

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALGUNS
POLUENTES HALOGENADOS POUCO VOLÁTEIS EM ÁGUA

Dissertação de Mestrado

Eduardo Carasek da Rocha 5821

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente t

Campinas, 1994



ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE,
DEFENDIDA POR **EDUARDO CARASEK DA ROCHA**, E APROVADA PELA
COMISSÃO JULGADORA

Campinas, 04 de Março de 1994



Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Roy E. Bruns pelos programas quimiométricos cedidos e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

À Profa. Dra. Isabel C.S.F. Jardim, à Prof. Dra. Maria Isabel M.S. Bueno, à Profa. Dra. Carol H. Collins e ao Prof. Dr. Kenneth E. Collins, pelo apoio e amizade.

A todos do grupo de pesquisa no qual trabalho, em especial ao Prof. Fábio Augusto, pela convivência, solidariedade e amizade construída durante a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Laura Nunes Miranda que a sua maneira sempre esteve ao meu lado durante a realização deste trabalho.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente, pela amizade, exemplo profissional, apoio e incentivo durante esses anos.

Às pessoas mais importantes da
minha vida, minha esposa Marjorie
e meus pais Pedro e Olga.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	ii
Dedicatória.....	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras e Tabelas.....	vi
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
I.Introdução.....	01
II.Análise Química Quantitativa.....	04
II.1 Etapas de um procedimento analítico.....	04
II.2 - Detector por Captura de Elétrons.....	06
III - Operacionalização do Cromatógrafo Gasoso Equipado com Detector por Captura de Elétrons (DCE).....	09
IV - Otimização da sensibilidade do DCE em função da temperatura e vazão de gás make-up.....	13
IV.1 - Otimização de respostas de sistemas químicos em função de suas variáveis.....	13
IV.2 - Otimização da sensibilidade do DCE para cada composto.....	14
IV.2.1 - Planejamento Fatorial Completo 2 ²	15
IV.2.1.1 - Cálculo dos Efeitos.....	17
IV.2.1.2 - Interpretação dos resultados.....	20
IV.2.1.3 - Tratamento Estatístico.....	22
IV.2.1.4 - Conclusões.....	23
IV.2.2 - Simplex Sequencial Modificado.....	23
IV.2.2.1 - Resultados e conclusões.....	24
IV.2.3 - Metodologia de Superfície de Resposta.....	24
IV.2.3.1 - Planejamento Experimental.....	25
IV.2.3.2 - Cálculo dos coeficientes da regressão quadrática e valores das variáveis que fornecem a melhor sensibilidade para cada composto.....	28
IV.2.3.3. - Interpretação dos resultados.....	29
IV.2.3.4 - Tratamento Estatístico.....	29
IV.2.4 - Avaliação da otimização da sensibilidade do DCE para cada composto através do Fator de Resposta.....	31
IV.2.5 - Otimização da detecção do DCE para a mistura dos compostos.....	33

IV.2.5.1 - A função matemática.....	34
IV.2.5.2 - Uso das áreas cromatográficas.....	34
IV.2.5.3 - Uso do Fator de Resposta (coeficiente angular).....	35
V - Utilização da fração de área do início ao máximo de detecção como um novo parâmetro de cálculo de área.....	38
V.1 - Métodos de quantificação de picos cromatográficos.....	38
V.1.1 - Quantificação manual de picos cromatográficos.....	38
V.1.2 - Métodos computacionais automáticos para cálculo de picos cromatográficos.....	39
V.2 - O uso da área compreendida entre o início e o máximo de detecção para quantificação de picos cromatográficos.....	40
V.2.1 - Comparação entre a SMA e o método convencional de cálculo de área.....	41
V.2.2 - Interpretação dos resultados.....	61
V.2.3 - Tratamento Estatístico.....	64
VI - Modo de preparação das soluções para a análise quantitativa.....	69
VII - Pré-concentração dos pesticidas.....	72
VIII - Conclusões.....	74
Referências Bibliográficas.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Nota: Por conveniência alguns dos títulos estão modificados

Figuras:

III.1 - Curva de calibração para a conversão de pressão em vazão de gás make-up.....	09
III.2 - Curva de calibração de variação de voltagem versus temperatura.....	10
III.3 - Curva de calibração de solução de Bromofórmio obtido com o adaptador construído na oficina mecânica do IQ.....	11
III.4 - Curva de calibração de solução de Bromofórmio obtida com o uso do adaptador tipo T.....	12
IV.1 - Fluxograma da sequência utilizada para o estudo da otimização do DCE.....	14
IV.2 - Estrutura dos pesticidas utilizados para a otimização.....	15
IV.3 - Interpretação dos resultados do estudo Fatorial Completo para cada composto.....	21
IV.4 - Curvas de calibração nas condições otimizadas e não otimizadas.....	32
V.1 - Cromatograma dos pesticidas obtidos a 15 μ s.....	42
V.2 - Curvas de calibração e de fator de resposta para Aldrin e Dieldrin.....	44
V.3 - Curvas de calibração e de fator de resposta para HCB e Heptaclor.....	45
V.4 - Curvas de calibração e de fator de resposta para HCB e Heptaclor.....	49
V.5 - Curvas de calibração e de fator de resposta para Dieldrin.....	50
V.6 - Curvas de calibração e de fator de resposta para HCB e Heptaclor.....	51
V.7 - Curvas de calibração e de fator de resposta para Dieldrin.....	52
V.8 - Curvas de calibração e de fator de resposta para 1-octanol e 1-nonanol.....	54
V.9 - Curvas de calibração e de fator de resposta para HCB e Heptaclor.....	58
V.10 - Curvas de calibração e de fator de resposta para Dieldrin.....	59
V.11 - Curvas de calibração e de fator de resposta para HCB e Heptaclor.....	60
V.12 - Curvas de calibração e de fator de resposta para Dieldrin.....	61
VI.1 - Comparação entre duas curvas de calibração do Dieldrin, cujas soluções foram preparadas de dois modos diferentes.....	70
VI.2 - Comparação entre duas curvas de calibração do HCB, cujas soluções foram preparadas de dois modos diferentes.....	71
VII.1 - Micro-extrator desenvolvido para enriquecimento dos pesticidas.....	72

Tabelas:

III.1 - Valores de vazão da coluna com o aumento da temperatura do forno.....	10
IV.1 - Planejamento fatorial completo 2^2 para HCB.....	16
IV.2 - Planejamento fatorial completo 2^2 para Heptaclor.....	16
IV.3 - Planejamento fatorial completo 2^2 para Aldrin.....	17
IV.4 - Planejamento fatorial completo 2^2 para Dieldrin.....	17
IV.5- Resultados do estudo do Fatorial Completo 2^2	19
IV.6 - Condições otimizadas de temperatura e pressão obtidas com o Simplex.....	24
IV.7 - Planejamento de Superfície de Resposta para HCB.....	26
IV.8 - Planejamento de Superfície de Resposta para Aldrin.....	26
IV.9 - Planejamento de Superfície de Resposta para Dieldrin.....	27
IV.10 - Planejamento de Superfície de Resposta para Heptaclor.....	27
IV.11 - Coeficientes da regressão quadrática obtido pelo programa Trend.....	28
IV.12 - Valores de temperatura e pressão obtidos para a condição otimizada.....	29
IV.13 - Significância das regressões segundo teste F.....	30
IV.14 - Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.....	31
IV.15 - Resultado da comparação entre as regressões das curvas de calibração realizadas em condições experimentais otimizadas e não otimizadas.....	33
IV.16 - Coeficientes da regressão quadrática obtidos para a otimização da sensibilidade do DCE para a mistura dos compostos.....	35
IV.17 - Valores experimentais obtidos para a otimização da mistura a partir dos Fatores de Resposta	36
IV.18 - Coeficientes da regressão quadrática e valores estatísticos para a otimização da mistura dos pesticidas.....	36
V.1 - Valores de assimetria dos pesticidas.....	41
V.2 - Dados das curvas de calibração de Aldrin, HCB, Dieldrin e Heptaclor.....	43
V.3 - Dados das curvas de calibração do Dieldrin.....	46
V.4 - Dados das curvas de calibração d HCB.....	47
V.5 - Dados das curvas de calibração do Heptaclor.....	48
V.6 - Dados das curvas de calibração dos álcoois.....	53
V.7 - Dados das curvas de calibração do Dieldrin quando misturado aos demais pesticidas..	55
V.8 - Dados das curvas de calibração do HCB quando misturado aos demais pesticidas.....	56
V.9 - Dados das curvas de calibração do Heptaclor quando misturado	

aos demais pesticidas.....	57
V.10 - Coeficientes angulares, lineares e de correlação obtidos pelo método de padronização externo para cada pesticida e para os álcoois.....	62
V.11 - Coeficientes angulares, lineares e de correlação obtidos pelo método de padronização externo para cada pesticida nas misturas.....	62
V.12 - Coeficientes angulares, lineares e de correlação obtidos pelo método de padronização interno para cada pesticida nas misturas.....	62
V.13 - Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.....	65
V.14 - Análise de variância para as curvas de calibração dos pesticidas e dos álcoois.....	65
V.15 - Análise de variância para as curvas de calibração dos pesticidas analisados conjuntamente, utilizando método do padrão externo.....	66
V.16 - Análise de variância para as curvas de calibração dos pesticidas analisados conjuntamente, utilizando método do padrão interno.....	67
VI.1 - Tabela comparativa entre os modos de diluição à volume fixo (15µs).....	69
VI.2 - Tabela comparativa entre os modos de diluição à volume fixo (50µs).....	70
VII.1 - Resultado da recuperação para Dieldrin.....	73

RESUMO

Foram determinados, através de técnicas quimiométricas, valores das variáveis Temperatura do detector e Vazão de Gás, para otimização da sensibilidade de um detector por captura de elétrons (DCE) para alguns pesticidas, Aldrin, Dieldrin, Hexaclorobenzeno e Heptaclor, analisados individualmente e misturados. As técnicas quimiométricas foram utilizadas em sequência. Com o Fatorial Completo 2^2 foi estabelecida a tendência da influência das duas variáveis sobre a sensibilidade e estas informações foram utilizadas no estudo com o Simplex Sequencial. O Simplex Sequencial gerou valores próximos daqueles que fornecem a máxima sensibilidade do DCE; estes valores foram utilizados no estudo com a técnica de Superfície de Resposta, para a definição de Temperatura e da Vazão de Gás que fornecem a melhor resposta do detector por pesticida. Utilizando os resultados do estudo da otimização para cada pesticida, foram estabelecidos, por meio de Superfície de Resposta, valores de Temperatura e Vazão de Gás que permitem a melhor sensibilidade do DCE para a mistura desses compostos.

Para quantificação dos picos cromatográficos assimétricos obtidos nos estudos foi testada uma modificação da metodologia computacional convencional de cálculo de áreas de picos. Convencionalmente as áreas são obtidas somando-se os sinais compreendidos entre o início e o fim do pico. Na modificação, a integração dos sinais é feita entre o início e o máximo do pico. Os dois métodos foram comparados, concluindo-se que a modificação melhora as características de curvas de calibração para vários compostos.

Também foi estudado qual o melhor modo de preparação de soluções padrão para a construção de curvas de calibração. O método adotado foi o de adicionar volumes iguais de solução e de solvente. Os modos de preparação de soluções foram, diluir as soluções pela adição de solvente a uma mesma solução estoque, e diluir as soluções a partir da solução anterior, isto é, por diluição sucessiva. O primeiro modo de preparo de soluções foi adotado.

Para a amostragem com pré-concentração dos pesticidas em amostras de águas e solos foi construído um micro-extrator de vidro, que está sendo testado.

ABSTRACT

Effects of the detector body temperature and of the make-up gas flow into the detector upon the intensity of the signals obtained with an Electron Capture Detector (ECD) were studied using four chlorinated pesticides as analytes. The purpose of this study was the optimization of the ECD sensitivity for its use in the analysis of pesticides in soil and water samples. Three chemometric programs were used for data treatment of the values of temperature and make-up gas flow that optimized the ECD sensitivity. The results obtained with a Complete Factorial 2^2 program were a first approximation to the optimum values which were then used as data input to a Sequential Simplex program to generate a further approximation. This second, and better, approximation was, in its turn, used as data input to a Response Surface program to yield the values of temperature and make-up gas flow that produced the best sensitivity of the ECD for each pesticide. The same methodology was applied to the data obtained from the chromatographic analysis of mixtures of the four pesticides.

A modification of the conventional computational method of peak area calculation by summation of digitized slices of the peak area was also studied. In this modification, called SMA, signifying from start to maximum area, the slices are summed from the peak start to the peak maximum, instead of from the beginning of the peak to the peak end sum of the conventional method. Both methods were applied to asymmetric peaks obtained with the ECD and with a flame ionization detector. Comparison of the calibration curves calculated using the two types of areas suggests that the SMA method results in more reliable calibration curves.

Two methods of preparation of standard solutions using small quantities of solute and solvent were also compared. Both methods are based on the assumption that if a dilution is made by mixing equal volumes of solvent and stock solution the error due to volume measurement is negligible or very small. The method of dilution by several additions of a fixed volume of solvent to this same volume of stock solution was shown to be adequate for our analytical purposes as it resulted in very reliable calibration curves.

The use of a micro-extractor based on simultaneous distillation and solvent extraction for the pre-concentration of the pesticides was also initiated and will be continued in the near future.

I. Introdução

Minimizar erros em uma análise química quantitativa demanda planejar as etapas do procedimento analítico para que elas sejam executadas controladamente. Nisto está envolvido balancear adequadamente os conhecimentos das técnicas analíticas, as informações disponíveis sobre a amostra e os princípios químicos que permitem adequar as técnicas à amostra. A sistemática de trabalho deve ser tal que permita detectar e corrigir alguns erros - os sistemáticos. Também é parte dela expressar a imponderabilidade dos (não-detectáveis) erros aleatórios por meio de alguma estatística. Portanto, aos conhecimentos inerentes ao seu trabalho experimental, o Químico deve acrescentar o dos métodos estatísticos adequados para a expressão dos seus resultados.

Atualmente os equipamentos eletrônicos com recursos de computação são muito utilizados nos procedimentos químico analíticos. Com o uso destes equipamentos avolumam-se os problemas experimentais, tanto os que podem ser corrigidos quanto os que devem ser estatisticamente contornados. Isto é decorrência do processamento que a amostra sofre no equipamento, onde um detector gera os sinais e estes passam pelos processamentos eletrônicos e pelo computador, que os transformam em medidas, as quais, também processadas, originam os resultados finais. Estes resultados incorporam alterações devidas à instrumentação. Mesmo que existissem sinais puros, produzidos num detector ideal, durante o seu "trajeto" para gerar os resultados estes sinais sofreriam alterações, por peculiaridades de projetos e de componentes eletrônicos, assim como de algoritmos e de programação. O equipamento pode gerar erros aleatórios (ruído, por exemplo) e sistemáticos (não-linearidade de um detector ou de um amplificador de sinais). Uma grande dificuldade é que os erros incorporados não podem ser discriminados do sinal pelo próprio equipamento que os provocou. Outra é que os erros podem ser devidos a fontes que não sejam independentes entre si. Mais uma é que eles podem ser aleatórios e sistemáticos. Isto é complicante quanto aos tratamentos estatísticos necessários para se obter um resultado expressado com o seu grau de confiabilidade conveniente.

No desenvolvimento deste trabalho foi necessário o envolvimento, em algum grau, com os problemas citados no parágrafo anterior, porque o nosso propósito foi o de estudar a quantificação de compostos organoalogenados de interesse ambiental, geralmente presentes a nível de traços, por Cromatografia Gasosa, utilizando um cromatógrafo com um Detector por Captura de Elétrons (DCE) e digitalização, aquisição e tratamento dos dados por microcomputador.

A análise quantitativa por Cromatografia Gasosa de compostos organoalogenados, voláteis e volatilizáveis, em amostras brutas como águas e solos, requer procedimentos de pré-concentração e separação para evitar interferências oriundas da complexidade das matrizes. No caso dos volatilizáveis estes procedimentos envolvem extração com solventes, cujos extratos - a amostra para cromatografia - podem ter os organoalogenados misturados com outros tipos de compostos. Estas amostras podem ser complexas ao ponto de não se conseguir uma resolução cromatográfica que

discrimine os picos dos halogenados dos outros componentes. A consequência são picos parcial ou totalmente mascarados que dificilmente prestam-se para análise quantitativa de traços. O problema de falta de resolução cromatográfica pode ser solucionado com um detector seletivo que seja "cego" aos componentes contaminantes e sensível àqueles que constituem o interesse de análise. O princípio analítico é o de que a resolução cromatográfica seja complementada pela seletividade do detector, de modo que a análise possa ser realizada com uma amostra que passou pelo menor número de etapas (fontes de erros) no procedimento do seu preparo. Na análise de organoalogenados a nível de traços o detector mais utilizado é o Detector por Captura de Elétrons, porque ele apresenta altas sensibilidades para halogenados e sensibilidades muito baixas para praticamente todas as demais classes de compostos. Em contrapartida, como é comum com os detectores altamente seletivos e sensíveis, o DCE é um detector difícil de operar.

Estes compromissos analíticos entre as características gerais esperadas para amostras, as limitações que se pode ter com as resoluções cromatográficas dos seus componentes, a necessidade de picos cromatográficos bem definidos para fazer análise a nível de traços e a disponibilidade de um DCE determinou uma das etapas deste trabalho: a de adaptação do DCE para uso com colunas capilares (originalmente projetado para uso com colunas empacotadas) e estudar o seu desempenho com compostos organoalogenados.

Os estudos do DCE evoluíram dos trabalhos de adaptações mecânicas e de testes que evidenciaram problemas com formatos de picos, que trariam dificuldades para as análises quantitativas. Portanto, foi necessário estudar como otimizar o detector pelo controle das suas condições de operação. Especificamente, foi estudado como a temperatura do detector e a vazão de gás na sua cela afetam os seus sinais. Este é um problema que envolve **duas variáveis controláveis pelo operador** e uma **resposta** que é dependente destas duas variáveis. Aqui, o termo resposta é deliberadamente vago, porque se refere a três características ligadas com as necessidades de análise quantitativa: os formatos dos picos cromatográficos e a maximização da sensibilidade e da linearidade de resposta do DCE. O tratamento dos dados originados por mudanças das duas variáveis, objetivando otimizar a operação do detector constituiu uma outra etapa (paralela) de trabalho: o uso de estatísticas de análise multi-dimensional. Este tipo de análise foi necessário porque não existia qualquer razão que justificasse supor que a temperatura e a vazão são variáveis independentes entre si, ou que elas atuem independentemente sobre a resposta. As observações sobre as três características, genericamente denominadas acima como resposta, aliadas à possibilidade de trabalhar com um software de aquisição e tratamento de dados que pode ser modificado, resultou em uma terceira etapa do trabalho, relacionada com o método computacional de cálculo de áreas de picos cromatográficos.

As dificuldades para se estabelecer a área de um pico cromatográfico são dependentes da sua assimetria, isto é de quanto ele se afasta de um perfil gaussiano. Nos métodos manuais, triangular um

pico é desenhar o triângulo que melhor o represente e admitir que a área deste triângulo aproxima-se adequadamente da do pico. É claro que triangular um pico assimétrico exige mais medidas e cálculos do que a triangular um pico simétrico, de forma que, para minimizar erros nas áreas, é importante trabalhar as condições cromatográficas para se obterem picos o mais próximos possível de simétricos. Os cálculos de áreas por métodos computacionais também dependem da simetria do pico, porque são baseados em algum tipo de algoritmo que descreva numericamente o perfil do pico e o transforma, por um processo de integração matemática, num valor proporcional à área. Como é complexo determinar funções matemáticas que descrevam picos assimétricos, o método mais utilizado para os cálculos de áreas é baseado num processo bem mais simples: somar os valores dos sinais digitalizados (discretos) compreendidos entre o início, o fim e a linha de base do pico. Para estabelecer onde localizam-se o início, o máximo e o fim, é acompanhada a tendência da primeira derivada do sinal: quando elas mantêm uma tendência de aumentar há indício do início; o máximo está na região em que o sinal da derivada passa de positivo para negativo; o fim está na região em que os valores absolutos das derivadas negativas tornam-se suficientemente baixos. Este método também depende da simetria do pico, principalmente para estabelecimento do seu fim, porque na cauda de um pico os sinais variam mais suavemente do que no seu início e quanto maior esta suavidade, maior a dificuldade de definir o valor da derivada que determina o retorno à linha de base. A esta dificuldade somam-se outras, como nível de ruído e o método de atenuá-lo e a própria definição do posicionamento da linha de base.

A terceira etapa deste trabalho foi definida a partir de um conjunto de informações geradas no nosso laboratório. O nosso programa de tratamento de dados cromatográficos usa o método de soma dos sinais discretos e a detecção de início, máximo e fim de picos pela primeira derivada. Resultados obtidos em outro estudo, com picos simulados, sugeriam fortemente que curvas de calibração podem ser melhoradas se, ao invés de usar a área compreendida entre o início e o fim dos picos cromatográficos, fossem usadas as áreas entre o início e o máximo do pico. Por outro lado, em todos os estudos de otimização da resposta do DCE eram obtidos picos assimétricos. Por isto, foi decidido comparar as curvas de calibração originadas com as áreas totais dos picos com curvas obtidas com as áreas "de início a máximo". Os resultados experimentais, coerentes com os do estudo simulado, permitiram recalcular as condições de otimização do DCE a partir do método de cálculo de áreas que não usa os sinais da região pós-máximo do pico, ou seja os que refletem a sua assimetria.

