Médio
Regressão	p - 1	$SQR = \sum_{u=1}^N (\hat{y}_u - \bar{y})^2$	$\frac{SQR}{(p - 1)}$
Desvio	N - p	$SQD = \sum_{u=1}^N (y_u - \hat{y}_u)^2$	$\frac{SQD}{(N - p)}$
Total	N - 1	$SQT = \sum_{u=1}^N (y_u - \bar{y})^2$	

O quociente $[SQR/(p - 1)]/[SQD/(N - p)]$ tem distribuição F com (p - 1) e (N - p) graus de liberdade. Então, o valor de $F_{calc.}$ assim obtido é comparado com o $F_{tab.} = F_{(p-1, N-p, \alpha)}$ para testar a significância da regressão sobre x_1, x_2, \dots, x_q ao nível α de probabilidade. Se o teste F para a regressão for significativo, isto significa que pelo menos uma das p variáveis está influenciando significativamente a resposta ao nível α de probabilidade. Mas este teste não indica explicitamente quais os parâmetros significativos, exceto quando $p = 1$. O teste t de STUDENT, neste caso, é utilizado para testar cada parâmetro. A expressão para o teste t é definida por:

$$t_{calc.} = \frac{\hat{b}}{\sqrt{\text{var}(\hat{b})}} \quad (\text{A.15})$$

associado a $\sum_{l=1}^n (n - 1)$ graus de liberdade, $\text{var}(\hat{b})$ é obtido de $\text{var}(\mathbf{B}) = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} S_p^2$ e S_p^2 da equação A.8. Desta maneira eliminam-se os parâmetros que não forem significativos.

Voltando ao teste F para a regressão, suponha-se que ambos os modelos obtidos sejam significativos no nível α de probabilidade. Então outros critérios de avaliação deverão ser levados em consideração. Na comparação entre modelos, é preciso fazer um outro teste F, comparando a redução na soma quadrática do desvio por unidade de parâmetros adicionada, com a própria média quadrática do modelo contendo um maior número de parâmetros. Por exemplo, quando são comparados os modelos cúbico especial e quadrático, testa-se a seguinte hipótese: $H_0 : \beta_{123} = 0$, ou seja, verifica-se se o termo cúbico b_{123} é igual a zero. A equação A.16 é usada para testar a hipótese de nulidade para a escolha do modelo.

$$F_{\text{calc.}} = \frac{[(SQD_{\text{red.}} - SQD_{\text{comp.}})/d]}{[SQD_{\text{comp.}}/(N - p)]} \quad (\text{A.16})$$

p = número de parâmetros no modelo completo.

d = diferença entre p e número de parâmetros no modelo reduzido.

N = número total de ensaios.

$SQD_{\text{red.}}$ = soma dos quadrados do desvio no modelo reduzido.

$SQD_{\text{comp.}}$ = soma dos quadrados do desvio no modelo completo.

A hipótese nula, H_0 , é rejeitada sempre que o valor $F_{\text{calc.}}$ exceda o valor $F_{\text{tab.}}$, com $(d$ e $N - p)$ graus de liberdade. No caso de rejeição da hipótese, para o nosso exemplo o modelo cúbico especial é escolhido.

Uma maneira mais segura de avaliar a qualidade do ajuste dos modelos, é fazer o teste da falta de ajuste. Alguns ensaios a mais do que aqueles necessários para estimar o modelo são planejados e servirão para testar o ajuste. Estes ensaios são chamados pontos de verificação. Desta maneira, o número total de conjuntos experimentais (n) é maior do que o número de parâmetros (p) no modelo, de modo que a soma dos quadrados do desvio é composta da soma dos quadrados da falta de ajuste e da soma dos quadrados devido as replicatas. A soma dos quadrados devido às observações em replicatas (chamada de S. Q. Erro Puro) pode ser calculada a partir das replicatas e então subtraída da soma

dos quadrados do desvio para obter a soma dos quadrados da falta de ajuste (S. Q. Falta Ajuste.). Em outras palavras, se denotarmos a u -ésima observação da l -ésima mistura por y_{lu} , onde $u = 1, 2, \dots, r_l$, sendo $r =$ número de replicatas, e $l = 1, 2, \dots, n$, então:

$$\text{SQ Erro Puro} = \sum_{l=1}^n \sum_{u=1}^r (y_{lu} - \hat{y}_l)^2 \text{ com } (N - n) \text{ graus de liberdade} \quad (\text{A.17})$$

e SQ Falta Ajuste = SQD - SQ Erro Puro, com $(n - p)$ graus de liberdade (A.18)

O teste da Falta de Ajuste é:

$$F_{\text{calc.}} = \frac{(\text{SQ Falta Ajuste})(N - n)}{(\text{SQ Erro Puro})(n - p)} \quad (\text{A.19})$$

A hipótese da falta de ajuste é aceita, a um nível α de significância, quando o valor do $F_{\text{calc.}}$ é maior do que o valor do $F_{\text{tab.}} = F_{(n-p, N-n, \alpha)}$. Neste caso o modelo não é adequado para representar o comportamento do sistema.

Os coeficientes do modelo obtido após os testes de avaliação, devem ser interpretados. Para facilitar será usada como exemplo uma mistura de dois componentes. Se a resposta varia linearmente com a composição da mistura, os componentes agem aditivamente tal que esta resposta seja representada por uma reta, e nos dois extremos da reta tem-se as contribuições dos componentes puros.

Quando a resposta é melhor representada por um modelo quadrático, ou seja, existe uma relação não linear entre os componentes, temos dois casos a considerar: (i) se a resposta é maior do que a esperada de um modelo linear, isto é, $b_{12} > 0$, esta relação não linear é denominada de sinergismo. (ii) Se $b_{12} < 0$, então a resposta é menor do que a esperada em um modelo linear e este tipo de relação entre as variáveis x_1 e x_2 é chamada de antagonismo. A Figura A.3 mostra a interpretação gráfica para os modelos linear e quadrático com dois componentes. O segmento reto representa o modelo linear e os segmentos curvos, o modelo quadrático. O valor de y_1 representa a contribuição do

componente 1 (um), dada pelo coeficiente b_1 e y_2 representa a contribuição do componente 2 dada pelo coeficiente b_2 . O valor médio $(y_1 + y_2)/2$ representa as contribuições dos dois componentes na resposta, quando estes entram com proporções iguais no modelo linear. Para o modelo quadrático este valor é acrescido de $b_{12}/4$.