Deste modo, a procura de melhores valores das variáveis que afetam o DCE e o uso de um método não convencional de cálculo de área de picos assimétricos, bem como testes para determinar qual o melhor modo de preparo de soluções e as modificações do equipamento cromatográfico foram realizados com o objetivo de corrigir problemas experimentais encontrados pelo Químico no desenvolvimento de uma análise quantitativa.

II. Análise Química Quantitativa

II.1 Etapas de um procedimento analítico

A determinação de poluentes halogenados pouco voláteis em águas ou solos é feita segundo um determinado procedimento de análise, o qual inclui várias etapas que devem ser criteriosamente estudadas para contornar problemas de falta de exatidão e precisão. Neste trabalho foi dado ênfase às etapas de quantificação e pré-concentração dos componentes de interesse.

Uma etapa crítica de um processo analítico é a de amostragem, pois, se ela não for conduzida corretamente, o resultado analítico será duvidoso.⁽¹⁾ A amostra a ser analisada deve ser uma parte representativa do total, isto é, uma fração selecionada para possuir as características essenciais deste "total".⁽¹⁾ Assim, ela deve ser amostrada segundo critérios corretos (que, por muitas razões, no futuro podem ser substituídos), por um amostrador devidamente treinado e monitorado.⁽²⁾ No caso da água, dentre os diversos cuidados a serem observados temos: perdas de constituintes voláteis durante agitação ou na presença de grande quantidade de ar, possibilidade de degradação por bactérias ou modificação química (oxidação, hidrólise) e presença de impurezas orgânicas como uma segunda fase não uniforme distribuída na água.⁽³⁾ O tipo de material que constitui o frasco de amostragem é outro fator importante a ser considerado nesta etapa. No caso de análise de pesticidas deve-se evitar o uso de frascos plásticos, pois os pesticidas são adsorvidos pela parede do frasco.⁽³⁾

Na análise quantitativa de componentes de águas brutas ou tratadas é praticamente inevitável uma etapa de pré-enriquecimento, pois comumente as amostras de água são muito complexas, muito diluídas e incompatíveis com o sistema cromatográfico, exatamente por conterem água.⁽⁴⁾ Independente do tamanho, natureza ou composição da amostra original, na pré-concentração ela é processada para que as substâncias de interesse analítico sejam concentradas numa fração que facilite a separação e a detecção pelo equipamento cromatográfico. Uma grande quantidade de métodos físicos, químicos e cromatográficos tem sido empregados para propósitos de pré-concentração. A separação e a concentração dos compostos da matriz original para outra matriz podem ser obtidos por processos estáticos ou dinâmicos. Nos processos estáticos mantém-se, por um determinado tempo, um volume fixo da amostra em contato direto com a nova matriz, até que o equilíbrio de distribuição seja alcançado. No processo dinâmico, ou a fase da amostra, ou a do extrator, é passada continuamente através da segunda fase, de forma que não existe equilíbrio entre elas.⁽⁵⁾ A quantidade de material a ser coletado dependerá do grau de enriquecimento necessário para a marcha analítica.

Após uma pré-concentração adequada, em que seja mantida a representatividade da amostra, a próxima etapa do processo analítico é a análise cromatográfica, cuja finalidade básica é a quantificação dos compostos. Ela também pode auxiliar na tarefa de identificá-los.

A identificação tentativa dos componentes é realizada durante a eluição, através de padrões ou por detectores especiais. A determinação qualitativa através de padrões pode ser por método direto ou indireto. No método direto injeta-se em uma mesma corrida cromatográfica o padrão e o componente desconhecido e no método indireto compara-se o tempo de retenção do padrão com o tempo de retenção do componente desconhecido.

O parâmetro quantitativo em cromatografia gasosa é a área do pico cromatográfico, que deve ser proporcional à quantidade do material.⁽⁵⁾ No entanto a relação entre área e quantidade é sujeita a erros, que refletem-se no formato do pico cromatográfico. São várias as fontes de erros. Na etapa de separação dos componentes da amostra podem ocorrer erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária, ou no suporte; resposta do detector afetada por suas condições de operação; quantidade de amostra injetada que pode estar fora da faixa linear do detector.⁽⁶⁾ Em decorrência destes, entre outros erros, os picos cromatográficos registrados podem apresentar formato simétrico ou assimétrico, e suas áreas podem não representar a quantidade de compostos injetada para análise.

Os problemas com picos assimétricos podem refletir severamente nos resultados quantitativos. Picos simétricos são ideais para cálculo de área e portanto estão pouco sujeitos a erros. Este não é o caso com os assimétricos. Evitar as assimetrias pode ser difícil ou impossível, porque ela depende de fatores extra e intra-coluna. Numa coluna cromatográfica ideal, o processo de separação cromatográfica de uma amostra infinitamente pequena (ideal) geraria picos gaussianos. Isto não existe na prática, de um lado porque a massa de amostra introduzida na coluna não é infinitesimal e de outro porque os fenômenos de partição e adsorção responsáveis pela separação não são termodinamicamente ideais.⁽⁷⁾ Alguns dos efeitos extra-coluna, que contribuem para a assimetria de picos, são: tempos de resposta de um detector e de amplificadores e registradores ^(7,8), o modo de injeção da amostra, os volumes mortos em conectores, detectores.⁽⁹⁾

Portanto, é necessário considerar as técnicas usadas para a determinação do tamanho de um pico cromatográfico e conseqüentemente, do número que representa quanto de um componente existe na amostra. Dois tipos básicos de medidas podem ser usado para a determinação da grandeza de um pico cromatográfico. A primeira é a altura do pico, a outra é a área do pico, cuja medida pode ser feita através de uma variedade de métodos.

Determinado o tamanho do pico através do melhor método de cálculo, a última etapa da análise quantitativa é relacionar o tamanho do pico com a concentração de um determinado componente na amostra. Esta relação pode ser feita por meio de curvas de calibração, as quais envolvem quantidades conhecidas cromatografadas de materiais a serem analisados e as medidas de seus tamanhos de picos.⁽⁵⁾ Dentre as diversas técnicas, os métodos de padronização externa e de padronização interna são muito utilizados para a construção de curvas de calibração. A técnica de padronização externa envolve a preparação de padrões nos mesmos níveis de concentração e na

mesma matriz que os componentes a serem determinados.⁽⁵⁾ Estes padrões são cromatografados sob condições idênticas às das amostras e a relação entre os tamanhos dos picos e as concentrações dos componentes é estabelecida. Os componentes da amostra são quantificados gráfica ou analiticamente com as relações obtidas para os padrões. As curvas de calibração são normalmente linhas retas e devem passar através da origem.⁽⁵⁾ Problemas cromatográficos como adsorção e/ou degradação de amostra são geralmente a causa de falhas da curva de calibração extrapolar através da origem.⁽⁵⁾ Na técnica de padronização interna são feitas curvas de calibração da razão de área e razão de massa entre o analito e o padrão interno. Este gráfico pode ser linear para o sistema particular.⁽⁵⁾ Este método não necessita um conhecimento exato do tamanho da amostra e de aspectos críticos de diluição.

II.2 - Detector por Captura de Elétrons

A detecção de efluentes de uma coluna de cromatografia gasosa por absorção de elétrons foi publicada pela primeira vez em 1958.⁽¹⁰⁾ Muitos experimentos foram tentados, baseados no fato de que a condutividade de gases em uma câmara de ionização é extraordinariamente sensível a pequenas mudanças na composição do gás. Preenchida uma câmara com fluxo de nitrogênio que foi ionizado por radiação de uma fonte radioativa interna, a condutividade a baixos potenciais aplicados foi alterada grandemente pela presença de traços de outros compostos na fase de vapor.⁽¹⁰⁾ Apesar do método de captura de elétrons ter sido altamente sensível, a resposta para a concentração do vapor foi demasiadamente não-linear e os fatores de resposta para diferentes compostos variaram grandemente e de forma imprevisível.⁽¹⁰⁾

Em uma aplicação particular - a análise de traços de pesticidas em material de origem biológica - a necessidade foi tão grande que, apesar da falta de linearidade e de comportamentos imprevisíveis dos fatores de resposta de diferentes compostos, o método de absorção de elétrons foi utilizado. O sucesso desta análise foi particularmente atribuída às altas, sensibilidade e seletividade do método e, principalmente, aos cuidados tomado por Goodwin e colaboradores⁽¹⁰⁾ para evitar respostas anômalas.

A importância da análise de traços de pesticidas e o fato de que a baixos níveis esses compostos são quase impossíveis de serem analisados por outros detectores poucos seletivos, por causa da complexidade dos cromatogramas, fez com que o método de absorção de elétrons adquirisse grande expansão e exploração comercial. O detector que utiliza o método de absorção de elétrons na análise de compostos em cromatografia gasosa foi denominado como detector por captura de elétrons (DCE).⁽¹⁰⁾

Em sua primeira versão o detector por captura de elétrons, foi operado com polarização dos eletrodos coletores por tensão constante, sendo a mudança na corrente tomada como resposta.⁽¹⁰⁾ Tais

detectores tinham geometria coaxial, com o ânodo localizado ao longo do eixo da célula e envolvido por um cátodo cilíndrico, o qual continha a fonte radioativa. O trítio foi a fonte de ionização utilizada, presumivelmente devido à sua baixa energia de radiação.⁽¹¹⁾

A grande aceitação deste detector como um poderoso acessório para a cromatografia gasosa tendeu a obscurecer alguns dos erros inerentes ao seu projeto e modo de operação. Em 1963 Lovelock e colaboradores⁽¹²⁾ descreveu o projeto de placas paralelas, no qual o ânodo e cátodo são arrançados paralelos um ao outro.⁽¹¹⁾ Nesta segunda versão, ou geração, do DCE, o detector foi operado com técnica de amostragem pulsada, isto é, os eletrodos coletores são polarizados intermitentemente, sob determinados valores de tensão, que se repetem segundo alguma frequência fixa. Isto reduz anomalias induzidas por campos elétricos contínuos.⁽¹¹⁾

Em trabalho realizado por Wentworth e colaboradores foi descrita a variação da resposta do DCE com mudanças na temperatura, sugerindo-se que a altas temperaturas a sensibilidade do detector para certas classes de compostos poderia ser apreciavelmente aumentada. Esta dependência da temperatura promoveu estudos para o desenvolvimento de um detector que poderia ser operado a temperaturas maiores que 200°C.⁽¹²⁾

A folha de trítio que era comumente usada como fonte radioativa nos DCE impunha a limitação de temperatura, devido à significativa perda de trítio em temperaturas superiores a 200°C. O uso de ⁶³Ni como uma fonte radioativa alternativa, com propriedades radioativas comparáveis ao trítio, mas sem a limitação de temperatura, foi sugerida no trabalho de Shoemaker e colaboradores.⁽¹⁸⁾ Outros projetos foram então desenvolvidos para a utilização com ⁶³Ni, tais como o cilindro concêntrico e o Pin-cup.⁽¹¹⁾

Simmonds e colaboradores⁽¹²⁾ determinaram as vantagens analíticas do uso de altas temperaturas com um DCE de placas paralelas e fonte de ⁶³Ni. Eles verificaram que a altas temperaturas ocorria a redução da contaminação do detector e observaram, para certos compostos, o fenômeno da dependência da resposta do DCE com a temperatura. Lovelock e colaboradores⁽¹⁷⁾ determinaram a influência da temperatura do detector sobre a sensibilidade da detecção, utilizando Dieldrin como composto teste. Foi constatada a variação de 5% no fator de resposta do Dieldrin devido a mudanças de temperatura.

Estudos para determinar problemas de contaminação do DCE com ⁶³Ni operado com tensão constante estabeleceram que a diferença mínima de temperatura entre o detector e a coluna deveria ser maior que 25°C.⁽¹³⁾ No mesmo trabalho foi constatado que a vazão do gás que atravessa o detector e o seu isolamento térmico são parâmetros determinantes da sensibilidade deste detector.

A influência da vazão de gás sobre a sensibilidade do DCE também foi bastante estudada,^(14,15) determinando-se que o aumento da vazão de gás de arraste leva a diminuição da sensibilidade do detector.

Em 1971 Maggs e colaboradores⁽¹⁷⁾ propuseram o DCE de terceira geração, que opera sob frequência modulada, ou corrente constante. Neste DCE, quando um composto que captura elétrons passa através da célula a frequência de pulso aumenta para manter a corrente constante e a resposta analítica é a variação da frequência de pulsação. Neste modo de operação são obtidas, para muitos compostos, curvas de calibração lineares com concentrações variando até 99% da saturação do detector.^(16,17) Contudo, mesmo os DCE de terceira geração não apresentam boas curvas de calibração lineares com compostos para os quais eles tem altas sensibilidades, o que não é exclusivamente atribuído a deficiências instrumentais, mas também ao processo de captura de elétrons.⁽¹⁶⁾

Portanto, desde a sua primeira utilização o DCE vem passando por profundos estudos para determinar as suas melhores condições de operação. As evoluções do DCE de tensão constante para os de tensão pulsada e para os (atualmente usados) de frequência modulada foram tentativas, bem sucedidas, de melhorar o desempenho do detector com alterações instrumentais que atuam sobre o seu processo (desconhecido) de captura de elétrons. Contudo, o desempenho de qualquer dos modelos de DCE é dependente de condições experimentais "extra" e "intra detector". Por exemplo, condições cromatográficas, como a vazão de gás de arraste, a temperatura da coluna e o tipo de fase estacionária podem influenciá-lo.⁽¹¹⁾ Quanto a fatores diretamente ligados ao detector pode-se citar, o valor da tensão de polarização dos eletrodos, a natureza da fonte radioativa e a temperatura do detector.⁽¹¹⁾ Ainda existe a vazão total de gás que passa pelo detector, porque para aumentar a linearidade das curvas de calibração dos compostos frente ao DCE usa-se diminuir o tempo de permanência da amostra na câmara de ionização, aumentando a vazão desse gás. Altas vazões de gás são obtidas com um gás complementar, que é alimentado antes da entrada do detector. Porém, esta adição extra de gás compromete a sensibilidade do DCE devido à sua dependência em relação a esta variável. Além destes fatores comentados existem vários outros, como pureza de gases, contaminantes de amostras, etc, que podem alterar o comportamento de um DCE. A necessidade dos muitos cuidados para atenuar os efeitos desses fatores é que torna o DCE um detector difícil de operar.

III - Operacionalização do Cromatógrafo Gasoso Equipado com Detector por Captura de Elétrons (DCE).

Foi feita a revisão das linhas de gases do cromatógrafo Pye-Unicam 104 (PU-104) e foi instalada uma linha de nitrogênio super-seco, necessário para a operação do DCE. Este DCE possui ^{63}Ni como fonte radiativa e apresenta projeto de placas paralelas. O cromatógrafo é equipado com injetor "on column" utilizando coluna empacotada de vidro de 1/4 de polegada. Os módulos eletrônicos de controle do aquecimento dos fornos da coluna e do detector e a fonte de tensão de polarização do detector sofreram pequenos reparos (troca de chaves, componentes eletrônicos, substituição de soldas). Os serviços foram feitos em nosso laboratório. Curvas de temperatura versus tempo de aquecimento foram levantadas para a verificação do funcionamento dos módulos de controle de temperatura do cromatógrafo. Houve a constatação de flutuações desprezíveis de temperatura com o tempo, o que indicou bom funcionamento desses módulos de controle. Foram obtidos dados de calibração de pressão versus vazão para o gás make-up e da temperatura dos fornos versus voltagem para o termopar original do cromatógrafo, mostrados respectivamente nas figuras III.1 e III.2. Termômetro de mercúrio também foi usado para medida de temperatura dos fornos da coluna, detector e injetor.

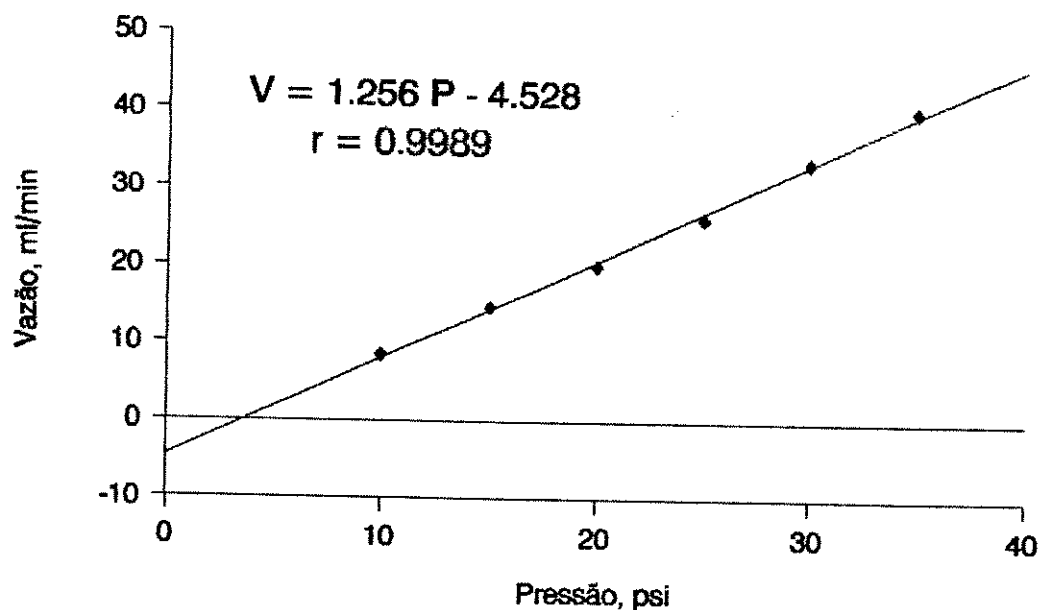


Figura III.1 - Curva de calibração para a conversão de pressão em vazão de gás make-up.

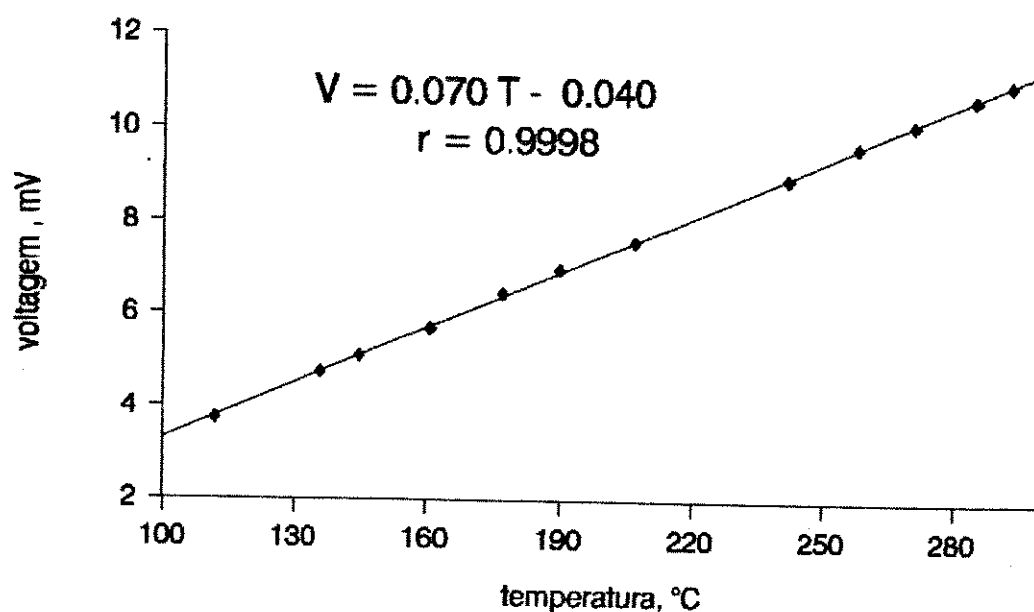


Figura III.2 - Curva de calibração para a variação da voltagem (mV) em função da temperatura (°C) para o termopar original do cromatógrafo.

O programador de temperatura do módulo de aquecimento do forno da coluna também foi testado para verificar a ocorrência de variação da vazão do gás de arraste. Caso não houvesse a alteração da vazão de gás de arraste, poder-se-ia utilizar rampas de aquecimento para a separação dos componentes a serem analisados. A tabela III.1 é indicativa da impossibilidade, enquanto não forem feitas adequadas adaptações, de trabalhos com programação de temperatura, devido a grande variação da vazão de gás de arraste com a alteração de temperatura da coluna.

Tabela III.1 - Valores de vazão da coluna com o aumento da temperatura do forno.

Temperatura (°C)	50	80	110	140	170	200
Vazão (ml/min)	13,1	12,6	12,0	11,4	10,9	10,4

Para fazer a aquisição de sinal do DCE com o sistema de aquisição de dados cromatográficos LECROM, foi testado, para amplificação de sinais, um eletrômetro Pye-Unicam 12306, que tem uma saída de sinal na faixa de 0 a 10 volts, que é necessária para uso com o cartão do conversor analógico digital (ADC) disponível (DACA, da IBM Corp., Boca Raton, FL, EUA). O cabo coaxial de conexão entre o eletrômetro e o cartão ADC teve de ser refeito e testado, pois o original gerava excesso de ruído. Os ensaios mostraram que o eletrômetro pode ser satisfatoriamente empregado.

O cromatógrafo PU-104 é um aparelho de 1971, projetado para uso com colunas empacotadas. Foram feitas as adaptações necessárias para a instalação de uma coluna capilar "megabore" de 0,53 mm de diâmetro interno. A primeira adaptação tentada foi através da utilização de uma conexão tipo "T". Porém, devido à geometria do sistema, a saída da coluna para o detector localizava-se cerca de 8 cm abaixo da entrada de gás make-up. Como os resultados cromatográficos revelaram picos de formas bastante irregulares (o que compromete a sensibilidade), supôs-se que o problema fosse devido à dispersão do componente, pelo gás make-up, antes da entrada no detector.

Foi projetado e construído na oficina mecânica do Instituto de Química, um segundo adaptador de latão, com geometria que permite que a saída da coluna capilar para o detector fique cerca de 0,5 cm acima do ponto de entrada de gás make-up. Com este segundo houve substancial melhora de desempenho do sistema, como se pode constatar comparando-se as curvas de calibração para o bromofórmio das figuras III.3 (segundo adaptador) e III.4 (adaptador T). Com o segundo adaptador a curva de calibração é mais confiável (vide coeficientes de correlação nas figuras III.3 e III.4) e as áreas obtidas para os picos são maiores.

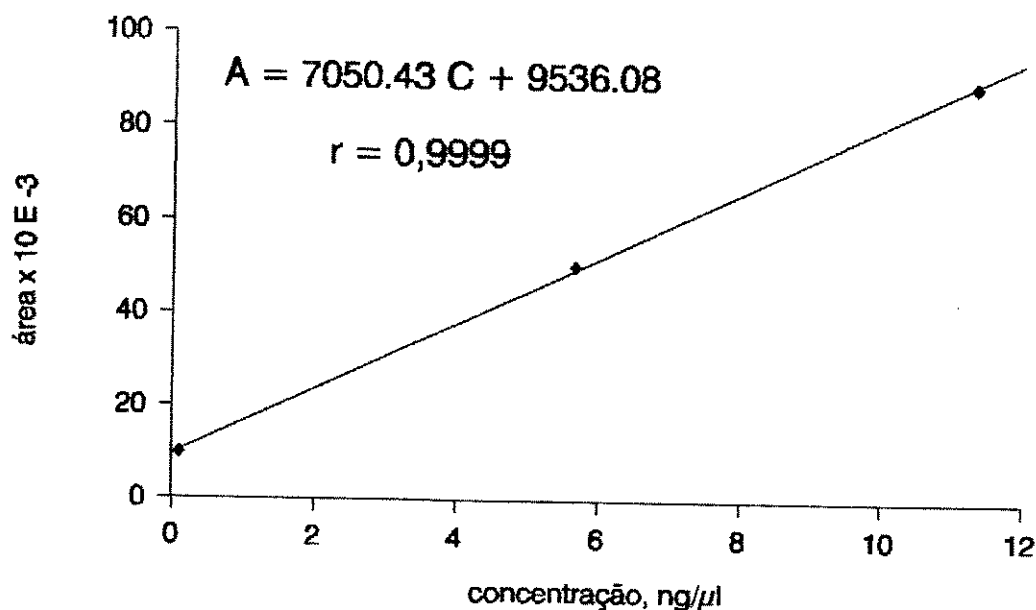


Figura III.3 - Curva de calibração de solução de Bromofórmio obtida com o adaptador construído na oficina mecânica do IQ.

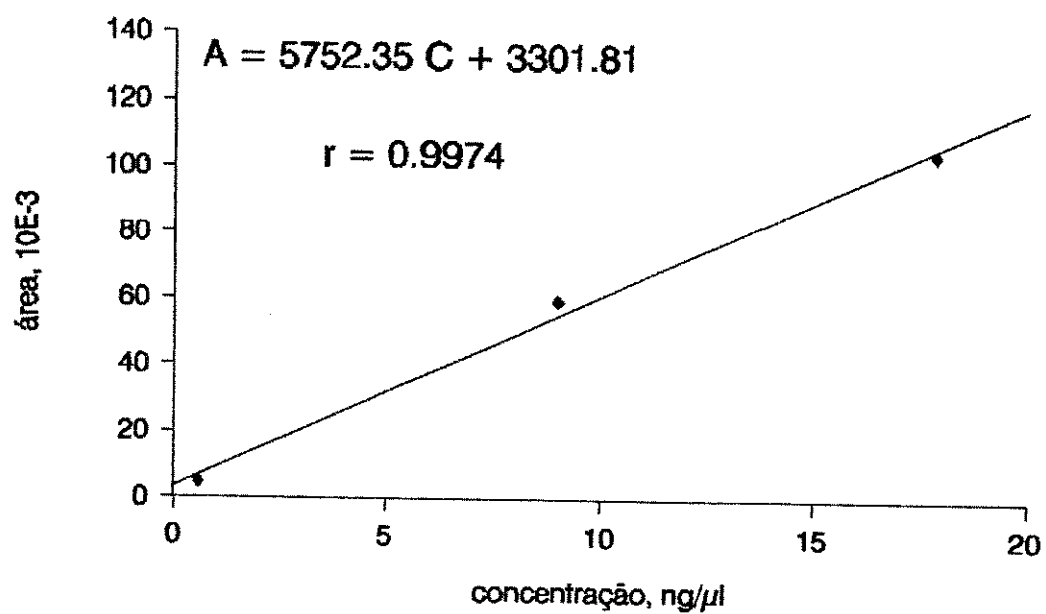


Figura III.4 - Curva de calibração de solução de Bromofórmio obtida com o uso do adaptator tipo T .

IV - Otimização da sensibilidade do DCE em função da temperatura e vazão de gás make-up.

A performance do DCE é dependente de alguns parâmetros operacionais, como a temperatura do detector e a vazão de gás que o atravessa.⁽¹⁵⁾ Através de estudos quimiométricos foi possível determinar como esses parâmetros, isolados e conjuntamente, afetam a sensibilidade do DCE para cada um dos compostos, Aldrin, Dieldrin, hexaclorobenzeno e heptaclor, e para a mistura deles. Também foi possível obter valores de temperatura do detector e vazão de gás make-up que fornecem a melhor sensibilidade do DCE.

IV.1 - Otimização de respostas de sistemas químicos em função de suas variáveis.

Otimização em química, ou quimiometria, é definida como sendo a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir, ou selecionar, condições ótimas de medidas e permitir a obtenção do máximo de informações a partir da análise química.⁽¹⁹⁾

Goewie e Box⁽²⁰⁾ classificaram as técnicas quimiométricas como sendo sequenciais e simultâneas. Dentro da classe sequencial o simplex é a técnica mais popular e na simultânea há os vários tipos de técnicas que utilizam planejamentos fatoriais. Em ambos os casos as técnicas quimiométricas necessitam de uma série de ensaios que são dirigidos para uma meta específica (a qual pode envolver mais de uma resposta) e incluem todas as variáveis que possivelmente são relevantes ao experimento. As séries de ensaios são arranjadas de acordo com um modelo, denominado projeto experimental, que produz o máximo de informações e deve conter um número suficiente de ensaios para determinar quais os efeitos importantes e descartar as variáveis triviais.⁽²¹⁾

O conjunto das séries de ensaios experimentais forma o projeto experimental. Nestes projetos, cada condição controlada, ou variável, é chamada de Fator. Cada Fator pode tomar um número finito de valores (para variáveis quantitativas) ou tipos (para variáveis qualitativas), chamados de níveis do Fator. A combinação de Fatores, cada qual com níveis definidos, é chamado de ensaio experimental.⁽²²⁾

A quimiometria apresenta a vantagem de minimizar as seguintes fontes de dificuldades que podem ser encontradas no decorrer de um experimento:⁽²³⁾

(1) Erro experimental ou ruído: causado por variação produzida por distúrbios de fontes conhecidas e desconhecidas. O erro experimental pode encobrir, inteira ou parcialmente, efeitos experimentais importantes, e induzir o experimentador a acreditar em efeitos que não existem. Essas fontes podem ser reduzidas por experimentos e análises quimiométricas adequadas. Além disto, a quimiometria fornece medidas da precisão para as quantidades estimadas e, em particular, torna possível conhecer se há alguma evidência da existência de valores não nulos para tais quantidades.

(2) Existência de correlação entre as variáveis: causado por efeitos lineares ou aditivos entre as variáveis estudadas, os quais podem ser estimados por métodos quimiométricos.

(3) Complexidade dos efeitos: causado por efeitos de interação e do tipo não linear sobre as variáveis estudadas. Também tem seus efeitos estimados através de quimiometria, com a menor transmissão possível de erros experimentais. Esta é a principal vantagem em relação aos métodos univariados, os quais alteram o valor de uma variável a cada vez, e portanto não consideram os efeitos sinérgicos e antagonísticos entre as variáveis.

Além dessas vantagens, os métodos quimiométricos requerem o menor número possível de experimentos, utilizam operações matemáticas simples e requerem pouco conhecimento de estatística.

IV.2 - Otimização da sensibilidade do DCE para cada composto.

O estudo para a otimização da sensibilidade do DCE de cada composto envolveu a utilização, de forma integrada, de três métodos quimiométricos: Planejamento Fatorial, Simplex Sequencial Modificado e Planejamento de Superfície de Resposta. Conforme indica o fluxograma da figura IV.1, os resultados de cada método eram usados para definir como os dados deveriam alimentar o método seguinte. As respostas utilizadas neste estudo com os componentes injetados individualmente foram suas áreas cromatográficas.

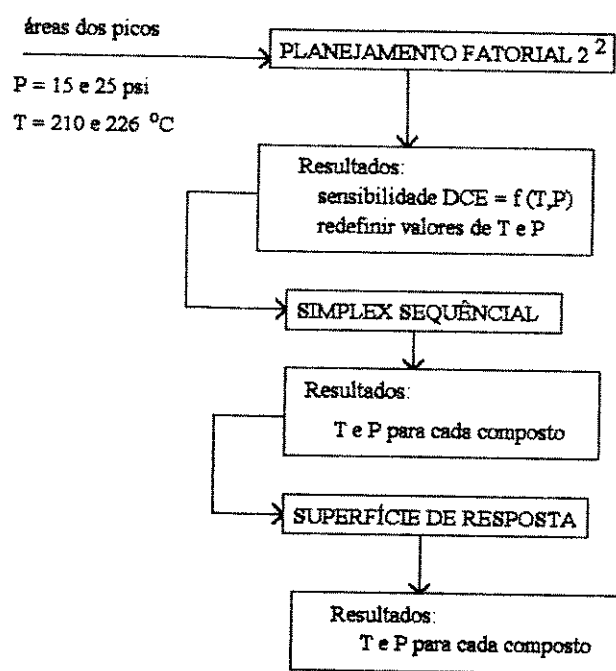


Figura IV.1 - Fluxograma da sequência utilizada para o estudo da otimização da sensibilidade do DCE

A figura IV.2 mostra as estruturas dos quatro compostos cujas sensibilidades frente ao DCE foram estudadas via métodos quimiométricos.

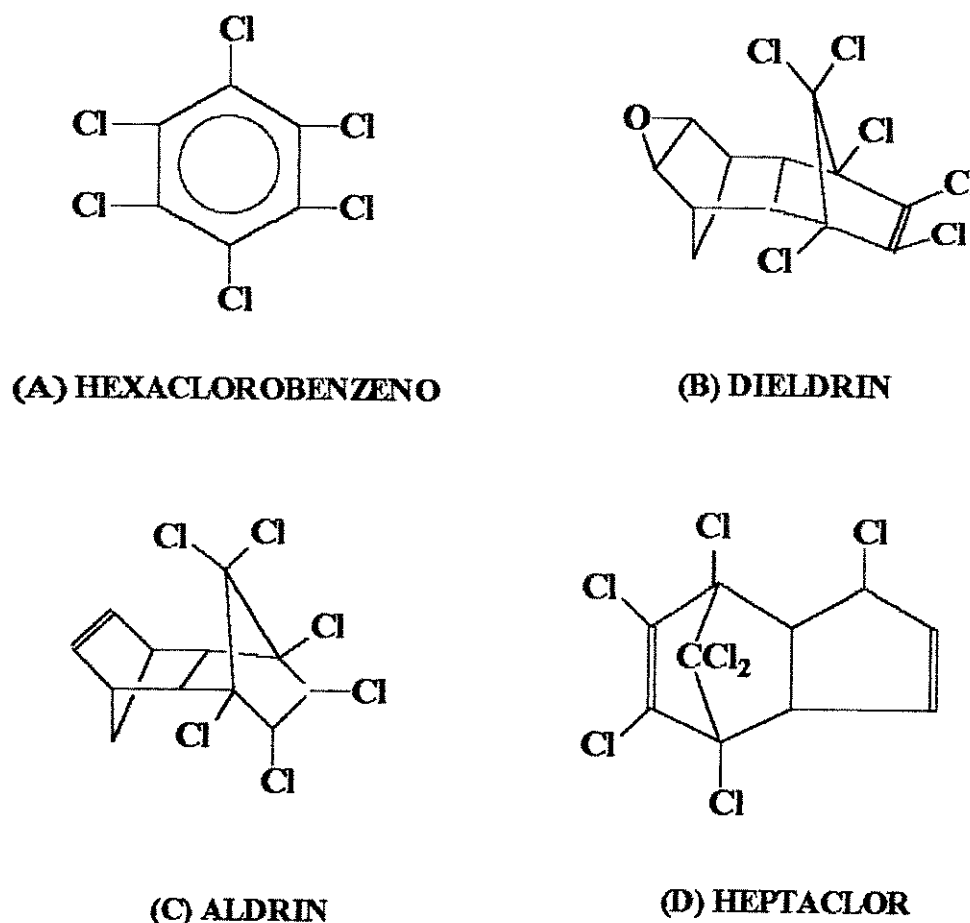


Figura IV.2 - Estrutura dos pesticidas utilizados no estudo da otimização da sensibilidade do DCE.

IV.2.1 - Planejamento Fatorial Completo 2²

No Planejamento Fatorial Completo 2² foram usados dois níveis para cada Fator, ou seja: 210 e 226°C para a temperatura do detector e 15 e 25 psi para a pressão de gás make-up. Os dois valores para a pressão de gás make-up foram aleatoriamente escolhidos. O nível inferior da temperatura do detector (210°C) foi escolhido de acordo com os trabalhos de Gosselin, Martin e Boudreau⁽¹³⁾ e outros^(5,24). De acordo com estes trabalhos a diferença de temperatura entre o forno da coluna e o do detector deve ser maior que 25°C, para evitar problemas de contaminação do DCE. Como a

temperatura utilizada no forno da coluna durante os trabalhos de otimização foi de 185°C, optou-se por iniciar estes estudos com o valor de nível inferior de temperatura em 210°C.

Com dois níveis, superior (+) e inferior (-), de pressão e temperatura foram realizados quatro Ensaios Experimentais: T-P-, T-P+, T+P- e T+P+, onde T-P- = (210°C)(15psi), T-P+ = (210°C)(25psi), etc... Para cada ensaio experimental foi obtida a área cromatográfica de cada composto. Os ensaios experimentais foram realizados em duplicata. A área A1 (vide tabelas IV.1 a IV.4) corresponde à resposta do ensaio T-P-, as demais correspondências são A2(T-P+), A3(T+P-) e A4(T+P+). As áreas obtidas para cada ensaio, seus valores médios e respectivos desvios padrão são mostrados nas tabelas IV.1 a IV.4.

Tabela IV.1 Planejamento fatorial completo 2² para hexaclorobenzeno.^(a)

ensaio experimental	temperatura (°C)	pressão (psi)	áreas obtidas (cm ²)	área média (cm ²)	estimativa de desvio padrão
(T-P-)	210	15	A1 = 724 729	726	14
(T-P+)	210	25	A2 = 644 649	646	11
(T+P-)	226	15	A3 = 824 817	820	20
(T+P+)	226	25	A4 = 673 666	669	26

(a) O modo de cálculo do desvio padrão e os demais tratamentos estatísticos estão descritos no item IV.2.1.3 - Tratamento Estatístico.

Tabela IV.2 - Planejamento fatorial completo 2² para Heptaclor.^(a)

ensaio experimental	temperatura (°C)	pressão (psi)	áreas obtidas (cm ²)	área média (cm ²)	estimativa de desvio padrão
(T-P-)	210	15	A1 = 569 560	565	41
(T-P+)	210	25	A2 = 516 513	514	21
(T+P-)	226	15	A3 = 574,6 572,9	574	2
(T+P+)	226	25	A4 = 488,4 488,2	488	0

(a) O modo de cálculo do desvio padrão e os demais tratamentos estatísticos estão descritos no item IV.2.1.3 - Tratamento Estatístico.

Tabela IV.3 - Planejamento fatorial completo 2² para Aldrin.^(a)

ensaio experimental	temperatura (°C)	pressão (psi)	áreas obtidas (cm ²)	área média (cm ²)	estimativa de desvio padrão
(T-P-)	210	15	A1 = 966 967	967	1
(T-P+)	210	25	A2 = 809 804	806	12
(T+P-)	226	15	A3 = 1010 1001	1005	39
(T+P+)	226	25	A4 = 817 838	828	214

(a) O modo de cálculo do desvio padrão e os demais tratamentos estatísticos estão descritos no item IV.2.1.3 - Tratamento Estatístico.

Tabela IV.4 - Planejamento fatorial completo 2² para Dieldrin.^(a)

ensaio experimental	temperatura (°C)	pressão (psi)	áreas obtidas (cm ²)	área média (cm ²)	estimativa de desvio padrão
(T-P-)	210	15	A1 = 757 751	754	30
(T-P+)	210	25	A2 = 670 668	669	8
(T+P-)	226	15	A3 = 872 875	873	9
(T+P+)	226	25	A4 = 628 627	627	1

(a) O modo de cálculo do desvio padrão e os demais tratamentos estatísticos estão descritos no item IV.2.1.3 - Tratamento Estatístico.

O Planejamento Fatorial foi utilizado como investigação preliminar para determinar se a temperatura do detector e a pressão de gás make-up tem, ou não, influência sobre a resposta do DCE. Ele também possibilitou estabelecer as tendências de resposta do DCE para cada composto, de acordo com os conjuntos de temperatura e pressão de gás make-up usados.

IV.2.1.1 - Cálculo dos Efeitos

O Planejamento Fatorial 2² possibilita a determinação de dois Efeitos Principais, o da Temperatura do detector (EP_T) e o da Pressão de gás make-up (EP_P), de um Efeito de Interação (EI) entre esses fatores e das estimativas médias dos efeitos.

O Efeito Principal da Temperatura indica como a sensibilidade do DCE varia com a mudança de temperatura. Ele é definido como a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior desta variável⁽²¹⁾:

$$EP_T = \frac{1}{2} \cdot (A_3 + A_4) - \frac{1}{2} \cdot (A_1 + A_2) \quad (\text{equação IV.1})$$

Por exemplo, o Efeito Principal de Temperatura para o Aldrin é:

$$EP_T = \frac{1}{2} \cdot (1005,4 + 827,8) - \frac{1}{2} \cdot (966,5 + 906,2)$$

$$EP_T = 30,3$$

O Efeito Principal de Pressão indica como a sensibilidade do DCE varia com a alteração da pressão do gás. Como mostrado na equação IV.2, o seu cálculo é similar ao do Efeito Principal de Temperatura:

$$EP_P = \frac{1}{2} \cdot (A_2 + A_4) - \frac{1}{2} \cdot (A_1 + A_3) \quad (\text{equação IV.2})$$

Para Aldrin o Efeito Principal de Pressão é:

$$EP_P = \frac{1}{2} \cdot (806,2 + 827,8) - \frac{1}{2} \cdot (966,5 + 1005,4)$$

$$EP_P = -168,9$$

A atuação conjunta da temperatura e da pressão de gás sobre a sensibilidade do DCE, expressada pelo Efeito de Interação (EI), indica a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos no sistema. O Efeito de Interação é definido como a metade da diferença entre o efeito da temperatura no nível inferior de pressão e o efeito da temperatura no nível superior de pressão⁽²¹⁾:

$$EI = \frac{1}{2} [(A_1 - A_3) - (A_2 - A_4)] \quad (\text{equação IV.3})$$

Para o Aldrin, o Efeito de Interação é:

$$EI = \frac{1}{2} [(966,5 - 1005,4) - (806,2 - 827,8)]$$

$$EI = -8,6$$

A média dos efeitos é definida como a média de todas as respostas obtidas:

$$E_M = \frac{1}{4}[A_1 + A_2 + A_3 + A_4] \quad (\text{equação IV.4})$$

Para o Aldrin, a média dos Efeitos é:

$$E_M = \frac{1}{4}[966,5 + 806,2 + 1005,4 + 827,8]$$

$$E_M = 905,5$$

Na tabela IV.5 estão as estimativas dos Efeitos Principais da Temperatura e da Pressão de gás make-up, as estimativas dos Efeitos de Interação entre essas variáveis e, para cada estimativa os erros padrão e os resultados de aplicação do teste-t, com 95% de confiabilidade. Os cálculos das estimativas dos Efeitos Principais e de Interação foram realizadas através do programa quimiométrico Fatorial e através do uso de planilha eletrônica. A tabela IV.5 permite avaliar como a temperatura e a pressão afetam a sensibilidade do DCE.