Interpretações similares são feitas quando se tem mais de dois componentes, não sendo possível, porém, esboçar as superfícies de contorno do polinômio, para modelos com mais de quatro componentes

É muito comum comparar os coeficientes para determinar quais são mais importantes. A importância de um coeficiente depende, em parte, da ordem do termo com o qual ele está associado. A Tabela A.2 mostra que valores elevados dos coeficientes quadráticos e cúbicos não implicam necessariamente em grandes efeitos quando comparados com o coeficiente linear. Um coeficiente cúbico poderia ter 27 vezes o valor do coeficiente linear e ainda assim estaria descrevendo o mesmo efeito.

TABELA A.2. Importância relativa dos coeficientes.

TERMO	VALOR MÁXIMO DA VARIÁVEL	EFEITO MÁXIMO DO TERMO
$b_i x_i$	$x_i = 1$	$b_i x_i = 1 b_i$
$b_{ij} x_i x_j$	$x_i x_j = (1/2) \cdot (1/2) = 1/4$	$b_{ij} x_i x_j = (1/4) \cdot b_{ij}$
$b_{ijk} x_i x_j x_k$	$x_i x_j x_k = (1/3) \cdot (1/3) \cdot (1/3) = 1/27$	$b_{ijk} x_i x_j x_k = (1/27) \cdot b_{ijk}$

Pseudocomponentes

Na prática, muitas vezes não é possível trabalhar com otimização de misturas usando os pontos do "simplex" correspondentes aos componentes puros. Esta restrição pode ser observada quando trabalha-se com misturas de água, etanol e metil-isobutil-cetona e somente a região de total miscibilidade interessa. Neste caso trabalha-se com pseudocomponentes, que não são componentes puros, mas uma mistura fixa dos vários componentes. Com isto o experimento fica limitado a uma sub-região do "simplex", pois as variáveis devem obedecer à desigualdade:

$$0 \leq l_i \leq x_i \leq S_i \leq 1$$

l = limite inferior, S = limite superior, $i = 1, 2, \dots, q$

Os pseudocomponentes (representados por x'_i) são gerados a partir dos componentes originais, e definidos como se segue:

$$x'_i = \frac{x_i - l_i}{1 - L}, \quad L = \sum_{i=1}^q l_i < 1 \quad (\text{A.20})$$

Por exemplo, se: $0,35 \leq x_1 \leq 0,73$ $0,20 \leq x_2 \leq 0,50$ e $0,15 \leq x_3 \leq 0,45$. Então $L = 0,70$ e

$$x'_1 = \frac{x_1 - 0,35}{0,30}, \quad x'_2 = \frac{x_2 - 0,20}{0,30}, \quad x'_3 = \frac{x_3 - 0,15}{0,30}$$

A Figura A.4 ilustra este exemplo, mostrando o "simplex" com os componentes e os pseudocomponentes. Os modelos podem ser obtidos em função dos pseudocomponentes e as interpretações são similares àquelas com componentes originais.

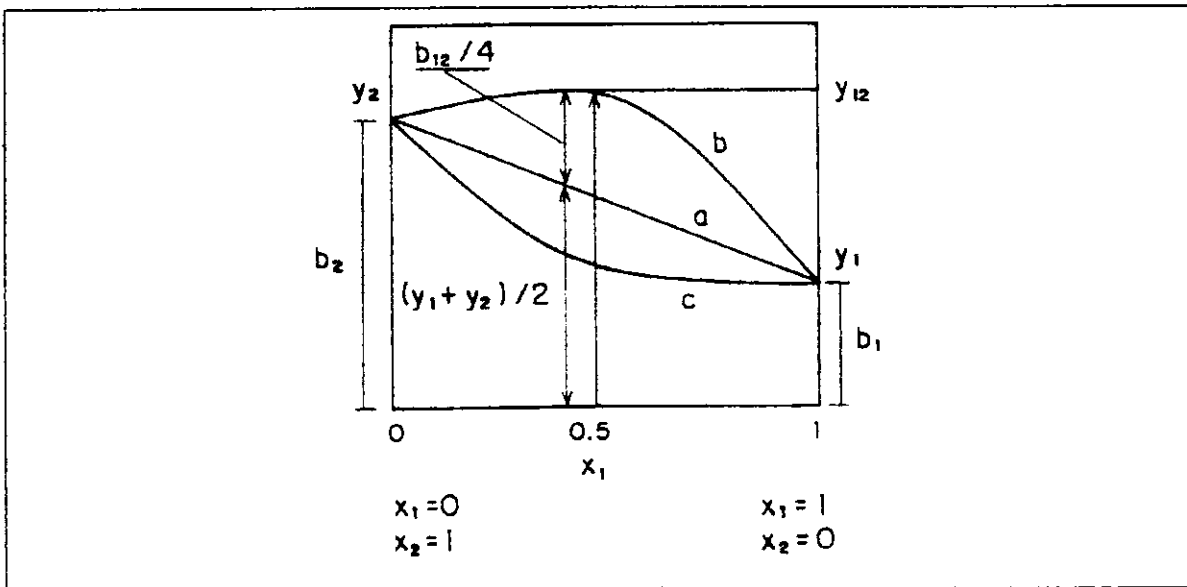


FIGURA A.3. Esboço da resposta em função das proporções entre os componentes da mistura em um sistema binário, (a) efeito aditivo, (b) efeito sinérgico e (c) efeito antagônico entre os dois componentes.

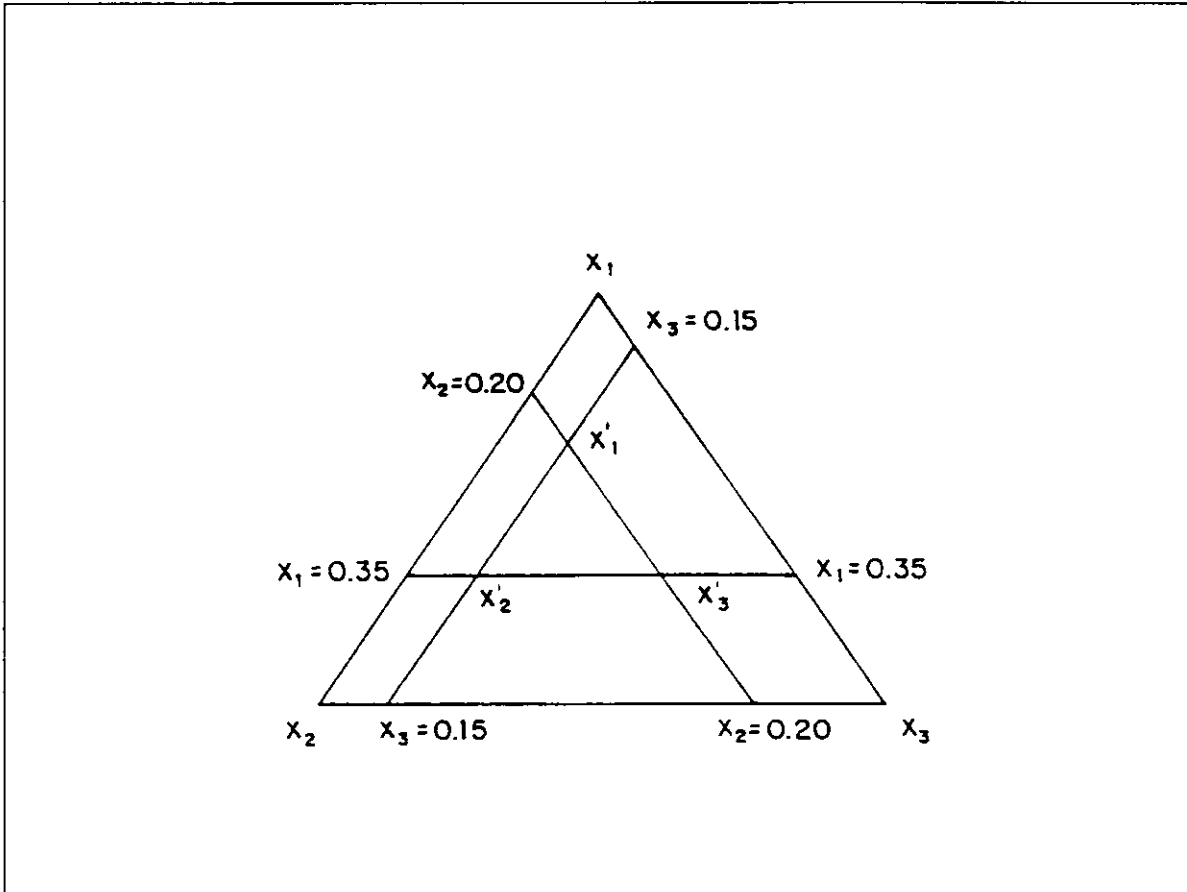


FIGURA A.4. O espaço experimental redefinido nos pseudocomponentes x'_1 , x'_2 e x'_3 .

APÊNDICE 2

Experimentos Com Mistura Envolvendo Variáveis de Processo

As abordagens neste apêndice são baseadas nos trabalhos de CORNELL, (1971, 1988 e 1991A); WOODING, (1973); CORNELL e DENG, (1982) e CORNELL e GORMAN, (1984).

Variáveis de processo são fatores em um experimento que não fazem parte da mistura, mas os seus níveis quando variados, podem afetar as propriedades da mistura. As variáveis de mistura e de processo têm características diferentes. Na mistura, as variáveis somam a unidade, enquanto que para as variáveis de processo isto não ocorre, conseqüentemente tais variáveis são independentes e os componentes da mistura são dependentes entre si.

Quando incluímos variáveis de processo em experimentos com mistura, há um aumento no tamanho do planejamento experimental a ponto de não ser possível processar todos os ensaios de uma maneira aleatória. Por exemplo, se m diferentes ensaios de mistura são combinados a P diferentes ensaios de um fatorial de duas ou mais variáveis de processo, e m ou P , ou ambos são maiores ou igual a três, torna-se impossível fazer o experimento completo aleatoriamente por causa, principalmente, do tempo. Quando o total de mP experimentos não pode ser feito aleatoriamente, normalmente coloca-se uma restrição na casualização para a execução de P separado de m ou vice versa.

Duas diferentes estratégias podem ser utilizadas na execução do experimento em grupos de tratamentos. A primeira é preparar P grupos de m diferentes ensaios de mistura, ou seja, os ensaios da mistura são preparados em cada ponto do fatorial (ver Figura 3.3 na parte experimental). No contexto deste tipo de delineamento, denominado “Split-Plot”, os ensaios da mistura são chamados de unidades “sub-plot” e as condições de processo, unidades “main-plot”. Unidades aqui referem-se a tempo de execução dos ensaios, onde as “sub-unidades” são executadas sucessivamente e as “main-unidades” são executadas em tempos diferentes.

A segunda estratégia envolve a introdução de P condições de processo em cada ensaio de mistura. Nesta abordagem será utilizada a primeira.

Estas estratégias de análise levam em consideração duas fontes de erro experimental. Uma é o erro entre os tratamentos “sub-plot” (mistura) dentro de cada “main-plot” (fatorial), enquanto que a segunda fonte de erro está presente entre os tratamentos “main-plot”. Assume-se, geralmente, que o erro “sub-plot” é menor em magnitude do que o “main-plot” por causa das suas unidades serem mais homogêneas do que as unidades “main-plot”.

Na análise dos dados coletados deste tipo de experimento, as estimativas separadas das variâncias do “main-plot” e do “sub-plot” requerem uma replicação de, no mínimo, duas vezes para o conjunto inteiro de experimentos. As duas fontes de erro experimental citadas acima podem ser analisadas por meio de um modelo de análise de variância convencional dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + Z_j + RZ_{ij} + X_k + ZX_{jk} + \varepsilon_{ijk} \quad \therefore \begin{array}{l} i = 1, 2 \\ j = 1, 2, 3 \\ k = 1, 2, 3 \end{array} \quad (\text{A.21})$$

No modelo acima, Y_{ijk} é o valor da resposta tomada da k-ésima subunidade (mistura) na j-ésima unidade (fatorial) na i-ésima replicação, e

μ = média geral

R_i = efeito aleatório da i-ésima replicação, $R_i \sim \text{NID}(0, \sigma_R^2)$.

Z_j = efeito fixo da j-ésima “main-plot” (variável de processo).

RZ_{ij} = efeito aleatório da replicação com a variável de processo, $RZ_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_{RZ}^2)$

X_i = efeito fixo do k-ésimo "sub-plot" (variável de mistura).