Tabela IV.5 - Resultados do estudo Fatorial Completo 2^2 para estimar a influência da temperatura e da pressão de gás make-up sobre a sensibilidade do detector.

COMPOSTO				
	ALDRIN	HCB	DIELDRIN	HEPTACLOR
Média	905,5 ± 2,8 (7,8) ^a	715,5 ± 1,5 (4,2)	730,9 ± 0,9 (2,4)	534,9 ± 0,8 (2,1)
EP _T	30,3 ± 5,5 (15,3)	58,6 ± 2,9 (8,2)	38,7 ± 1,8 (4,9)	-7,7 ± 1,4 (3,9)
EP _P	-168,9 ± 5,5 (15,3)	-115,5 ± 2,9 (8,2)	-165,4 ± 1,8 (4,9)	-68,7 ± 1,4 (3,9)
EI	-8,6 ± 5,5 (15,3)	-35,6 ± 2,9 (8,2)	-80,3 ± 1,8 (4,9)	-16,7 ± 1,4 (3,9)

^a Teste-t com 95% de confiabilidade e 4 graus de liberdade.

IV.2.1.2 - Interpretação dos resultados

O tratamento estatístico indicou que todas as estimativas dos Efeitos Principais e de Interação são significativas, exceto o Efeito de Interação do Aldrin, cujo valor de teste-t é superior ao do Efeito de Interação. É necessário portanto entender o significado desses Efeitos em termos práticos.

Valores não nulos para os Efeitos Principais de Temperatura e de Pressão de gás significam que essas variáveis tem influência sobre a sensibilidade do DCE. Quando os valores dos Efeitos Principais são positivos conclui-se que a sensibilidade do DCE aumenta com o aumento da correspondente variável. Valores negativos indicam a tendência contrária. Assim, conclui-se da Tabela IV.5, exceto para Heptaclor, que a sensibilidade aumenta com o aumento da temperatura e com a redução da pressão de gás make-up.

A existência de Efeitos de Interação significativos indicou que os efeitos principais devem ser analisados em conjunto, exceto para Aldrin o qual pode ser analisado apenas em função de seus efeitos principais.

Outra forma de fazer estas interpretações é através da representação do planejamento experimental em um sistema (diagrama), onde cada eixo corresponde a uma variável. Conforme a figura IV.3, este sistema é um plano, no qual os quatro ensaios (vide tabela IV.1 a IV.4) ocupam os vértices de um quadrado.

Neste plano, os efeitos principais são vistos como contrastes - diferenças médias - entre valores situados em arestas opostas e perpendiculares ao eixo da variável. O efeito de interação é o contraste entre as duas diagonais do quadrado, sendo positiva a diagonal que liga o ensaio (- -) ao ensaio (+ +).

Pelos diagramas da figura IV.3 foi verificado que o aumento da temperatura do detector aumenta a sensibilidade do DCE para todos os compostos quando se trabalha no nível inferior de pressão de gás make-up. Sob pressões maiores, e para hexaclorobenzeno e o Aldrin, o aumento de temperatura tem efeito menos pronunciado sobre a sensibilidade.

No caso do heptaclor o diagrama indica que há pouca alteração da sensibilidade do DCE ao aumentar a temperatura de 210°C para 226°C, mesmo a baixas pressões de gás. Isto significa que o valor ideal de temperatura para a obtenção da melhor sensibilidade do DCE para o heptaclor deve estar na faixa de temperatura estudada.

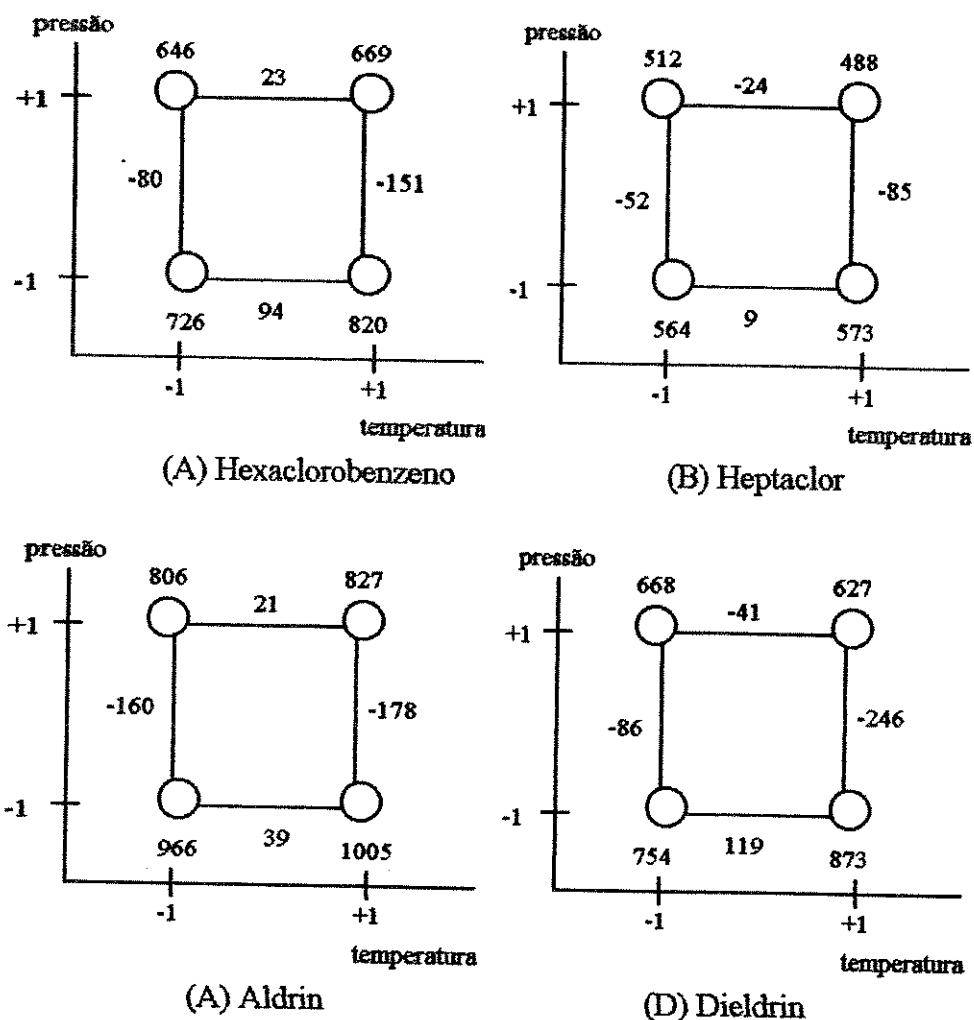


Figura IV.3 - Interpretação dos resultados do estudo Fatorial Completo para (A) Hexaclorobenzeno, (B) Heptaclor, (C) Aldrin e (D) Dieldrin.

Os diagramas do heptaclor e do Dieldrin ainda indicam que o aumento da sensibilidade em função da variação de temperatura é desfavorecido quando se utiliza a pressão no nível superior.

Outra constatação é a de que as sensibilidades do DCE aumentam quando a pressão do gás make-up é diminuída, e que este efeito é menos pronunciado para o heptaclor. Este efeito é mais pronunciado quando utilizadas temperaturas maiores, exceto, como comentado acima, para o heptaclor.

De modo geral a tabela IV.5 também fornece esta conclusão. Porém esta tabela não fornece muitos detalhes do sistema, como por exemplo, a de que a sensibilidade do DCE para Dieldrin é desfavorecida pela variação de temperatura no nível superior de pressão.

IV.2.1.3 - Tratamento Estatístico (segundo a referência 23)

Os ensaios das tabelas IV.1 a IV.4 foram realizados em duplicata, para que pudessemos estimar o erro experimental, e portanto avaliar a significância estatística dos efeitos.

Assim, a estimativa combinada da variância de uma observação individual, S^2 , é dada por:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{2} \quad (\text{equação IV.5})$$

onde d_i é a diferença entre as duas observações correspondentes ao i -ésimo ensaio. Estes cálculos foram utilizados para determinar o desvio padrão indicados nas Tabelas IV.1 a IV.4.

Como cada um dos ensaios foi realizado apenas duas vezes foi obtido uma estimativa da variância com apenas um grau de liberdade. A média ponderada, S_p^2 , de todas as estimativas observadas fornece uma estimativa conjunta, ou global, com quatro graus de liberdade.

$$S_p^2 = \left(v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_i s_i^2 \right) / (v_1 + v_2 + \dots + v_i) \quad (\text{equação IV.6})$$

onde $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de S_i^2 , que é a estimativa da variância do i -ésimo ensaio.

A raiz quadrada deste valor fornece a estimativa, com quatro graus de liberdade, do desvio padrão global, isto é, a estimativa do erro experimental do processo:

$$S_p = \sqrt{S_p^2} \quad (\text{equação IV.7})$$

Cada um dos efeitos calculados, no item IV.2.1.1, é uma combinação linear de quatro valores A_i com coeficientes iguais a $+1/2$ ou $-1/2$. Admitindo que esses valores são independentes e também de mesma variância, foi possível calcular a estimativa da variância de um efeito:

$$S_{(\text{efeito})}^2 = S^2(A_+ + A_-) = \frac{1}{2} (S_p^2) \quad (\text{equação IV.8})$$

O teste-t foi empregado para decidir se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero. A nível de 95% de confiança e quatro graus de liberdade o valor de t é 2,776. Assim, valores de efeitos superiores ao resultado da expressão a seguir são estatisticamente significativos.

$$\bar{X} \pm t(0,95;4) \cdot \sqrt{\frac{S^2}{n}} \quad (\text{equação IV.9})$$

IV.2.1.4 - Conclusões

O Planejamento Fatorial foi utilizado como um pré-tratamento para o prosseguimento da otimização da sensibilidade do DCE para os quatro compostos. Ele foi indicativo de que a temperatura do detector e a pressão de gás make-up são atuantes sobre a sensibilidade do DCE. Este planejamento também foi indicativo de que no uso do método seguinte, o Simplex Sequencial, deveríamos utilizar uma temperatura maior que 226°C e pressão de gás menor que 10 psi na procura de valores dessas variáveis, que forneçam a melhor sensibilidade do detector para Aldrin, Dieldrin e hexaclorobenzeno. Para o heptaclor deveríamos utilizar temperatura entre 210°C e 226°C e pressão acima de 10 psi.

IV.2.2 - Simplex Sequencial Modificado

O método Simplex Sequencial permite a otimização de sistemas sem necessitar de uma função que descreva a dependência de uma resposta com as variáveis experimentais. Este método não utiliza testes estatísticos de significância, como os testes t e F, e funciona bem na otimização de muitas variáveis independentes e na presença de erro experimental.⁽²³⁾

A palavra Simplex significa figura geométrica de p+1 vértices, sendo p o número de variáveis. Neste estudo de 2 variáveis o Simplex é um triângulo, que modifica de tamanho e direção em busca do máximo de sensibilidade do DCE. Cada triângulo adicionado é formado por dois vértices anteriores e um terceiro, cujos valores, de temperatura do detector e pressão de gás, são calculados pelo programa. O novo vértice segue em direção do ponto de máxima sensibilidade do DCE e substitue o vértice que corresponde à menor sensibilidade.

Existem vários métodos Simplex, sendo os métodos Básico, Modificado e o Super-modificado os mais importantes. O Simplex Básico é o mais simples e não muda sua forma ao se movimentar em uma superfície de resposta. O Simplex Modificado modifica de tamanho e forma para se adaptar à superfície de resposta. Este Simplex consegue determinar o máximo (ou mínimo) de uma superfície

com mais precisão e rapidez do que o Simplex Básico. Uma maior capacidade de variações nas construções diferencia o Simplex Modificado do Super-modificado.

IV.2.2.1 - Resultados e conclusões

A tabela IV.6 mostra os valores de temperatura do detector e pressão de gás make-up fornecidos pelo Simplex para os quatro compostos.

Tabela IV.6 - Condições otimizadas de temperatura e pressão obtidas com o Simplex Sequencial modificado para os compostos estudados.

Composto	Valores das Variáveis	
	temperatura (°C)	pressão (psi)
Aldrin	235	5,0
Dieldrin	244	5,5
HCB	253	4,0
Heptaclor	223	11,0

As condições previstas pelo Simplex são coerentes com as previsões do Planejamento Fatorial. No caso do Hexaclorobenzeno, segundo o Planejamento Fatorial (tabela IV.5) o Efeito Principal da Pressão é inferior aos Efeitos Principais para Aldrin e Dieldrin, sugerindo que a pressão que otimizaria a sensibilidade do DCE para o hexaclorobenzeno deveria ser maior do que as pressões utilizadas para Aldrin e Dieldrin. Porém a diferença de contraste (figura IV.3) entre o nível superior e inferior de pressão para o Hexaclorobenzeno é muito grande, o que sugere que a sensibilidade do DCE para este composto é altamente favorecida a baixas pressões. Deste modo era esperado que o Simplex Sequencial fornecesse valores de pressão para o Hexaclorobenzeno tão baixas quanto os apresentados para Aldrin e Dieldrin.

Segundo Frank e Kowalsky⁽²⁵⁾ a resposta otimizada pelo Simplex pode ser somente um ótimo local, e uma otimização mais efetiva é obtida com a aplicação de metodologia de Superfície de Resposta. Os resultados otimizados obtidos pelo método Simplex foram utilizados como pontos centrais para a metodologia de Superfície de Resposta.

IV.2.3 - Metodologia de Superfície de Resposta

A otimização pela metodologia de Superfície de Resposta é feita pela maximização (ou minimização) de uma função, um modelo matemático, que descreve as relações entre a(s) resposta(s) que deve ser otimizada e as variáveis que a determinam.⁽²³⁾

O procedimento envolve etapas sequenciais e testes estatísticos de validade. Inicialmente são escolhidas as condições experimentais, isto é, os valores das variáveis independentes que possam estar próximas dos valores ótimos procurados. Isto depende de algum conhecimento prévio do problema. O passo seguinte é estudar o ajuste dos dados ao modelo simples, linear, da equação IV.10. Se o modelo linear não for adequado, acrescentam-se dados e é utilizado o modelo mais complexo, que é o quadrático da equação IV.11. Os testes de validade de cada modelo consistem em aplicar o teste t para estabelecer a significância estatística dos coeficientes da sua equação e o teste F para a significância da regressão feita com ela sobre os dados.

$$Y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 \quad (\text{equação IV.10})$$

$$Y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (\text{equação IV.11})$$

Os dois modelos das equações IV.10 e IV.11 podem acomodar-se à existência de interações entre as variáveis independentes x_1 e x_2 . No modelo mais simples, as interações previstas são as aditivas, ou lineares. No outro modelo, o termo $b_{12}x_1x_2$ possibilita tratar de interações "cruzadas" e os outros termos das interações aditivas. Metodologicamente usa-se tentar inicialmente o modelo linear, porque ele gera informações úteis para definir as condições para a aplicação do modelo quadrático.

Neste trabalho foram utilizados como dados de partida para aplicar nos modelos das equações IV.10 e IV.11 os resultados do Simplex, determinando-se que os ajustes adequados são obtidos com o modelo quadrático. Isto significa que a relação funcional entre Y (a resposta do detector) e x_1 e x_2 (temperatura e pressão) é descrita por uma superfície. Como otimizar a resposta de um detector é maximizá-la e como ela é descrita por uma superfície, os valores de x_1 e x_2 que resultam na otimização desejada são aqueles que localizam-se no ponto de máximo dessa superfície. Portanto, a etapa final do procedimento de Superfície de Resposta foi localizar este máximo e validar o modelo estatisticamente.

IV.2.3.1 – Planejamento Experimental

A metodologia de Superfície de Resposta foi aplicada a um conjunto de nove ensaios experimentais. Os ensaios foram definidos operando-se com as duas variáveis (temperatura e pressão) em três níveis, superior (+), médio (m) e inferior (-). Nos nove ensaios experimentais, as pressões e temperaturas foram combinadas como: T-P-, T-Pm, T-P+, TmP-, TmPm, TmP+, T+P-, T+Pm e T+P+. Para cada ensaio experimental foi obtida uma área cromatográfica média (de 3 áreas). A área A1 corresponde à resposta do ensaio T-P-, as demais correspondências são: A2(T-Pm), A3(T-P+), A4(TmP-), A5(TmP-), A6(TmPm), A7(T+P-), A8(T+Pm) e A9(T+P+). A seguir são apresentados os

resultados da Superfície de Resposta obtidos com o uso do modelo quadrático. Como este modelo (equação IV.11) revelou ajustar-se aos dados muito melhor do que o modelo linear (equação IV.10), somente serão discutidos os seus resultados. A tabela IV.7 contém as condições experimentais dos nove ensaios para o HCB, as respostas obtidas pelo método de Superfície de Resposta e as estimativas dos desvios padrão para cada ensaio. As tabelas IV.8 a IV.10 mostram os mesmos dados para, respectivamente, Aldrin, Dieldrin e Heptaclor.

Tabela IV.7 - Planejamento de Superfície de Resposta para hexaclorobenzeno

Condições Experimentais		Área Média (cm ²)	Estimativa de desvio padrão
temperatura (°C)	pressão (psi)		
248	3,0	252	1
253	3,0	377	4
258	3,0	415	1
258	4,0	403	5
253	4,0	403	3
248	4,0	408	2
248	5,0	398	1
253	5,0	438	1
258	5,0	442	0

Tabela IV.8 - Planejamento de Superfície de Resposta para Aldrin

Condições Experimentais		Área Média (cm ²)	Estimativa de desvio padrão
temperatura (°C)	pressão (psi)		
230	3,0	625	0
235	3,0	611	1
240	3,0	665	0
240	5,0	741	0
235	5,0	782	1
230	5,0	761	2
230	7,0	740	0
235	7,0	830	1
240	7,0	817	1

Tabela IV.9 - Planejamento de Superfície de Resposta para Dieldrin

Condições Experimentais		Área Média (cm ²)	Estimativa de desvio padrão
temperatura (°C)	pressão (psi)		
239	3,5	942	11
244	3,5	884	45
249	3,5	996	18
249	5,5	1011	0
244	5,5	1019	3
239	5,5	1041	29
239	7,5	1010	9
244	7,5	1025	14
249	7,5	1020	9

Tabela IV.10 - Planejamento de Superfície de Resposta para Heptaclor

Condições Experimentais		Área Média (cm ²)	Estimativa de desvio padrão
temperatura (°C)	pressão (psi)		
217	9,0	446	0
222	9,0	507	3
227	9,0	478	3
227	11,0	551	0
222	11,0	564	2
217	11,0	550	1
217	135,0	544	3
222	13,0	527	56
227	13,0	465	1

IV.2.3.2 - Cálculo dos coeficientes da regressão quadrática e valores das variáveis que fornecem a melhor sensibilidade para cada composto.

Os coeficientes da regressão quadrática para cada composto foram obtidos através do programa Trend⁽²⁶⁾ e também por uma planilha desenvolvida em nosso laboratório. Esta planilha inclui os resultados de estudos estatísticos. A equação de regressão quadrática foi obtida após a interpretação estatística desses coeficientes. A tabela IV.11 contém os valores desses coeficientes, as estimativas dos desvios padrões e os valores de teste-t (vide tratamento estatístico, item IV.2.3.3).

Tabela IV.11 - Coeficientes da regressão quadrática obtido pelo programa Trend para hexaclorobenzeno, Aldrin, Dieldrin e Heptaclor.

Coeficiente	Compostos			
	HCB	Aldrin	Dieldrin	Heptaclor
b_0	$405,4 \pm 0,7$ (1,8) ^a	$776,4 \pm 0,4$ (1,0)	$1011,7 \pm 0,7$ (1,9)	$569,3 \pm 0,5$ (1,5)
b_1	$16,9 \pm 0,5$ (1,4)	$16,1 \pm 0,3$ (0,8)	$5,7 \pm 0,5$ (1,4)	$-7,9 \pm 0,4$ (1,1)
b_2	$22,4 \pm 0,5$ (1,4)	$80,9 \pm 0,3$ (0,8)	$38,8 \pm 0,5$ (1,4)	$17,5 \pm 0,4$ (1,1)
b_{11}	$-2,1 \pm 0,8$ (2,1)	$-18,6 \pm 0,4$ (1,2)	$23,7 \pm 0,8$ (2,3)	$-24,9 \pm 0,6$ (1,7)
b_{22}	$-0,3 \pm 0,8$ (2,1)	$-49,3 \pm 0,3$ (1,2)	$-48,0 \pm 0,8$ (2,3)	$-58,1 \pm 1,7$ (1,7)
b_{12}	$-4,7 \pm 0,6$ (1,7)	$9,1 \pm 0,4$ (0,9)	$-10,9 \pm 0,6$ (1,8)	$-27,9 \pm 0,5$ (1,3)

^a teste-t com 95% de confiabilidade e 4 graus de liberdade.

Como o valor do coeficiente b_{22} para o HCB está numericamente situado dentro do limite de confiança do teste t, ele não é significativo para o prosseguimento dos cálculos.