ZX_{jk} = efeito fixo da interação "main-plot" e "sub-plot".

ε_{ijk} = erro aleatório associado a observação Y_{ijk} , $\varepsilon_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma_\varepsilon^2)$.

Este modelo fornece uma tabela de análise de variância (ANOVA), Tabela 6.3.

TABELA A.3. Tabela ANOVA para o modelo (A.21). O número de replicatas, tratamentos "main-plot" e tratamentos "sub-plot" são r, P e m, respectivamente.

Fonte de Variação	g.l.	Q. M	E(QM)
Replicatas (R)	r - 1	QMR	$\sigma_\varepsilon^2 + m\sigma_{RZ}^2 + mp\sigma_R^2$
Tratamentos "Main-Plot" (Z)	P - 1	QMZ	$\sigma_\varepsilon^2 + m\sigma_{RZ}^2 + rm\theta_Z^2$
Erro "Main-Plot" (RZ)	(r - 1)(P - 1)	QMRZ	$\sigma_\varepsilon^2 + m\sigma_{RZ}^2$
Tratamentos "Sub-Plot" (X)	m - 1	QMX	$\sigma_\varepsilon^2 + rP\theta_X^2$
Int. "Main-Plot" por "Sub-Plot" (ZX)	(P - 1)(m - 1)	QMZX	$\sigma_\varepsilon^2 + r\theta_{ZX}^2$
Erro "Sub-Plot"	P(r - 1)(m - 1)	QME	σ_ε^2

O modelo combinado de regressão pode ser obtido da seguinte maneira:

Consideremos o modelo quadrático para misturas contendo três componentes,

$$Y(x) = \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{A.22})$$

e o modelo quadrático para três variáveis de processo,

$$Y(z) = \alpha_0 + \sum_{l=1}^3 \alpha_l z_l + \sum_{l < m} \alpha_{lm} z_l z_m \quad (\text{A.23})$$

Multiplicando (A.22) por (A.23) tem-se:

$$Y(x, z) = \sum_{k=1}^3 g_k^0 x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^0 x_k x_{k'} + \sum_{j=1}^3 \left[\sum_{k=1}^3 g_k^j x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^j x_k x_{k'} \right] z_j + \sum_{j < j'}^3 \left[\sum_{k=1}^3 g_k^{jj'} x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^{jj'} x_k x_{k'} \right] z_j z_{j'} \quad (\text{A.24})$$

onde: $g_k^0 = b_i \alpha_0$; $g_{kk'}^0 = b_{ij} \alpha_0$; $g_k^j = \beta_i \alpha_j$; $g_{kk'}^j = \beta_{ij} \alpha_j$; $g_k^{ij} = \beta_i \alpha_{lm}$;
 $g_{kk'}^{ij} = \beta_{ij} \alpha_{lm}$

Os seis primeiros termos da equação são chamados de porção linear e não-linear da mistura no modelo, visto que esses termos envolvem somente variáveis de mistura. Os outros 36 termos representam os efeitos na mudança das variáveis de processo sobre as propriedades lineares e não-lineares dos componentes da mistura.

$\sum_{k=1}^3 g_k^0 x_k$ é a porção linear da mistura no modelo e g_k^0 é a resposta média esperada sobre todas as combinações dos níveis ou valores de Z_1, Z_2 e Z_3 .

$\sum_{k < k'}^3 \sum g_{kk'}^0 x_k x_{k'}$ é a porção não-linear da mistura no modelo e $g_{kk'}^0$ é uma medida das propriedades não lineares da mistura entre os componentes k e k' tomadas como média sobre todas as combinações dos níveis ou valores de Z_1, Z_2 e Z_3 .

$\sum_{j=1}^3 [\sum_{k=1}^3 g_k^j x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^j x_k x_{k'}] z_j$ representa o efeito na mudança nos níveis das variáveis de processo j sobre as propriedades lineares e não lineares dos componentes da mistura. g_k^j é a mudança no valor esperado da resposta para o componente k quando variamos uma unidade de Z_j , enquanto $g_{kk'}^j$ é a variação na medida das propriedades não-lineares dos componentes k e k' da mistura quando variamos uma unidade em Z_j e, finalmente,

$\sum_{j < j'}^3 \sum_{k=1}^3 [\sum_{k=1}^3 g_k^{jj'} x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^{jj'} x_k x_{k'}] z_j z_{j'}$ representa o efeito de interação das duas variáveis de processo sobre as propriedades lineares e não-lineares dos componentes da mistura.

A estimativa dos coeficientes “g(s)” do modelo são simples combinações lineares dos coeficientes estimados nos modelos de mistura.

$$g_k^0 = \sum_{j=1}^8 \frac{b_{k(j)}}{8}; \quad g_{kk'}^0 = \sum_{j=1}^8 \frac{b_{kk'(j)}}{8}; \quad kk' = 1, 2, 3 \quad k < k'$$

$$g_k^1 = \frac{1}{8} [b_{k(2)} + b_{k(4)} + b_{k(6)} + b_{k(8)} - b_{k(1)} - b_{k(3)} - b_{k(5)} - b_{k(7)}] \dots$$

$$g_{kk'}^2 = \frac{1}{8} [b_{kk'(3)} + b_{kk'(4)} + b_{kk'(7)} + b_{kk'(8)} - b_{kk'(1)} - b_{kk'(2)} - b_{kk'(5)} - b_{kk'(6)}] \dots$$

$$g_{kk'}^{23} = \frac{1}{8} [b_{kk'(1)} + b_{kk'(2)} + b_{kk'(7)} + b_{kk'(8)} - b_{kk'(3)} - b_{kk'(4)} - b_{kk'(5)} - b_{kk'(6)}]$$

As expressões de g_k^1 a $g_{kk'}^{23}$ são efeitos principais e de interação de segunda ordem das variáveis de processo, sobre cada um dos coeficientes dos modelos de mistura, em cada ponto do fatorial. Os números entre parênteses representam os ensaios do fatorial 2^3 .