Conhecendo a equação quadrática de cada composto, foi possível por meio de sua derivada primeira, determinar quais os valores escalonados de temperaturas e pressões que fornecem a melhor sensibilidade para o DCE. Os valores escalonados foram convertidos para a escala real de temperatura e pressão através das equações IV.12 e IV.13.

$$x_1 = \frac{T - T_m}{\frac{\Delta T}{2}} \quad (\text{equação IV.12})$$

$$x_2 = \frac{P - P_m}{\frac{\Delta P}{2}} \quad (\text{equação IV.13})$$

sendo T temperatura, P pressão, T(m) temperatura no ponto central e P(m) pressão no ponto central.

A tabela IV.12 contém os valores das variáveis determinados por Superfície de Resposta para cada composto.

Tabela IV.12 - Valores de temperatura e pressão obtidos para a condição otimizada de sensibilidade do DCE para cada composto

Composto	Temperatura (°C)	Pressão (psi)
Hexaclorobenzeno	265	3,6
Aldrin	237	5,9
Dieldrin	241	5,9
Heptaclor	222	11,2

IV.2.3.3 - Tratamento Estatístico (segundo as referências 23 e 27)

Os cálculos da estimativa do erro experimental e os testes t e F foram feitos utilizando os dados do ponto central (m), cujo ensaio foi realizado 5 vezes.

A equação IV.14, que é alternativa da equação IV.5, foi utilizada para determinar o valor da variância para o experimento. A sua raiz fornece o erro experimental (equação IV.7).

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i)^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n}}{n - 1} \quad (\text{equação IV.14})$$

A equação IV.15 fornece a variância para cada coeficiente.

$$V_b = [X' \cdot X]^{-1} \cdot S^2 \quad (\text{equação IV.15})$$

sendo $V(b)$ a variância para cada coeficiente e S^2 a variância para o experimento.

A matriz $[X'X]^{-1}$ foi obtida pelo programa regger⁽²⁸⁾ e pela mesma planilha eletrônica que fornece os testes estatísticos t e F, necessários para a avaliação das significâncias dos coeficientes da regressão quadrática.

A tabela IV.13 contém os valores de F tabelados e calculados, para todos os planejamentos de Superfície de Resposta dos compostos. O valor calculado de F deve ser maior que o valor tabelado para que a regressão seja significativa a nível de 95% de confiabilidade.

Tabela IV.13 - Verificação da significância das regressões segundo o teste F com 95% de confiabilidade.

Composto	F calculado	F tabelado	Conclusão sobre a regressão
Aldrin	30,72	2,90	significativa
Dieldrin	6,69	2,90	significativa
Heptaclor	10,69	2,90	significativa
Hexaclorobenzeno	79,75	2,90	significativa

A análise de variância utiliza a soma dos quadrados (SQ) das fontes de variações do modelo dividida pelos respectivos graus de liberdade. Esta relação é chamada de média quadrática (MQ), e é estatisticamente igual à estimativa da variância (s^2). A tabela IV.14 resume quais as fontes de variação para o modelo e como obter a soma e a média quadrática.

As médias quadráticas podem ser utilizadas para testar hipóteses sobre os modelos adotados. Uma medida estatisticamente válida de quão bem os fatores descrevem a variação nos dados sobre sua média é a razão da variância de Fisher (F_{reg}), conhecida como teste F, para a significância da regressão. Esta razão é calculada como:

$$F_{reg} = \frac{s_{reg}^2}{s_r^2} = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (\text{equação IV.16})$$

Tabela IV.14 - Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados. Sendo, n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos; $n = n_i \times m$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Número de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R / (p - 1)$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / (n - p)$

Caso os fatores não afetem a regressão, ou seja, não sejam significativos, o teste F será igual a unidade. Caso contrário, os fatores afetem a regressão, $MQ_{regressão}$ será maior que $MQ_{resíduos}$ e o teste F será maior que a unidade. Assim, quanto maior o valor do teste F para a regressão, maior será a certeza de que os efeitos dos Fatores estimados são reais. A razão de Fisher para a regressão pode ser associada a um nível de confiança, além dos graus de liberdade para a regressão e resíduos. Deste modo, o valor de F calculado para regressão deve ser superior ao seu valor tabelado, no nível de confiabilidade adotado, para que esta seja significativa a um determinado nível de confiança.

IV.2.4 - Avaliação da otimização da sensibilidade do DCE para cada composto através do Fator de Resposta.

O Fator de Resposta (FR) de um detector é a derivada da intensidade do seu sinal em relação à quantidade de amostra. No presente estudo, os FR de cada composto obtidos com as condições de temperatura e pressão otimizadas, assim como os FR obtidos com condições não otimizadas, foram usados como outro critério de avaliação da eficácia da otimização quimiométrica. As curvas de calibração que fornecem os FR são mostradas na figura IV.4.

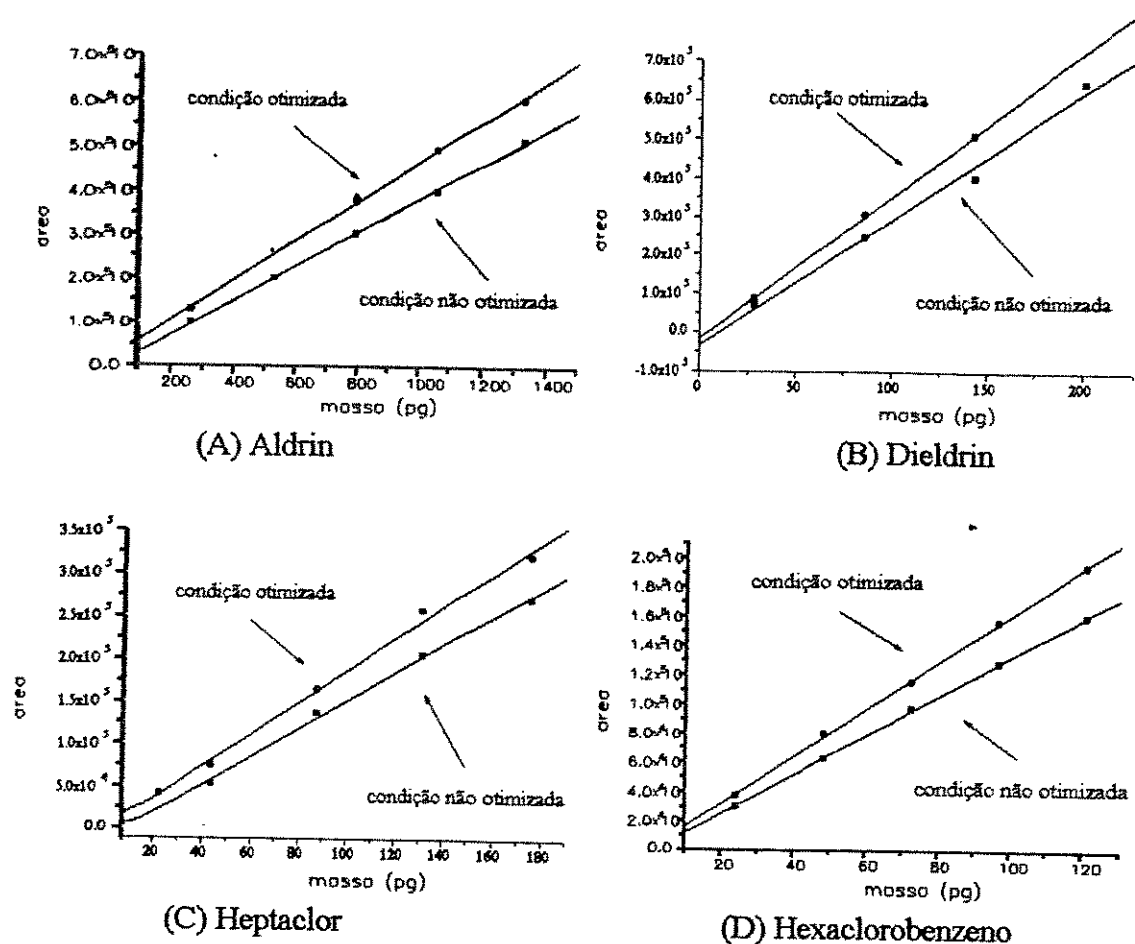


Figura IV.4 - Curvas de calibração de (A) Aldrin, (B) Dieldrin, (C) heptachlor e (D) Hexachlorobenzeno nas condições otimizadas e não otimizadas.

Na tabela IV.15 são mostrados os coeficientes angulares, lineares e de correlação das regressões das curvas de calibração e os aumentos relativos dos Fatores de Resposta, como "ganho de FR(%)" resultante da otimização das condições de temperatura e pressão do DCE.

Tabela IV.15 - Resultado da comparação entre as regressões das curvas de calibração realizadas em condições experimentais otimizadas e não otimizadas.

Compostos				
	HCB	Aldrin	Heptaclor	Dieldrin
Condições não otimizadas				
coeficientes				
angular (FR) ^a	1342,5	388,8	1642,7	3262,3
linear	-1610,4	-7471,5	-13416,9	-28412,2
correlação	0,9999	0,9996	0,9985	0,9947
Condições otimizadas ^b por Superfície de Resposta				
Coeficientes				
angular (FR) ^a	1612,9	449,2	1880,1	3714,1
linear	-182,3	15800,9	-1927,7	-19178,4
correlação	0,9997	0,9991	0,9980	0,9999
ganho de FR (%)	16,77	13,45	12,63	12,16

^a FR = fator de resposta ^b Otimização para os compostos em soluções individuais

Os dados da tabela IV.15, expressam as tendências de comportamento dos coeficientes de regressão das curvas de calibração otimizadas e das não otimizadas. Exceto para o Aldrin, ocorreram substanciais melhoras dos coeficientes angulares (Fatores de Resposta) e dos coeficientes lineares. O ganho no Fator de Resposta, ou seja, o aumento da área dos picos cromatográficos para mesmas quantidades de composto, indica melhora da sensibilidade do DCE com a otimização. As comparações referem-se, por composto, à mesma faixa dinâmica linear do detector - vide figura IV.4.

Outra observação é a de que ocorreram melhoras dos coeficientes lineares, porque a otimização deslocou-os para próximo da origem. Experimentalmente este é um fato importante, porque sugere que os afastamentos das retas da origem podem ser devidos a operação do detector em condições inadequadas.

IV.2.5 - Otimização da detecção do DCE para a mistura dos compostos

A otimização para a mistura dos quatro componentes, visando as condições de temperatura e pressão que representam um compromisso adequado para a detecção dos compostos em condições de análise cromatográfica, foi realizada utilizando como resposta de cada ensaio: (1) a Área Cromatográfica e (2) os Fatores de Resposta. Foram empregados a Metodologia de Superfície de

Resposta com ponto central. Também foi tentado análise por componentes principais para a seleção dos scores mais significativos.

IV.2.5.1 - A função matemática

Tanto para Área Cromatográfica quanto para Fator de Resposta, foi utilizada uma relação matemática que resulta num parâmetro para a análise da Superfície de Resposta. Nesta relação (equação IV.16) a maior resposta (Área Cromatográfica ou Fator de Resposta) obtida com os experimentos foi usada como divisor das demais respostas e os resultados das divisões para os quatro compostos no mesmo experimento foram somados.

$$R_{TP} = \frac{A_1}{A_{\text{maior}}} + \frac{A_2}{A_{\text{maior}}} + \frac{A_3}{A_{\text{maior}}} + \frac{A_4}{A_{\text{maior}}} \quad (\text{equação IV.16})$$

Nesta equação, R_{TP} é a resposta da relação matemática e A_X são as áreas dos compostos para cada condição de temperatura e pressão do DCE. Em lugar de A_X pode-se usar as FR_X . Para os quatro compostos o maior valor de R_{TP} é 4. A escolha da maior Área Cromatográfica (ou Fator de Resposta) como divisora das demais foi devido à suposição de que ela representaria a maior sensibilidade do DCE, uma vez que manipulamos concentrações iguais para cada composto.

Os valores de R_{TP} foram analisados com o programa Trend, para obter a equação da regressão que resultaria na condição de temperatura e pressão correspondente à maior R_{TP} . Portanto esta seria a condição otimizada para a sensibilidade.

IV.2.5.2 - Uso das áreas cromatográficas

No primeiro estudo foram utilizados as menores e maiores temperaturas e pressões do estudo de otimização do DCE para cada composto. Esses valores determinaram o nível superior (+) e inferior (-) das variáveis temperatura e pressão. A Tabela IV.16 contém os valores dos coeficientes da regressão quadrática, os dados estatísticos e os valores otimizados de temperatura do DCE e pressão de gás.

Tabela IV.16 - Coeficientes da regressão quadrática obtidos para a otimização da sensibilidade do DCE para a mistura dos compostos.

Coeficientes		Resultados	teste t
b_0		$2,82 \pm 0,0034$	0,015
b_1		$-0,053 \pm 0,0024$	0,010
b_2		$0,052 \pm 0,0024$	0,010
b_{11}		$-0,13 \pm 0,0036$	0,016
b_{22}		$-0,13 \pm 0,0035$	0,015
b_{12}		$0,030 \pm 0,0029$	0,012
Teste F	F tabelado	F calculado	Conclusão sobre a regressão
(95%, 5, 5) ^a	5,05	1,08	não significativa
Valores das Variáveis			
Temperatura (°C)		239	
Pressão (psi)		6,2	

^a 95% de confiabilidade e graus de liberdade para a regressão e desvio respectivamente.

O resultado da análise estatística, $F_{\text{calculado}}$ menor que F_{tabelado} , indica que este estudo não é significativo ao nível de 95% de confiança. Provavelmente este resultado é devido às amplas faixas de temperatura e pressão utilizadas.

Para as Áreas Cromatográficas obtidas em cada ensaio experimental foi utilizado o programa "pca" (principal components analysis) com o objetivo de selecionar os scores principais, que corresponderiam às Áreas Cromatográficas. Esses scores apresentaram valores de resíduos elevados após tratamento com a metodologia de superfície de resposta (programa Trend). Altos valores de resíduos inviabiliza o uso deste tipo de tratamento pois indica que os resultados experimentais estão em desacordo com o modelo adotado.

Assim, foi feito um segundo estudo para esta otimização, uma vez que a análise de variância para os dois métodos indicou que a regressão obtida não é significativa. A expectativa foi que uma menor faixa de temperatura e pressão para as variáveis pudesse levar às melhoras. Como os coeficientes angulares (Fatores de Resposta) das curvas de calibração é uma forma de representar Área Cromatográfica, optamos em trabalhar com a otimização dos Fatores de Respostas.

IV.2.5.3 - Uso do Fator de Resposta (coeficiente angular)

A tabela IV.17 resume a faixa de temperatura e pressão utilizados e os valores obtidos para a R_{TP} (equação IV.16) calculado com os Fatores de Resposta. Da tabela também constam os Fatores de Resposta obtidos para os compostos.

Tabela IV.17 - Valores experimentais obtidos para a otimização da mistura a partir dos Fatores de Resposta.

temperatura (°C)	pressão (psi)	Fatores de Resposta				Resposta da função
		HCB	Aldrin	Dieldrin	Heptaclor	
235	4,0	1926,9	1622,5	786,9	435,8	2,35
240	4,0	2011,3	1662,9	758,2	489,2	2,42
245	4,0	2032,2	1709,8	991,3	508,1	2,58
235	6,0	1129,9	1067,9	1070,8	413,1	1,81
240	6,0	1602,4	1424,9	872,1	445,1	2,14
240	6,0	1575,4	1430,6	884,3	441,1	2,13
240	6,0	1583,8	1401,9	827,9	443,4	2,09
245	4,0	1699,5	1434,4	638,1	419,1	2,06
235	8,0	1706,7	1372,6	807,1	433,5	2,13
240	8,0	1674,9	1278,3	1065,9	409,7	2,18
245	8,0	1491,3	1232,1	843,9	374,8	1,94

A tabela IV.18 contém os valores dos coeficientes da regressão quadrática e os testes estatísticos obtidos pela aplicação do programa Trend aos resultados da tabela IV.17.

Tabela IV.18 - Coeficientes da regressão quadrática e valores estatísticos para a otimização da mistura de HCB, Aldrin, Dieldrin e Heptaclor.

Coeficientes		Resultados		teste t
b_0		$2,094 \pm 0,00024$		0,066
b_1		$0,048 \pm 0,00012$		0,046
b_2		$-0,18 \pm 0,00012$		0,046
b_{11}		$-0,081 \pm 0,00028$		0,072
b_{22}		$0,23 \pm 0,00026$		0,069
b_{12}		$-0,11 \pm 0,00017$		0,057
Teste F	F tabelado	F calculado	Conclusão sobre a regressão	
(95%, 5, 5) ^a	5,05	9,99	significativa	

^a 95% de confiabilidade e graus de liberdade para regressão e desvios.

Como verifica-se na tabela IV.18, os testes estatísticos indicaram que todos os coeficientes são significativos em relação aos erros padrões, teste-t e teste F. Através da equação da regressão foi possível calcular os valores escalonados e reais das variáveis temperatura e pressão que fornecem a melhor sensibilidade para os quatro compostos em uma mesma corrida cromatográfica. Estes valores são 240°C e 6,4 psi.

Deste modo, conseguiu-se através de métodos matemáticos, valores fundamentados de temperatura do detector e pressão de gás make-up para o trabalho de análise de alguns pesticidas. Estes valores podem se aproximar da idealidade de operação do DCE.

V - Utilização da fração de área do início ao máximo de detecção como um novo parâmetro de cálculo de área.

V.1 - Métodos de quantificação de picos cromatográficos

Os métodos de quantificação de picos cromatográficos podem ser classificados em dois grupos. Num grupo estão os métodos manuais e mecânicos, que são aplicados a cromatogramas registrados analógicamente. A qualidade desses métodos depende da qualidade do traçado dos cromatogramas. No segundo grupo estão os métodos computacionais, que operam sobre conjuntos de valores discretos digitalizados da intensidade de sinal cromatográfico.⁽²⁹⁾ A qualidade dos métodos computacionais dependem de como a sequência desses sinais discretos descreve o perfil de variação do sinal cromatográfico, que é analógicamente gerado no detector, e da qualidade do software com que se analisam os sinais digitalizados.

V.1.1 - Quantificação manual de picos cromatográficos.

O parâmetro cromatográfico quantitativo fundamental é a área do pico. Para simplificar o trabalho pode-se utilizar a altura do pico, porém este modo de quantificação tem limitações. Seguem os principais métodos de medidas de picos cromatográficos.

- Altura do pico. A altura é medida do máximo do pico à sua linha de base.⁽⁵⁾ É a técnica manual mais simples e rápida; consiste na suposição de que a quantidade de material correspondente a um pico é proporcional à sua altura, desde que não ocorram mudanças no sistema cromatográfico, que causem variações nas larguras dos picos.

- Medida da Altura e Largura do Pico. A área do pico (A) é calculada por:

$$A = h \cdot W_h \quad (\text{equação V.1})$$

sendo h a altura máxima e W_h a largura do pico medida a meia altura. Este é o método manual mais difundido e parte do princípio de que um pico cromatográfico pode ser aproximado por um triângulo isósceles.⁽⁵⁾ O método é bom para picos bem resolvidos e simétricos, porque assimetria e sobreposição de picos provocam redução na exatidão da medida.⁽³¹⁾

- Triangulação. Calcula-se a área do pico por:

$$A = \frac{1}{2} \cdot h \cdot W_b \quad (\text{equação V.2})$$

Neste método utiliza-se a largura da base (W_b) do pico. Ele não é bom quando os picos cromatográficos apresentam assimetria e sobreposição.⁽³¹⁾

- A área de Condal-Bosch. É um método desenvolvido para compensar erros de assimetria no cálculo da área do pico. A altura (h) é multiplicada pela média das larguras a 15% e 85% da altura.⁽³¹⁾

$$A = \frac{1}{2} \cdot h \cdot [W_{0,5} + W_{0,85}] \quad (\text{equação V.3})$$

Uma desvantagem deste método é a sua limitação para picos insuficientemente resolvidos, que impossibilitam que a largura a 15% da altura seja medida com confiança.⁽³¹⁾

- As variações de Foley. Foley desenvolveu equações para cálculo de área de picos baseado na função da Gaussiana Exponencialmente Modificada (EMG). Ele mostrou que para 90% de picos assimétricos a área pode ser expressa como:

$$A = 0,753 \cdot h \cdot W_{0,25} \quad (\text{equação V.4})$$

onde h é a altura do pico e $W_{0,25}$ é a largura do pico a 25% de sua altura. Este método é mais vantajoso que o de Condol-Bosch, por ser mais rápido e porque a altura a 25% sofre menos sobreposição do que a altura a 15 %.⁽³¹⁾

- Corte e pesagem. O pico é cuidadosamente cortado do papel e pesado em balança analítica. A área do pico é proporcional à massa da seção recortada. A maior vantagem desta técnica é que ela pode contornar problemas de picos distorcidos e com caudas. As suas desvantagens dependem da regularidade do papel, da habilidade manual do operador e do tamanho do pico. Acresce que há destruição do cromatograma.

- Integração Mecânica. Envolve o uso do planímetro ou do integrador bola-e-disco, que são dispositivos que medem áreas de figuras geométricas traçando o perímetro compreendido por elas. Com o uso do planímetro, o método é trabalhoso e depende muito da habilidade manual do operador e do tamanho e da forma do pico.^(29,5) Quanto aos integradores bola-e-disco, eles possivelmente não são mais fabricados, devido ao custo elevado, pois são instrumentos de mecânica fina.

V.1.2 - Métodos computacionais automáticos para cálculo de picos cromatográficos.

Os métodos de análises de dados cromatográficos baseados em integradores digitais apresentam duas vantagens sobre os métodos que utilizam o traçado dos cromatogramas: a

diminuição do tempo de operação, principalmente em cromatogramas complexos⁽²⁴⁾ e a maior repetibilidade nos cálculos das áreas.⁽³²⁾

Muitos algoritmos calculam as áreas dos picos como sendo o somatório das fatias entre o início e o fim dos mesmos. Este método, que tem a vantagem de ser simples e rápido é o mais usado em equipamentos e software comerciais de processamento computacional de sinais cromatográficos. Obviamente, ele tem limitações para o tratamento de picos sobrepostos. Erros também podem ocorrer para picos assimétricos e de áreas muito diferentes. A assimetria, ou Razão de Assimetria, é o quociente entre a segunda metade da largura do pico e a primeira metade da largura do pico. Quanto maior o valor da assimetria maior é a cauda apresentada pelo pico cromatográfico. É comum que esta medida seja feita a 10% da altura do pico.⁽³¹⁾

Um método adequado para a quantificação de picos sobrepostos é o de "tangent skimming".⁽³³⁾ Outra alternativa é a deconvolução numérica, onde vários modelos matemáticos para as formas dos picos têm sido usados, entre eles: Função de Lorentz-Cauchy, Função Gaussiana e Função Gaussiana Exponencialmente Modificada (EMG).

V.2 - O uso da área compreendida entre o início e o máximo de detecção para quantificação de picos cromatográficos.

A maioria dos programas de análise de dados cromatográficos detecta os picos pela análise de derivadas do sinal.⁽³³⁾ Para qualquer forma de pico, admitindo linha de base horizontal, a primeira derivada torna-se positiva no seu início, passa por máximos nos pontos de inflexão, troca de sinal no máximo do pico e volta a ser zero no seu final. A segunda derivada é zerada nos pontos de inflexão do pico e é minimizada no máximo de amplitude do pico. Portanto, a variação da primeira derivada pode ser usada para detectar o início de um pico, e o comportamento da segunda derivada pode ser usado para confirmar se trata-se de um pico e não de uma deriva (drift) do sinal da linha de base de fundo do detector, porque esta tem a primeira derivada constante e a segunda derivada nula.⁽²⁹⁾

Um aspecto crítico no cálculo das derivadas de sinais é o da detecção do final do pico. Picos cromatográficos geralmente apresentam caudas, que são regiões onde os sinais variam suavemente, comprometendo a sensibilidade da detecção do final do pico pela variação das derivadas.⁽²⁹⁾ Desta forma nos programas computacionais de cálculo de área o erro no cálculo ocorre principalmente na determinação de final de picos assimétricos.

Na tentativa de contornar esta dificuldade foi explorado um método mais simples, que é o de uso da área compreendida entre o início e o ponto de máximo do pico cromatográfico, aqui denominada de SMA, do inglês Start to Maximum Area. A SMA foi implementada como sub-rotina

no programa disponível LECROM⁽²⁹⁾, que calcula áreas por somatório de fatias dos picos digitalizados.

V.2.1 - Comparação entre a SMA e o método convencional de cálculo de área.

Utilizando mesmas corridas cromatográficas foram comparados os resultados obtidos de áreas calculadas de forma convencional, ou seja, do início ao fim do pico cromatográfico (denominado neste trabalho por Área Total) e através da SMA. Curvas de calibração foram feitas para os pesticidas, individualmente e misturados, utilizando o DCE. Também foi testado o 1-octanol e 1-nonanol utilizando o detector por ionização em chama (DIC). No caso dos pesticidas os dados das curvas foram levantados com dois métodos quantitativos, os de Padronização Externa e Interna, para avaliações de eventuais efeitos de repetibilidade de injeções. Todos os picos estudados eram assimétricos, como mostrado na tabela V.1, pelos valores de suas assimetrias a 10% de altura⁽²⁴⁾. Para os pesticidas foram usados dois períodos de pulso do DCE.

Tabela V.1 - Valores de assimetria^a dos compostos utilizados para a comparação entre o método convencional e a SMA no cálculo da área cromatográfica.

Detector	Compostos					
	HCB	Heptaclor	Aldrin	Dieldrin	1-octanol	1-nonanol
DCE (15 μ s)	1,84	1,16	1,35	1,32	****	****
DCE (50 μ s)	1,80	1,09	1,34	1,26	****	****
DIC	****	****	****	****	4,80	4,90

(a) assimetria a 10%

Para os pesticidas analisados individualmente foram utilizados valores de temperatura do detector e vazão de gás make-up obtidos no estudo para a otimização da máxima sensibilidade do DCE. Como o estudo para otimização da sensibilidade do DCE para a mistura dos pesticidas ainda não havia sido concluída, estes compostos foram analisados nas seguintes condições cromatográficas:

- coluna: sílica fundida 3% fenil metil silicone WCOT HP-1 (Hewlett-Packard Corp., Avondale, PA), 5 metros de comprimento, di = 0,53 mm, df = 2,65 μ m.

- temperaturas: coluna: 185°C

detector: 231°C

injetor: 250°C

- gás de arraste: Nitrogênio super-seco a 5 ml/min

- gás make-up: Nitrogênio super-seco a 7 psi ou 4,5 ml/min

- condições de operação do DCE: 15 μ s e 50 μ s

- condicionamento do sinal: Pye Wide Range Amplifier (Pye Unicam Ltd.) conectado ao conversor A/D de 12 bit DACA (IBM Corp., Boca Raton, FL), com taxa de aquisição de 18.2044 elementos de sinal.s⁻¹.

Foram construídas curvas de calibração dos pesticidas em iso-octano utilizando os métodos de Padronização Externa e Interna. O método de preparação das soluções é descrito no capítulo VI. O padrão interno utilizado foi o Aldrin, cujo tempo de retenção é intermediário aos demais e apresenta estrutura semelhante aos outros pesticidas. A figura V.1 mostra o cromatograma desta análise.

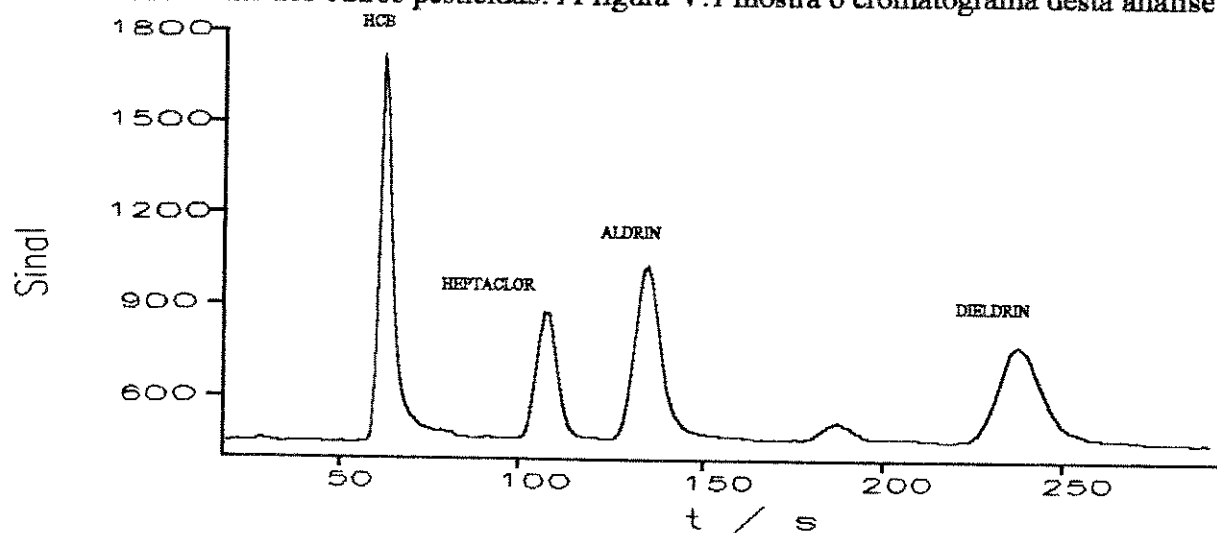


Figura V.1 - Cromatograma dos pesticidas obtidos utilizando período de pulso de 15 μ s

Os cromatogramas foram coletados com o programa LECROM. Após coletados, os cromatogramas foram analisados pelo programa ANA5.PAS, com os seguintes parâmetros:

- limite mínimo de inclinação para detecção de picos: 0 mv/s
- largura mínima para a confirmação de pico: 1 s
- alocação de tempos de retenção: polimônio de 2º grau com janela de regressão de 13 pontos
- filtro de ruído: não aplicado

Os resultados foram exportados para uma planilha de cálculo para processamento.

A análise dos álcoois foi realizada de forma similar aos pesticidas, sendo utilizado o cromatógrafo PU-104 equipado com DIC. As soluções foram preparadas em iso-octano e as condições cromatográficas foram:

- coluna: SE-30; 1,5 metros de comprimento; $d_i = 4,0$ mm
- temperaturas: coluna: 110°C (1-octanol) e 120°C (1-nonanol)
detector: 200°C e injetor: 200°C
- gás de arraste: 25 ml/min (1-octanol) e 30 ml/min (1-nonanol)
- vazões no detector: Hidrogênio: 40 ml/min e Ar: 600 ml/min
- ganho do amplificador: 10⁻⁹ A

- condicionamento do sinal: Pye Wide Range Amplifier (Pye Unicam Ltd.) conectado ao conversor A/D de 12 bit DACA (IBM Corp., Boca Raton, FL), com taxa de aquisição de 18.2044 elementos de sinal.s⁻¹.

Para todas as curvas de calibração foram feitos testes estatísticos para a verificação da validade do modelo SMA adotado, conforme descrito no item V.2.3 - Tratamento estatístico.

Nas páginas 43 a 54 (tabelas V.2 a V.6 e figuras V.2 a V.8) estão os resultados e as curvas de calibração obtidas pelo método de padronização externa. No item V.2.2 estão os valores dos coeficientes angulares, lineares e de correlação dos dados das curvas de calibração.

Tabela V.2 - Dados das curvas de calibração¹ de Aldrin, Dieldrin, Hexaclorobenzeno e Heptaclor: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr) e correspondentes massas injetadas dos pesticidas.

Aldrin							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
265,8	130364	2637	2	266,8	61716	1228	2
531,5	256746	80004	3	532,5	121376	2127	2
797,3	407851	*****	*	797,3	180055	7093	4
1063,0	482856	11644	2	1063,0	214350	8134	4
1328,8	605589	13491	2	1329,8	265034	707	2
Dieldrin							
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
28,6	75259	****	*	28,6	36644	***	*
85,9	301886	11951	4	85,9	144238	871	1
143,1	517084	21485	4	143,1	244760	12596	5
Hexaclorobenzeno							
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
24,2	39314	386	1	24,2	16871	608	4
48,5	81178	3005	4	48,5	32598	934	3
72,7	17518	175	0	72,7	46475	394	1
96,9	154922	7731	5	96,9	60878	1088	2
121,2	194136	6113	3	121,2	76712	1871	2
Heptaclor							
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
23,1	42792	215	1	23,1	21004	582	3
43,9	77109	3824	5	43,9	37755	935	3
87,8	163523	4572	3	87,8	81320	3173	4
131,6	250855	14075	6	131,6	127701	7139	6
175,5	322309	3139	1	175,5	162109	677	0
219,4	400294	12820	3	219,4	201718	9909	5

¹ injeções em triplicata

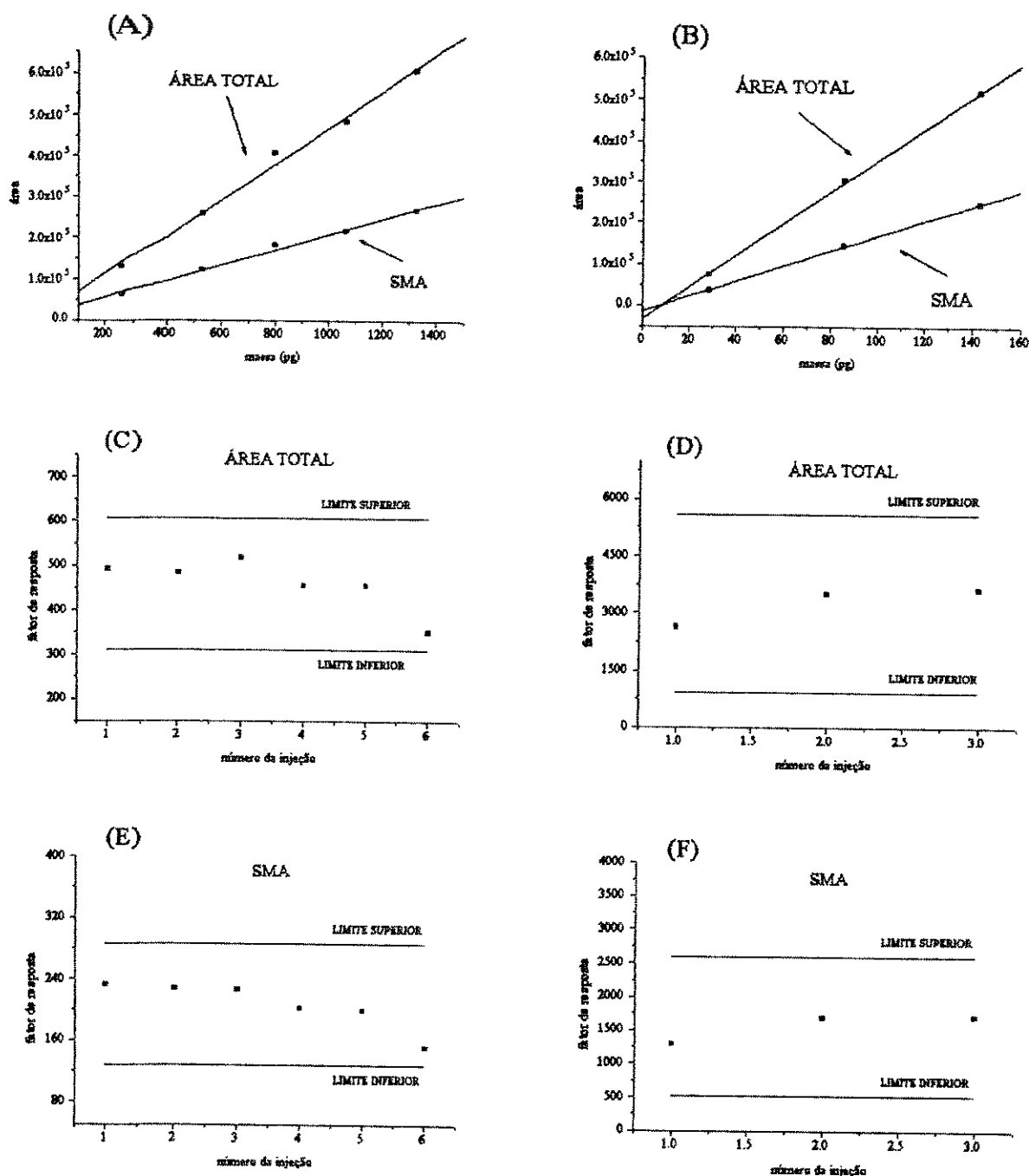


Figura V.2 - Curvas de calibração, A: para Aldrin e B: para Dieldrin. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados gerados a partir da área total e da SMA.

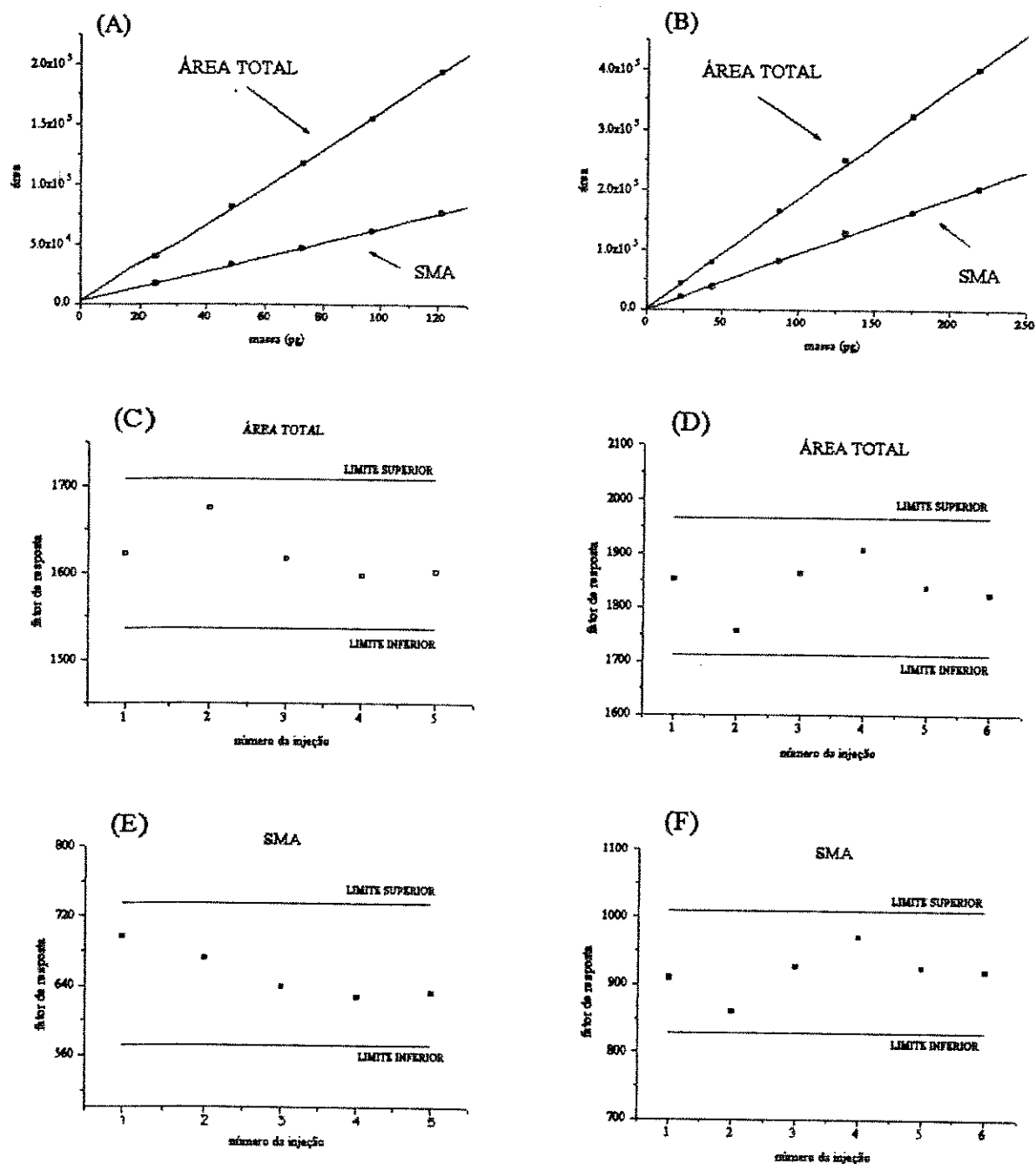


Figura V.3 - Curvas de calibração, A: para Hexaclorobenzeno e B: para Heptaclor. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados gerados a partir da área total e da SMA.

Tabela V.3 - Dados das curvas de calibração¹ do Dieldrin, quando misturado com os demais pesticidas, em diferentes períodos de pulso: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas dos pesticidas.

Período de pulso: 15 μ s							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
59,38	46682	3731	8	59,38	21388	1653	8
113,36	82691	14872	18	113,36	40685	3319	8
167,34	145231	12019	8	167,34	66589	4225	6
221,32	193878	28090	15	221,32	88564	9982	11
275,30	301111	9033	3	275,30	128059	14824	12
329,28	258252	*****	**	329,28	122116	*****	**
Período de pulso: 50 μ s							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
55,79	199262	9499	5	55,79	90443	1287	1
106,51	325776	29562	9	106,51	143882	1718	1
157,24	451827	37995	8	157,24	214171	21564	10
207,96	652704	63371	10	207,96	349899	8125	2
258,68	772913	39498	5	258,68	435899	5707	1
309,40	909311	19037	2	****	****	****	**

¹ injeções em triplicata

Tabela V.4 - Dados das curvas de calibração¹ do Hexaclorobenzeno, quando misturado com os demais pesticidas, em diferentes períodos de pulso: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas dos pesticidas.

Período de pulso: 15 μ s							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
5,17	4145	223	5	5,17	2253	47	2
56,85	48515	678	1	56,85	19226	802	4
108,53	104919	4187	4	108,53	40266	1033	3
160,22	160665	3926	2	160,22	63965	2635	4
211,90	212585	5871	3	211,90	83297	1728	2
263,58	276813	8386	3	263,58	125661	4442	4
Período de pulso: 50 μ s							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
3,21	11519	926	8	3,21	4341	155	4
35,34	133991	3783	3	35,34	54948	798	2
67,48	258406	13704	5	67,48	100125	4319	4
99,61	343169	20198	6	99,61	*****	***	*
131,87	438589	25456	6	131,87	213176	3287	2
163,87	503665	21063	4	163,87	269353	8937	3
196,00	519769	34107	7	196,00	307772	6068	2

¹ injeções em triplicata

Tabela V.5 - Dados das curvas de calibração¹ do Heptaclor, quando misturado com os demais pesticidas, em diferentes períodos de pulso: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas dos pesticidas.