Na análise dos dados para os quais o modelo de análise de variância é obtido, (Equação A.21), geralmente o interesse está centrado sobre comparações feitas entre as médias dos tratamentos “main-plot” assim como comparações feitas entre as médias dos tratamentos “sub-plot”. Estimativas das componentes das variâncias σ^2_R , σ^2_{RZ} e σ^2_e (Tabela A.3) são necessárias para fazer os testes de hipótese sobre comparações específicas entre as médias. Na estimativa das variâncias dos coeficientes do modelo de regressão ajustado (Equação A.24) devemos levar em consideração que as estimativas dos coeficientes do modelo ajustado são funções lineares dos valores médios das respostas no pontos do planejamento “Split-plot”. As variâncias dos valores médios das respostas são funções das componentes das variâncias (σ^2_R , σ^2_{RZ} e σ^2_e), associadas com o termo específico no modelo. Daí, as variâncias dos coeficientes estimados no modelo ajustado são também funções de σ^2_R , σ^2_{RZ} e σ^2_e . As fórmulas que serão apresentadas aqui, aplicam-se ao caso em que as variáveis de processo são o tratamento “main-plot” e as variáveis de mistura são o tratamento “sub-plot”. A estimativa das variâncias das médias e das diferenças entre as médias, envolvem combinações lineares dos quadrados médios para o erro “main-plot” e o erro “sub-plot”, (ver Tabela A.3). A Tabela A.4 mostra as variâncias das médias nas

variáveis de processo, nas variáveis de mistura e nas diferenças entre as médias, em função de σ^2_R , σ^2_{RZ} e σ^2_e .

TABELA A.4. Médias, diferenças entre as médias e suas variâncias.

Médias e Diferenças	Significado	Variância
$\bar{y}_{.jk}$	Média da k-ésima composição da mistura na j-ésima combinação da variável de processo.	$\frac{1}{r}(\sigma^2_R + \sigma^2_{RZ}\sigma^2_e)$
$\bar{y}_{.j}$	Resposta média na j-ésima combinação da variável de processo.	$\frac{1}{m}[m(\sigma^2_R + \sigma^2_{RZ}) + \sigma^2_e]$
$\bar{y}_{..j}$	Média da k-ésima composição da mistura.	$\frac{1}{rP}[P\sigma^2_R + \sigma^2_{RZ} + \sigma^2_e]$
$\bar{y}_{.jk} - \bar{y}_{.jk'}$	Diferença entre as composições médias da mistura k e k' na j-ésima combinação da variável de processo.	$\frac{2}{r}\sigma^2_e$
$\bar{y}_{.jk} - \bar{y}_{.j'k}$	Diferença entre as composições médias da mistura k nas j-ésima e j'-ésima combinações das variáveis de processo.	$\frac{2}{r}(\sigma^2_{RZ} + \sigma^2_e)$
$\bar{y}_{.jk} - \bar{y}_{.j'k'}$	Diferença entre a média da composição k da mistura na j-ésima combinação das variáveis de processo e a média da composição k'(k' ≠ k) na j'-ésima combinação das variáveis de processo.	$\frac{2}{r}(\sigma^2_{RZ} + \sigma^2_e)$
$\bar{y}_{..k} - \bar{y}_{..k'}$	Diferença entre as médias das composições da mistura k e k'.	$\frac{2}{rP}\sigma^2_e$
$\bar{y}_{.j} - \bar{y}_{.j'}$	Diferença entre as respostas médias nas combinações j e j' das variáveis de processo.	$\frac{2}{m}(m\sigma^2_{RZ} + \sigma^2_e)$

Quando combinamos as informações da Tabela A.4 e da Tabela A.3, obtemos:

$$\hat{\text{var}}(\bar{Y}_{.jk} - \bar{Y}_{.jk'}) = \frac{2QME}{r}$$

$$\hat{\text{var}}(\bar{Y}_{.jk} - \bar{Y}_{.j'k}) = \frac{2}{r}[QMRZ + (m-1)QME]$$

$$\hat{\text{var}}(\bar{Y}_{.jk} - \bar{Y}_{.j'k'}) = \frac{2}{rm}[QMRZ + (m-1)QME]$$

$$\hat{\text{var}}(\bar{Y}_{..k} - \bar{Y}_{..k'}) = \frac{2}{rp} \text{QME}$$

$$\hat{\text{var}}(\bar{Y}_{.j.} - \bar{Y}_{.j'.}) = \frac{2}{rm} \text{QMRZ}$$

As variâncias dos coeficientes estimados são obtidas da tabela ANOVA por meio das seguintes expressões:

$$\text{var}(g_k^0) = \frac{\text{QMR} + (m-1)\text{QME}}{rPm}, \quad \text{com } P(r-1)(m-1) \text{ graus de liberdade.}$$

$$\text{var}(g_k^i) = \frac{\text{QMRZ} + (m-1)\text{QME}}{rPm}, \quad i = 1, 2, 3, 12, 13, 23.$$

$$\text{com } v = \frac{[\text{QMRZ} + (m-1)\text{QME}]^2}{\frac{(\text{QMRZ})^2}{(P-1)(r-1)} + \frac{[(m-1)\text{QME}]^2}{(m-1)P(r-1)}} \text{ graus de liberdade.}$$

$$\text{var}(g_{kk}^0) = \text{var}(g_{kk}^i) = \frac{24\text{QME}}{Pr}, \quad \text{com } (m-1)(r-1)P \text{ graus de liberdade.}$$

Desta maneira é possível testar os coeficientes individualmente, por meio do teste t de STUDENT, quanto a influência destes nas propriedades da mistura. Tal estudo fornece uma estimativa da influência nas propriedades da mistura por variáveis que não fazem parte desta mistura.