Período de pulso: 15 μ s							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
60,66	23017	1151	5	60,66	10965	885	8
115,81	47401	752	2	115,81	22796	425	2
170,96	73472	2962	4	170,96	34671	1154	3
226,11	90925	6399	7	226,11	43558	3181	7
281,26	129353	10406	8	281,26	61811	3908	6
336,41	144641	****	*	336,41	67976	***	*
Período de pulso: 50 μ s							
Área Total				SMA			
m (pg)	área	s	s _r	m (pg)	área	s	s _r
4,62	5470	****	*	4,62	2762	***	*
50,85	70910	1694	2	50,85	31684	33	0
97,08	120296	238	0	97,08	60465	400	1
143,31	183650	1730	1	143,31	91599	210	0
235,77	312704	2590	1	235,77	152328	4009	3
282,00	357426	22	0	282,00	182084	10934	6

¹ injeções em triplicata

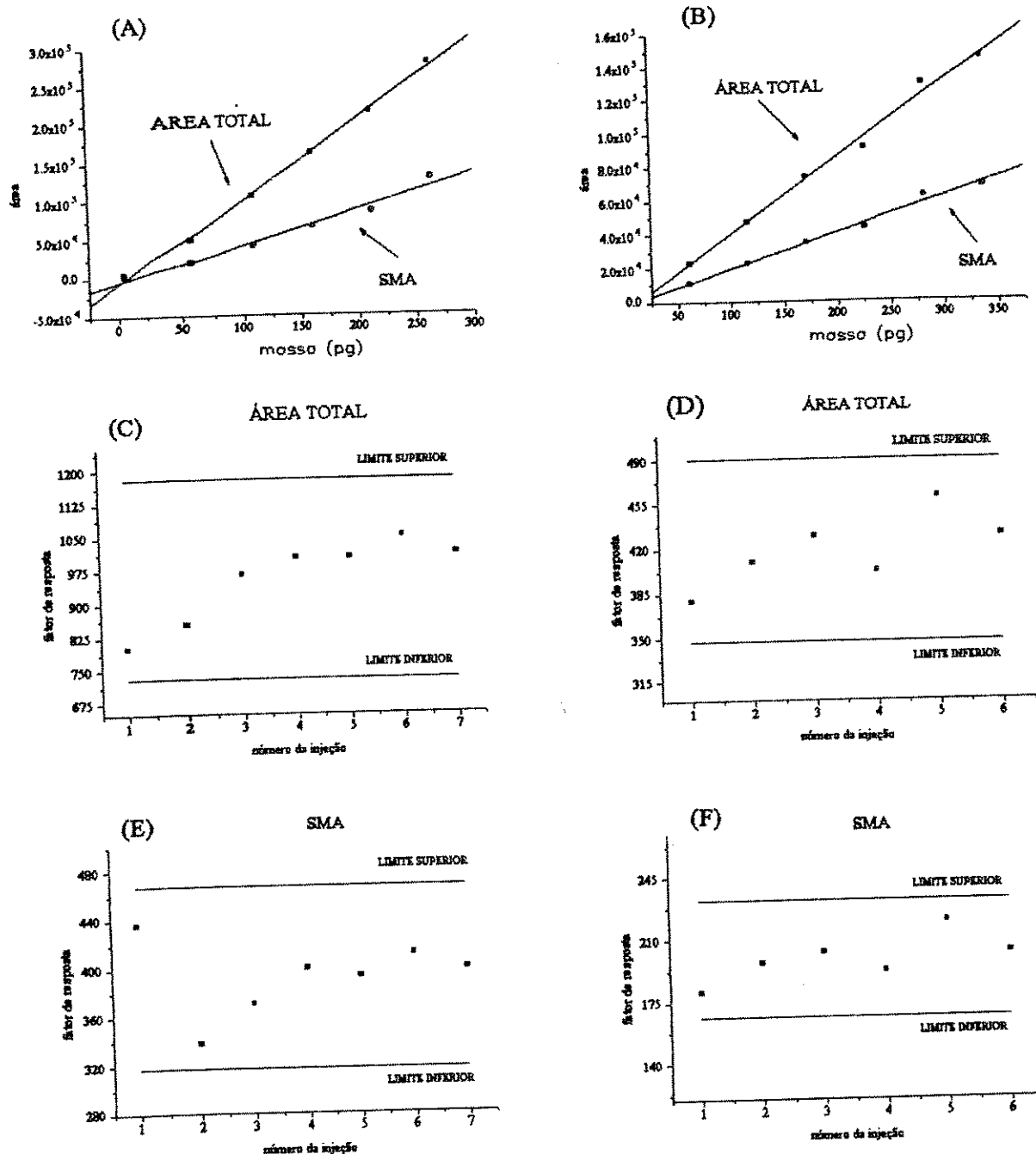


Figura V.4 - Curvas de calibração, A: para Hexaclorobenzeno e B: para Heptaclor. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número de injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t.

Todos os dados gerados a partir da área total e SMA.

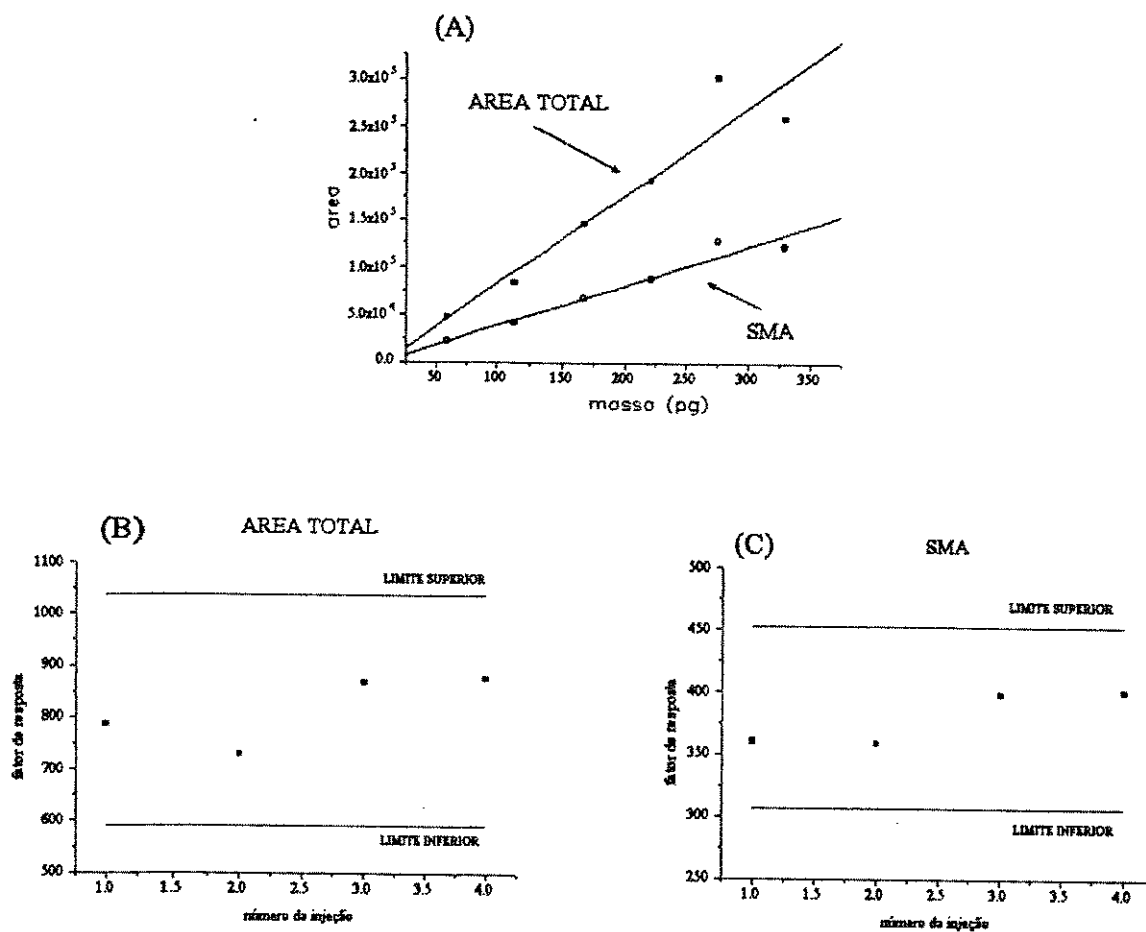


Figura V.5 - Curvas de calibração, A: para Dieldrin. B e C: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados gerados a partir da área total e SMA.

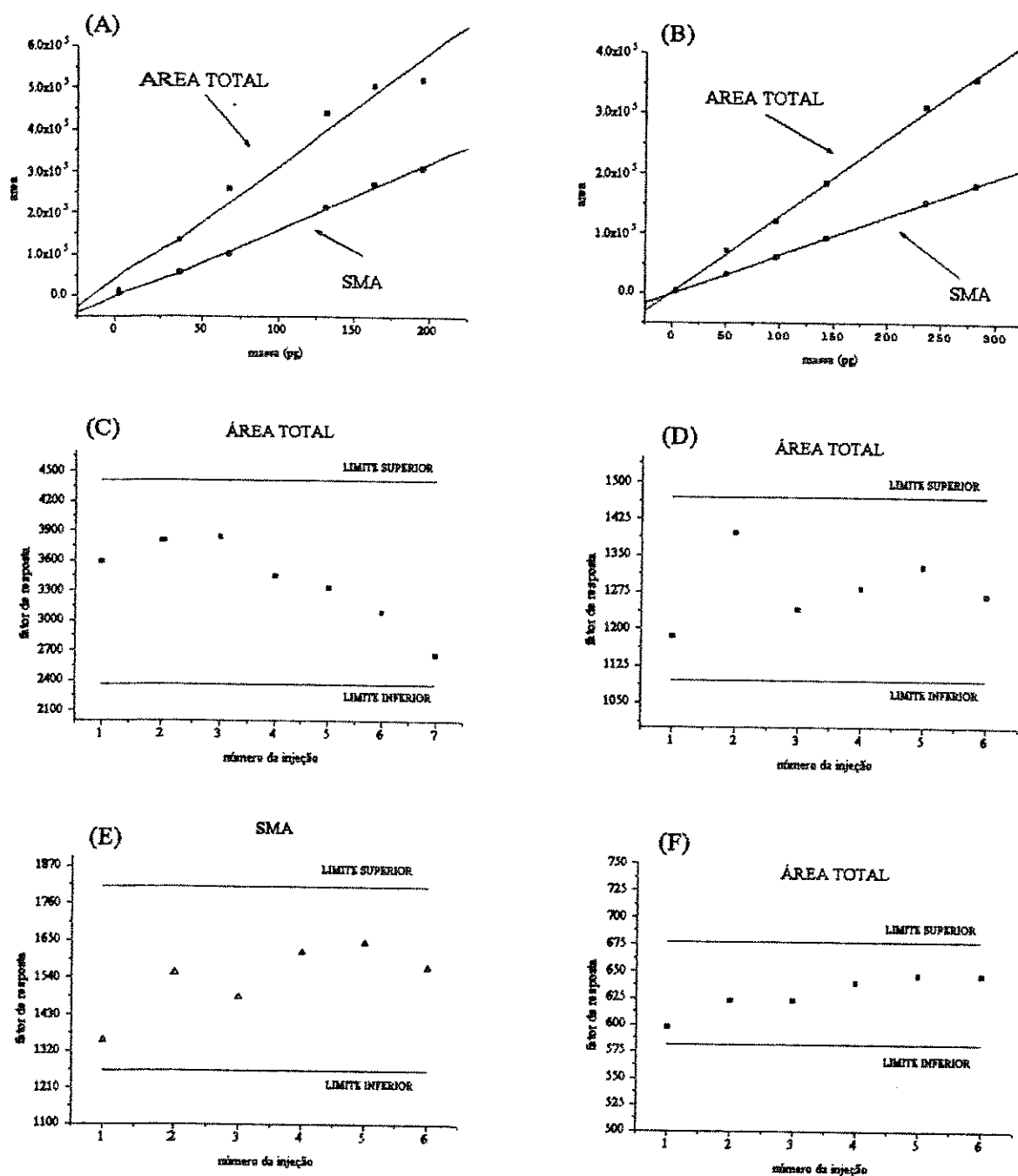


Figura V.6 - Curvas de calibração, A: para Hexaclorobenzeno e B: para Heptaclor. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados gerados a partir da área total e SMA.

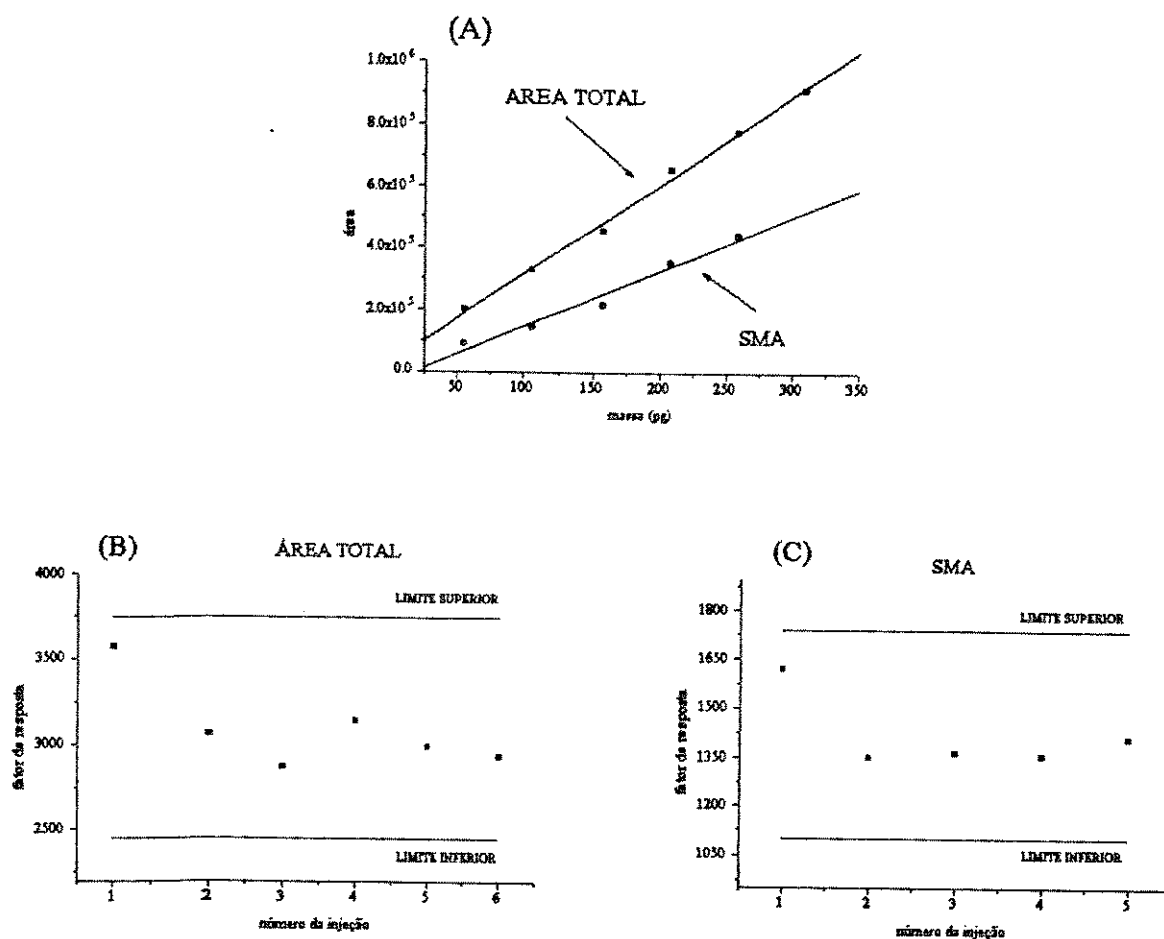


Figura V.7 - Curvas de calibração, A: para Dieldrin. B e C: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados gerados a partir da área total e SMA.

Tabela V.6 - Dados das curvas de calibração¹ dos Álcoois: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas dos pesticidas.

1-nonanol							
Área Total				SMA			
m (g)	área	s	s _r	m (g)	área	s	s _r
0,238	64785,7	1193	2	0,238	16784	219	1
0,477	127803,3	1245	1	0,477	33703	703	2
0,715	188424,5	3286	2	0,715	50167	1056	2
0,953	240524,0	2477	1	0,953	66533	416	1
1,192	289126,3	2116	1	1,192	81621	585	1
1,430	334088,7	7835	2	1,430	94829	2786	3
1-octanol							
Área Total				SMA			
m (g)	área	s	s _r	m (g)	área	s	sr
0,287	76950	846	1	0,287	18463	175	1
0,575	154629	1804	1	0,575	37035	171	1
0,862	211438	1344	1	0,862	52789	568	1
1,149	278481	1266	1	1,149	69952	2003	3
1,437	334370	8699	3	1,437	86246	3015	4
1,724	394543	6493	2	1,724	102280	943	1

¹ injeções em triplicata

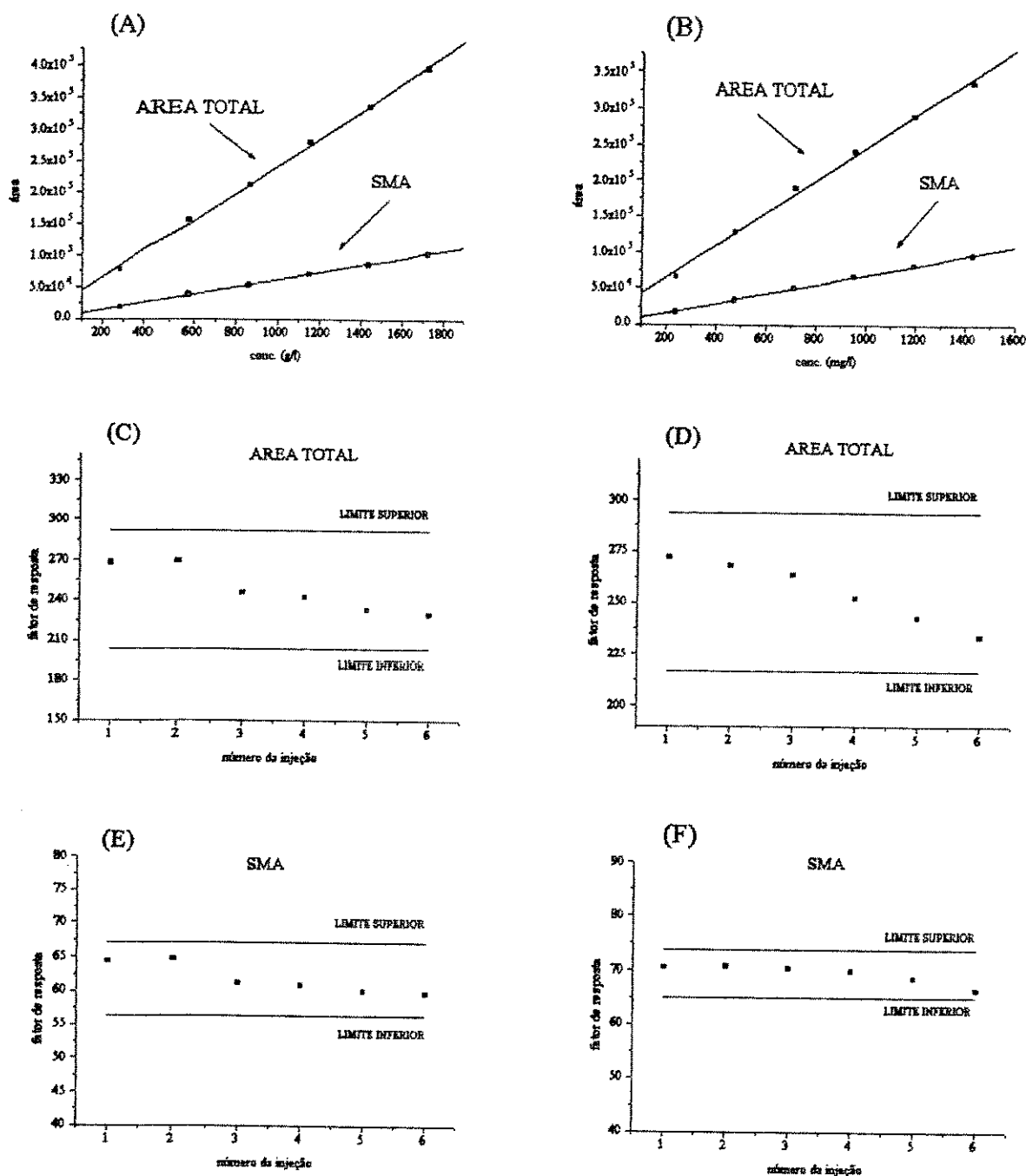


Figura V.8 - Curvas de calibração, A: para 1-octanol e B: para 1-nonanol. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados gerados a partir da área total e da SMA.