Apêndice 3

Saída do Programa SAS

Modelo Combinado de Misturas
Modelo sem intercepto

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	0.00452626	0.00452626		
Z	7	1.73215414	0.24745059	439.10	0.0001
R*Z	7	0.00394479	0.00056354		
X	9	6.96644816	0.77404980	1980.90	0.0001
Z*X	63	1.36151929	0.02161142	55.31	0.0001
R*Z*X	72	0.02813445	0.00039076		
Total	159	10.09672736			

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: Y

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter = 0	Pr > T	Std Error of Estimate
X1	0.9108843199	23.94	0.0001	0.03805499
X2	0.1762913076	16.05	0.0001	0.01098321
X3	0.0505802469	4.63	0.0001	0.01092289
X1X2	0.4665711826	5.31	0.0001	0.08790284
X1X3	-.8935536206	-10.18	0.0001	0.08776392
X2X3	0.0446042271	0.93	0.3561	0.04814059
X1Z1	0.1393990553	3.66	0.0004	0.03805499
X1Z2	0.2781148248	7.31	0.0001	0.03805499
X1Z3	-.0468268877	-1.23	0.2210	0.03805499
X2Z1	-.0439881959	-4.01	0.0001	0.01098321
X2Z2	0.0452306593	4.12	0.0001	0.01098321

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter = 0	Pr > T	Std Error of Estimate
X2Z3	0.0019062171	0.18	0.8557	0.01098321
X3Z1	0.0323388173	2.96	0.0037	0.01092298
X3Z2	0.0188094493	1.72	0.0877	0.01092298
X3Z3	0.0139386068	1.28	0.2044	0.01092298
X1X2Z1	0.2660489820	3.03	0.0030	0.08790284
X1X2Z2	0.1609790994	1.83	0.0696	0.08790284
X1X2Z3	0.1640298611	1.87	0.0645	0.08790284
X1X3Z1	-.5131033498	-5.85	0.0001	0.08776392
X1X3Z2	-.2420054429	-2.76	0.0068	0.08776392
X1X3Z3	0.2327297694	2.65	0.0091	0.08776392
X2X3Z1	0.1877966963	3.90	0.0002	0.04814059
X2X3Z2	0.0017373101	0.04	0.9713	0.04814059
X2X3Z3	-.0380048197	-0.79	0.4314	0.04814059
X1Z1Z2	0.0540801384	1.42	0.1579	0.03805499
X1Z1Z3	-.0522342083	-1.37	0.1725	0.03805499
X1Z2Z3	-.0704580663	-1.85	0.0666	0.03805499
X2X1Z2	0.0075388801	0.69	0.4938	0.01098321
X2Z1Z3	0.0083211114	0.76	0.5402	0.01098321
X2Z2Z3	0.0069626705	0.63	0.5273	0.01098321
X3Z1Z2	0.0009597861	0.09	0.9301	0.01092289
X3Z1Z3	0.0036091967	0.33	0.7417	0.01092289
X3Z2Z3	0.0043062228	0.39	0.6941	0.01092298
X1X2Z1Z2	0.2102353958	2.39	0.0184	0.08790284
X1X2Z1Z3	0.2482556460	2.82	0.0056	0.08790284
X1X2Z2Z3	0.1793411458	2.04	0.0436	0.08790284
X1X3Z1Z2	-.0828368807	-0.94	0.3472	0.08776392
X1X3Z1Z3	0.1039325807	1.18	0.2387	0.08776392
X1X3Z2Z3	0.1612424943	1.84	0.0687	0.08776392
X2X3Z1Z2	-.0190627077	-0.40	0.6928	0.04814059
X2X3Z1Z3	0.0225268553	0.47	0.6407	0.04814059
X2X3Z2Z3	-.0356306474	-0.74	0.4607	0.04814059

Modelo Combinado de Misturas
Modelo sem intercepto

OBS	X1	X2	X3	Z1	Z2	Z3	Y	PRED.	RES.
1	0.6250	0.3750	0.0000	1	1	1	1.194	1.23134	-0.03734
2	0.6250	0.3750	0.0000	1	1	1	1.251	1.23134	0.01966
3	0.0000	1.0000	0.0000	1	1	1	0.203	0.20232	0.00068
4	0.0000	1.0000	0.0000	1	1	1	0.219	0.20232	0.01668
5	0.0000	0.0000	1.0000	1	1	1	0.111	0.12454	-0.01354
6	0.0000	0.0000	1.0000	1	1	1	0.120	0.12454	-0.00454
7	0.6250	0.0000	0.3750	1	1	1	0.462	0.51568	-0.05368

OBS	X1	X2	X3	Z1	Z2	Z3	Y	PRED.	RES.
8	0.6250	0.0000	0.3750	1	1	1	0.473	0.51568	-0.04268
9	0.3125	0.6875	0.0000	1	1	1	0.831	0.88240	-0.05140
9	0.3125	0.6875	0.0000	1	1	1	0.831	0.88240	-0.05140
10	0.3125	0.6875	0.0000	1	1	1	0.832	0.88240	-0.05040
11	0.0000	0.5000	0.5000	1	1	1	0.206	0.20442	0.00158
12	0.0000	0.5000	0.5000	1	1	1	0.214	0.20442	0.00958
13	0.3125	0.0000	0.6875	1	1	1	0.228	0.19964	0.02836
14	0.3125	0.0000	0.6875	1	1	1	0.250	0.19964	0.05036
15	0.3125	0.3438	0.3438	1	1	1	0.524	0.56043	-0.03643
16	0.3125	0.3438	0.3438	1	1	1	0.523	0.56043	-0.03743
17	0.4675	0.2663	0.2663	1	1	1	0.846	0.72323	0.12277
18	0.4675	0.2663	0.2663	1	1	1	0.751	0.72323	0.02777
19	0.1563	0.2113	0.6325	1	1	1	0.270	0.26706	0.00294
20	0.1563	0.2113	0.6325	1	1	1	0.263	0.26706	-0.00406
21	0.6250	0.3750	0.0000	-1	1	-1	0.828	0.77253	0.05547
22	0.6250	0.3750	0.0000	-1	1	-1	0.732	0.77253	-0.04053
23	0.0000	1.0000	0.0000	-1	1	-1	0.290	0.25737	0.03263
24	0.0000	1.0000	0.0000	-1	1	-1	0.273	0.25737	0.01563
25	0.0000	0.0000	1.0000	-1	1	-1	0.017	0.02146	-0.00446
26	0.0000	0.0000	1.0000	-1	1	-1	0.014	0.02146	-0.00746
27	0.6250	0.0000	0.3750	-1	1	-1	0.416	0.47645	-0.06045
28	0.6250	0.0000	0.3750	-1	1	-1	0.446	0.47645	-0.03045
29	0.3125	0.6875	0.0000	-1	1	-1	0.452	0.52043	-0.06843
30	0.3125	0.6875	0.0000	-1	1	-1	0.425	0.52043	-0.09543
31	0.0000	0.5000	0.5000	-1	1	-1	0.102	0.13284	-0.03085
32	0.0000	0.5000	0.5000	-1	1	-1	0.102	0.13284	-0.03085
33	0.3125	0.0000	0.6875	-1	1	-1	0.191	0.16793	0.02307
34	0.3125	0.0000	0.6875	-1	1	-1	0.170	0.16793	0.00207
35	0.3125	0.3438	0.3438	-1	1	-1	0.385	0.34108	0.04392
36	0.3125	0.3438	0.3438	-1	1	-1	0.347	0.34108	0.00592
37	0.4675	0.2663	0.2663	-1	1	-1	0.535	0.47191	0.06309
38	0.4675	0.2663	0.2663	-1	1	-1	0.480	0.47191	0.00809
39	0.1563	0.2113	0.6325	-1	1	-1	0.191	0.15005	0.04095
40	0.1563	0.2113	0.6325	-1	1	-1	0.177	0.15005	0.02695
41	0.6250	0.3750	0.0000	-1	-1	1	0.446	0.44981	-0.00381
42	0.6250	0.3750	0.0000	-1	-1	1	0.409	0.44981	-0.04081
43	0.0000	1.0000	0.0000	-1	-1	1	0.184	0.16926	0.01474
44	0.0000	1.0000	0.0000	-1	-1	1	0.154	0.16926	-0.01526
45	0.0000	0.0000	1.0000	-1	-1	1	0.010	0.00641	0.00359
46	0.0000	0.0000	1.0000	-1	-1	1	0.015	0.00641	0.00859
47	0.6250	0.0000	0.3750	-1	-1	1	0.333	0.33251	0.00049
48	0.6250	0.0000	0.3750	-1	-1	1	0.294	0.33251	-0.03851
49	0.3125	0.6875	0.0000	-1	-1	1	0.274	0.30819	-0.03419
50	0.3125	0.6875	0.0000	-1	-1	1	0.272	0.30819	-0.03619

OBS	X1	X2	X3	Z1	Z2	Z3	Y	PRED.	RES.
51	0.0000	0.5000	0.5000	-1	-1	1	0.039	0.04062	-0.00162
52	0.0000	0.5000	0.5000	-1	-1	1	0.056	0.04062	0.01538
53	0.3125	0.0000	0.6875	-1	-1	1	0.169	0.14468	0.02431
54	0.3125	0.0000	0.6875	-1	-1	1	0.161	0.14468	0.01632
55	0.3125	0.3438	0.3438	-1	-1	1	0.249	0.20412	0.04488
56	0.3125	0.3438	0.3438	-1	-1	1	0.233	0.20412	0.02888
57	0.4675	0.2663	0.2663	-1	-1	1	0.336	0.29148	0.04452
58	0.4675	0.2663	0.2663	-1	-1	1	0.287	0.29148	-0.00449
59	0.1563	0.2113	0.6325	-1	-1	1	0.042	0.08646	-0.04446
60	0.1563	0.2113	0.6325	-1	-1	1	0.053	0.08646	-0.03346
61	0.6250	0.3750	0.0000	1	-1	-1	0.545	0.52537	0.01963
62	0.6250	0.3750	0.0000	1	-1	-1	0.558	0.52537	0.03263
63	0.0000	1.0000	0.0000	1	-1	-1	0.096	0.07621	0.01979
64	0.0000	1.0000	0.0000	1	-1	-1	0.071	0.07621	-0.00522
65	0.0000	0.0000	1.0000	1	-1	-1	0.019	0.04991	-0.03091
66	0.0000	0.0000	1.0000	1	-1	-1	0.021	0.04991	-0.02891
67	0.6250	0.0000	0.3750	1	-1	-1	0.141	0.19073	-0.04973
68	0.6250	0.0000	0.3750	1	-1	-1	0.158	0.19073	-0.03273
69	0.3125	0.6875	0.0000	1	-1	-1	0.272	0.31334	-0.04134
70	0.3125	0.6875	0.0000	1	-1	-1	0.254	0.31334	-0.05934
71	0.0000	0.5000	0.5000	1	-1	-1	0.122	0.12045	0.00155
72	0.0000	0.5000	0.5000	1	-1	-1	0.118	0.12045	-0.00246
73	0.3125	0.0000	0.6875	1	-1	-1	0.051	-0.00246	0.05346
74	0.3125	0.0000	0.6875	1	-1	-1	0.059	-0.00246	0.06146
75	0.3125	0.3438	0.3438	1	-1	-1	0.153	0.18256	-0.02957
76	0.3125	0.3438	0.3438	1	-1	-1	0.186	0.18256	0.00344
77	0.4675	0.2663	0.2663	1	-1	-1	0.232	0.25842	-0.02642
78	0.4675	0.2663	0.2663	1	-1	-1	0.238	0.25842	-0.02042
79	0.1563	0.2113	0.6325	1	-1	-1	0.114	0.07501	0.03899
80	0.1563	0.2113	0.6325	1	-1	-1	0.120	0.07501	0.04499
81	0.6250	0.3750	0.0000	1	-1	1	0.699	0.60130	0.09770
82	0.6250	0.3750	0.0000	1	-1	1	0.654	0.60130	0.05270
83	0.0000	1.0000	0.0000	1	-1	1	0.111	0.08285	0.02815
84	0.0000	1.0000	0.0000	1	-1	1	0.114	0.08285	0.03115
85	0.0000	0.0000	1.0000	1	-1	1	0.060	0.07639	-0.01640
86	0.0000	0.0000	1.0000	1	-1	1	0.051	0.07639	-0.02539
87	0.6250	0.0000	0.3750	1	-1	1	0.205	0.24714	-0.04214
88	0.6250	0.0000	0.3750	1	-1	1	0.186	0.24714	-0.06114
89	0.3125	0.6875	0.0000	1	-1	1	0.352	0.40012	-0.04812
90	0.3125	0.6875	0.0000	1	-1	1	0.359	0.40012	-0.04112
91	0.0000	0.5000	0.5000	1	-1	1	0.144	0.14709	-0.00309
92	0.0000	0.5000	0.5000	1	-1	1	0.126	0.14709	-0.02109
93	0.3125	0.0000	0.6875	1	-1	1	0.122	0.07325	0.04875
94	0.3125	0.0000	0.6875	1	-1	1	0.100	0.07325	0.02675

OBS	X1	X2	X3	Z1	Z2	Z3	Y	PRED.	RES.
95	0.3125	0.3438	0.3438	1	-1	1	0.242	0.26859	-0.02659
96	0.3125	0.3438	0.3438	1	-1	1	0.213	0.26859	-0.05559
97	0.4675	0.2663	0.2663	1	-1	1	0.369	0.34503	0.02397
98	0.4675	0.2663	0.2663	1	-1	1	0.370	0.34503	0.02497
99	0.1563	0.2113	0.6325	1	-1	1	0.178	0.13968	0.03832
100	0.1563	0.2113	0.6325	1	-1	1	0.159	0.13968	0.01932
101	0.6250	0.3750	0.0000	-1	1	1	0.810	0.73625	0.07375
102	0.6250	0.3750	0.0000	-1	1	1	0.777	0.73625	0.04075
103	0.0000	1.0000	0.0000	-1	1	1	0.279	.025857	0.02043
104	0.0000	1.0000	0.0000	-1	1	1	0.288	0.25857	0.02943
105	0.0000	0.0000	1.0000	-1	1	1	0.054	0.05073	0.00327
106	0.0000	0.0000	1.0000	-1	1	1	0.046	0.05073	-0.00473
107	0.6250	0.0000	0.3750	-1	1	1	0.507	0.54207	-0.03507
108	0.6250	0.0000	0.3750	-1	1	1	0.498	0.54207	-0.04407
109	0.3125	0.6875	0.0000	-1	1	1	0.474	0.52147	-0.04747
110	0.3125	0.6875	0.0000	-1	1	1	0.486	0.52147	-0.03547
111	0.0000	0.5000	0.5000	-1	1	1	0.115	0.10001	0.01499
112	0.0000	0.5000	0.5000	-1	1	1	0.077	0.10001	-0.02301
113	0.3125	0.0000	0.6875	-1	1	1	0.277	0.27203	0.00497
114	0.3125	0.0000	0.6875	-1	1	1	0.323	0.27203	0.05097
115	0.3125	0.3438	0.3438	-1	1	1	0.409	0.37093	0.03807
116	0.3125	0.3438	0.3438	-1	1	1	0.370	0.37093	-0.00093
117	0.4675	0.2663	0.2663	-1	1	1	0.548	0.50146	0.04654
118	0.4675	0.2663	0.2663	-1	1	1	0.492	0.50146	-0.00946
119	0.1563	0.2113	0.6325	-1	1	1	0.192	0.18641	0.00559
120	0.1563	0.2113	0.6325	-1	1	1	0.109	0.18641	-0.07741
121	0.6250	0.3750	0.0000	-1	-1	-1	0.550	0.48852	0.06148
122	0.6250	0.3750	0.0000	-1	-1	-1	0.534	0.48852	0.04548
123	0.0000	1.0000	0.0000	-1	-1	-1	0.227	0.19591	0.03109
124	0.0000	1.0000	0.0000	-1	-1	-1	0.228	0.19591	0.03209
125	0.0000	0.0000	1.0000	-1	-1	-1	0.000	-0.00563	0.00563
126	0.0000	0.0000	1.0000	-1	-1	-1	0.000	-0.00563	0.00563
127	0.6250	0.0000	0.3750	-1	-1	-1	0.199	0.24837	-0.04937
128	0.6250	0.0000	0.3750	-1	-1	-1	0.213	0.24837	-0.03537
129	0.3125	0.6875	0.0000	-1	-1	-1	0.337	0.39235	-0.05535
130	0.3125	0.6875	0.0000	-1	-1	-1	0.340	0.39235	-0.05235
131	0.0000	0.5000	0.5000	-1	-1	-1	0.030	0.06037	-0.03037
132	0.0000	0.5000	0.5000	-1	-1	-1	0.059	0.06037	-0.00137
133	0.3125	0.0000	0.6875	-1	-1	-1	0.118	0.10293	0.01507
134	0.3125	0.0000	0.6875	-1	-1	-1	0.115	0.10293	0.01207
135	0.3125	0.3438	0.3438	-1	-1	-1	0.269	0.23121	0.03778
136	0.3125	0.3438	0.3438	-1	-1	-1	0.251	0.23121	0.01979
137	0.4675	0.2663	0.2663	-1	-1	-1	0.350	0.30167	0.04833
138	0.4675	0.2663	0.2663	-1	-1	-1	0.328	0.30167	0.02633

OBS	X1	X2	X3	Z1	Z2	Z3	Y	PRED.	RES.
139	0.1563	0.2113	0.6325	-1	-1	-1	0.059	0.09124	-0.03224
140	0.1563	0.2113	0.6325	-1	-1	-1	0.058	0.09124	-0.03324
141	0.6250	0.3750	0.0000	1	1	-1	1.230	1.15298	0.07702
142	0.6250	0.3750	0.0000	1	1	-1	1.233	1.15298	0.08002
143	0.0000	1.0000	0.0000	1	1	-1	0.183	0.16783	0.01517
144	0.0000	1.0000	0.0000	1	1	-1	0.193	0.16783	0.02517
145	0.0000	0.0000	1.0000	1	1	-1	0.052	0.08083	-0.02884
146	0.0000	0.0000	1.0000	1	1	-1	0.049	0.08083	-0.03184
147	0.6250	0.0000	0.3750	1	1	-1	0.429	0.47779	-0.04879
148	0.6250	0.0000	0.3750	1	1	-1	0.416	0.47779	-0.06179
149	0.3125	0.6875	0.0000	1	1	-1	0.702	0.71043	-0.00843
150	0.3125	0.6875	0.0000	1	1	-1	0.663	0.71043	-0.04743
151	0.0000	0.5000	0.5000	1	1	-1	0.193	0.19088	0.00212
152	0.0000	0.5000	0.5000	1	1	-1	0.211	0.19088	0.02012
153	0.3125	0.0000	0.6875	1	1	-1	0.141	0.06160	0.07940
154	0.3125	0.0000	0.6875	1	1	-1	0.114	0.06160	0.05240
155	0.3125	0.3438	0.3438	1	1	-1	0.349	0.41746	-0.06846
156	0.3125	0.3438	0.3438	1	1	-1	0.338	0.41746	-0.07946
157	0.4675	0.2663	0.2663	1	1	-1	0.662	0.59687	0.06513
158	0.4675	0.2663	0.2663	1	1	-1	0.574	0.59687	-0.02287
159	0.1563	0.2113	0.6325	1	1	-1	0.182	0.16126	0.02074
160	0.1563	0.2113	0.6325	1	1	-1	0.173	0.16126	0.01174