Objetivando eliminar problemas de precisão nas injeções das amostras, foram feitas curvas de calibração utilizando o método de padronização interna. As mesmas corridas cromatográficas foram

usadas para o cálculo das áreas via Área Total e SMA. As tabelas V.7 a V.9 e as figuras V.9 a V.12 exprimem os resultados e as curvas de calibração obtidos.

Tabela V.7 - Dados das curvas de calibração¹ para Dieldrin, quando misturado aos demais pesticidas, utilizando o método de padronização interna: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas de Dieldrin.

período de pulso 15 μ s							
Área Total				SMA			
razão de massa	razão de área	s	sr	razão de massa	razão de área	s	sr
0,62	0,5421	0,0601	11,1	0,62	0,5446	0,0570	10,5
1,18	0,9552	0,1567	16,4	1,18	1,0489	0,8332	7,9
1,74	1,6202	0,1289	8,0	1,74	1,6404	0,1216	7,4
2,31	2,3197	0,1074	4,6	2,31	2,3075	0,0820	3,6
2,87	3,0021	0,0927	3,1	2,87	3,0337	0,1924	6,3
3,43	3,0164	*****	***	3,43	3,0640	*****	***
período de pulso 50 μ s							
Área Total				SMA			
razão de massa	razão de área	s	sr	razão de massa	razão de área	s	sr
1,17	1,1267	0,1017	9,0	1,17	1,1315	0,0333	2,9
2,23	1,9252	0,0773	4,0	2,23	1,9181	0,1967	10,2
3,30	2,9736	0,2017	6,8	3,30	*****	*****	***
4,36	3,9491	0,3082	7,8	4,36	*****	*****	***
5,43	4,5489	0,3890	8,6	5,43	4,2550	0,3651	8,6
6,49	4,8366	0,0821	1,7	6,49	5,0656	0,2543	5,0

¹ injeções em triplicata

Tabela V.8 - Dados das curvas de calibração¹ para Hexaclorobenzeno, quando misturado aos demais pesticidas, utilizando o método de padronização interna: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas de Dieldrin.

período de pulso 15 μ s							
área Total				SMA			
razão de massa	razão de área	s	s _r	razão de massa	razão de área	s	s _r
0,054	0,0524	0,0051	9,7	0,054	0,0552	0,0042	7,6
0,59	0,5791	0,0385	6,7	0,59	0,4985	0,0190	3,8
1,13	1,2139	0,0104	0,9	1,13	1,0393	0,0652	6,3
1,67	1,7925	0,0361	2,0	1,67	1,5755	0,0804	5,1
2,21	2,5630	0,1919	7,5	2,21	2,1810	0,1393	6,4
2,75	2,9316	0,1404	4,8	2,75	2,5768	0,1308	5,1
3,28	3,7228	*****	***	3,28	3,1530	*****	***
período de pulso 50 μ s							
Área Total				SMA			
razão de massa	razão de área	s	s _r	razão de massa	razão de área	s	s _r
0,067	0,0746	0,0020	2,6	0,067	0,0646	0,02505	3,6
0,74	0,7788	0,0251	3,2	0,74	0,6944	0,06164	4,7
1,42	1,5295	0,0438	2,9	1,42	1,3097	0,06239	3,3
2,09	2,1919	0,0774	3,5	2,09	1,9178	0,15309	6,0
2,77	2,4164	0,0746	3,1	2,77	2,5597	0,01400	0,45
3,44	2,9259	0,0543	1,9	3,44	3,1115	0,01534	3,1
4,11	2,8384	0,0852	3,0	4,11	3,4362	*****	***

¹ injeções em triplicata

Tabela V.9 - Curva de calibração¹ para Heptaclor, quando misturado aos demais pesticidas, utilizando o método de padronização interna: áreas, estimativas do desvio padrão (s) e do desvio padrão relativo (sr), e correspondentes massas injetadas de Dieldrin.

período de pulso 15 μ s							
Área Total				SMA			
razão de massa	razão de área	s	s _r	razão de massa	razão de área	s	s _r
0,63	0,2741	0,0036	1,3	0,63	0,2840	0,0170	6,0
1,21	0,5488	0,0172	3,1	1,21	0,5882	0,0294	5,0
1,78	0,8196	0,0252	3,1	1,78	0,8538	0,0328	3,8
2,36	1,0930	0,0355	3,2	2,36	1,1378	0,0532	4,7
2,93	1,3665	0,0208	1,5	2,93	1,4681	0,0625	4,3
3,50	1,6894	*****	***	3,50	1,7056	*****	***
período de pulso 50 μ s							
Área Total				SMA			
razão de massa	razão de área	s	s _r	razão de massa	razão de área	s	s _r
0,097	0,0370	0,0075	1,9	0,097	0,0401	0,0001	0,0
1,066	0,4003	0,0546	7,6	1,066	0,4085	0,0700	8,6
2,036	0,7221	0,0083	0,7	2,036	0,8183	0,0761	5,8
3,006	1,2094	0,0294	2,0	3,006	1,3128	0,0637	3,8
3,98	1,5070	0,0482	2,6	3,98	1,6677	0,0672	3,6
4,94	1,8385	0,0720	3,8	4,94	1,8495	0,0391	1,9
5,91	1,9019	*****	***	5,91	2,0728	*****	***

¹ injeções em triplicata

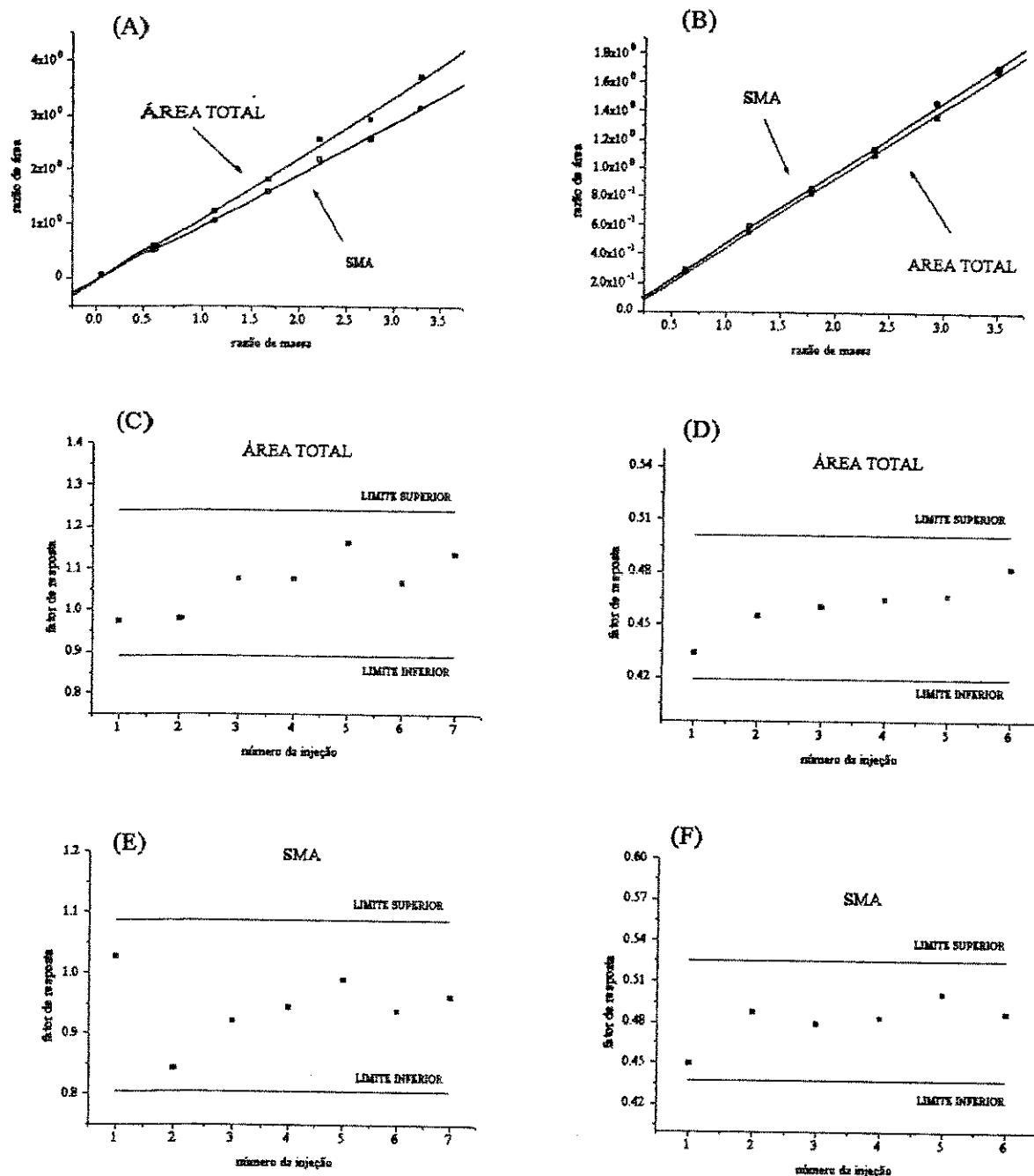


Figura V.9 - Curvas de calibração utilizando método da padronização interna A: para Hexaclorobenzeno e B: para Heptaclor. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados a partir da área total e da SMA.

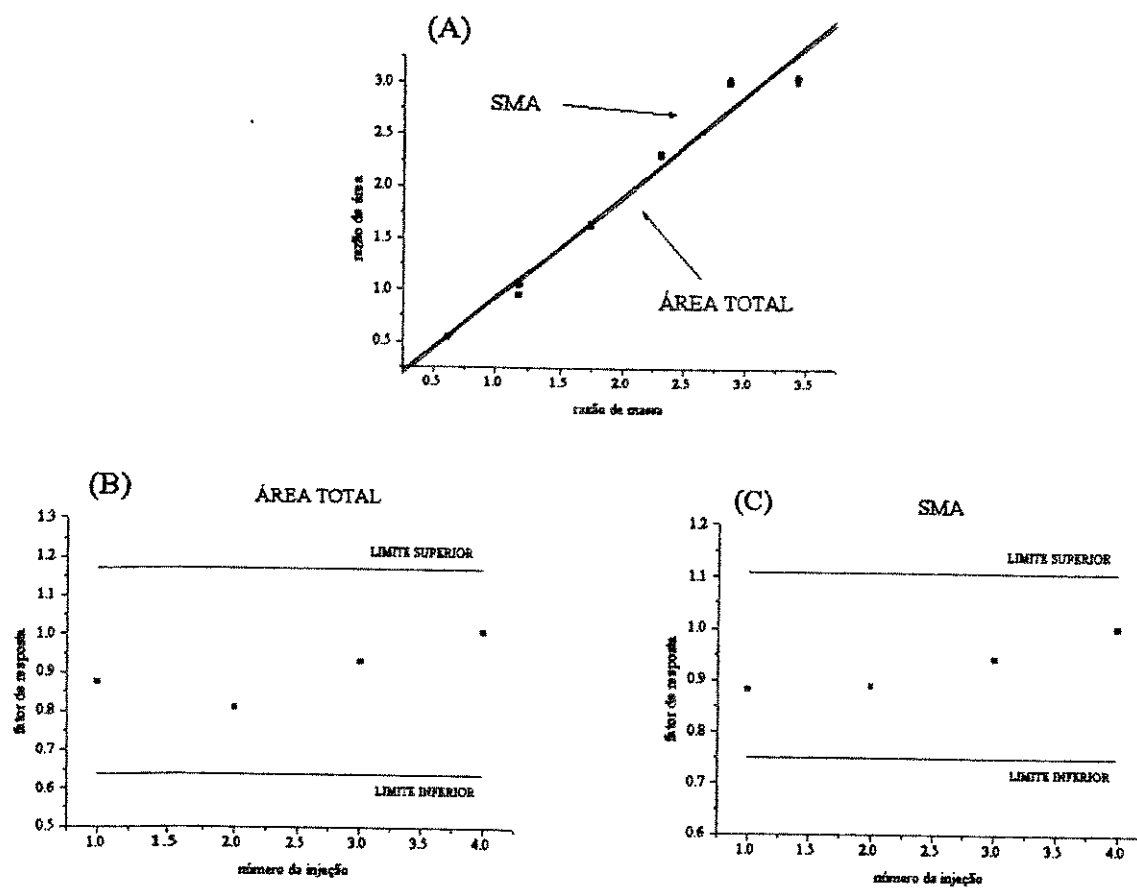


Figura V.10 - Curvas de calibração utilizando método da padronização interna A: para Dieldrin. B e C: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados a partir da área total e da SMA.

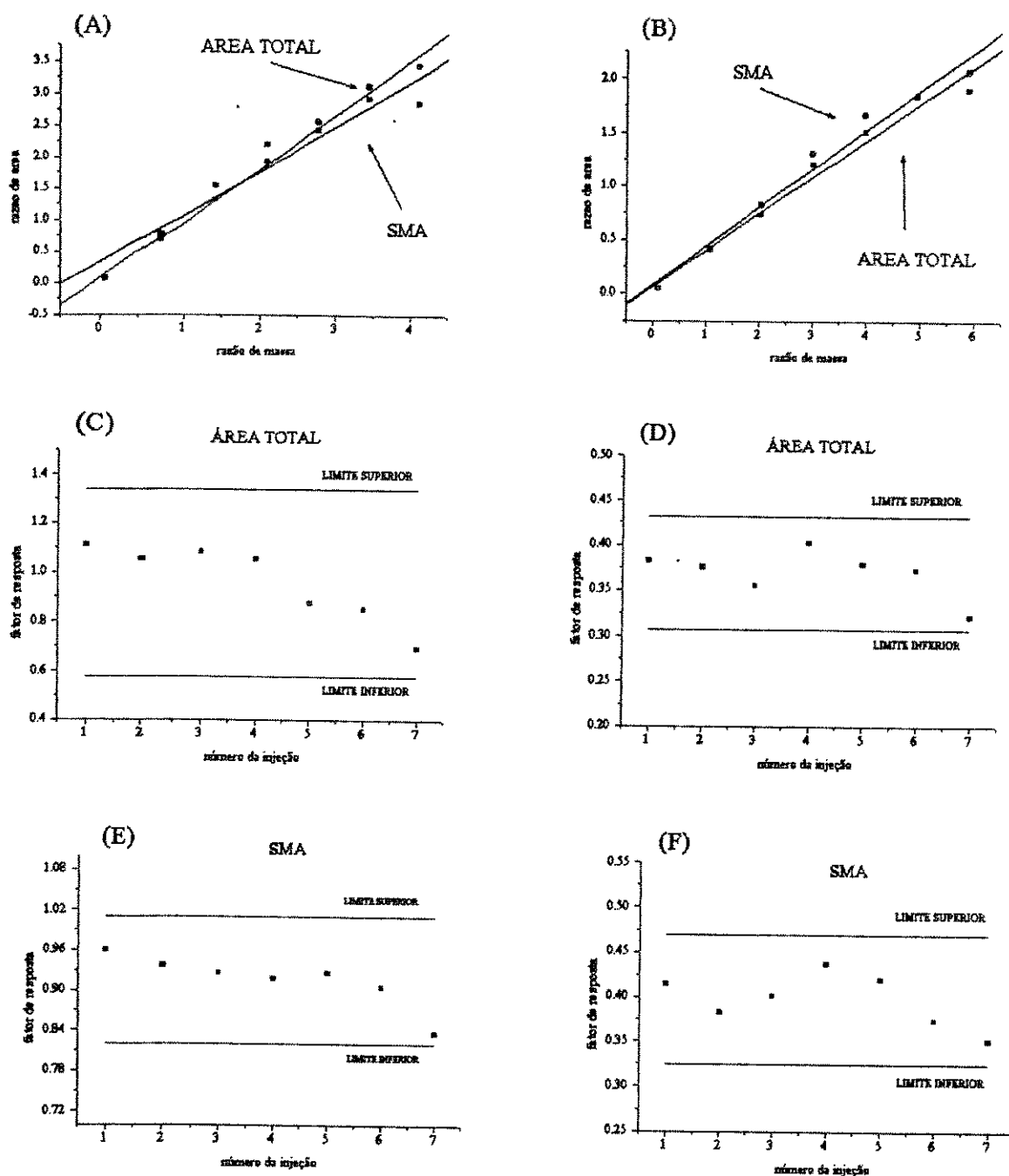


Figura V.11 - Curvas de calibração utilizando método da padronização interna A: para Hexaclorobenzeno e B: para Heptaclor. C a F: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados a partir da área total e da SMA.

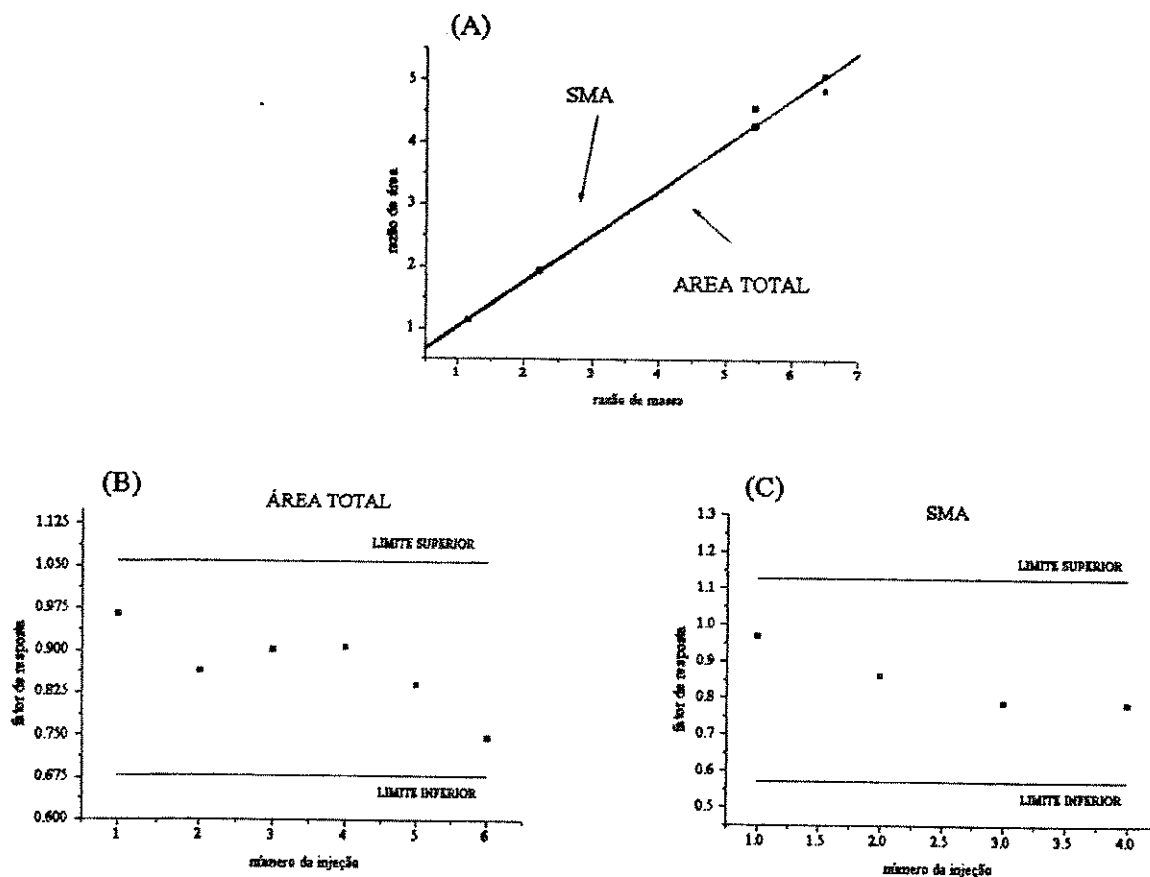


Figura V.12 - Curvas de calibração utilizando método da padronização interna A: para Dieldrin. B e C: curvas de Fator de Resposta versus número da injeção e respectivos limites de confiança para 95% do teste-t. Todos os dados a partir da área total e da SMA.

A validade do uso da SMA foi testada pela comparação entre os coeficientes lineares e os coeficientes de correlação das curvas de calibração obtidas anteriormente.

V.2.2 - Interpretação dos resultados

Em ambos os casos, com o uso da padronização externa ou interna, era esperado uma melhor linearidade da regressão quando utilizada a SMA, devido as suposições deste método estar isento de erros de determinação de final de picos cromatográficos.

As tabelas V.10 a V.12 mostram as regressões das curvas obtidas pela padronização externa e interna, e o ganho ou perda no valor do coeficiente de correlação.

Tabela V.10 - Coeficientes angulares, lineares e de correlação obtidos pelo método de padronização externo para cada pesticida analisado individualmente e para os álcoois.

Área Total				SMA			
	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	ganho ^a
Aldrin	442,7	23717,7	0,99544	188,0	18622,9	0,99568	+0,02
Dieldrin	3858,7	-33311,6	0,99989	1817,6	-14215,2	0,99981	+0,0080
HCB	581,6	2397,2	0,99976	610,4	2318,7	0,99974	-0,0020
Heptaclor	1837,5	830,8	0,99948	931,5	-498,8	0,99914	-0,034
1octanol	218,2	22311,9	0,99884	58,31	2568,19	0,99981	+0,10
1nonanol	225,7	19200,4	0,99773	65,97	2238,67	0,99913	+0,14

^a aumento (+) ou redução (-) do coeficiente de correlação com o uso da SMA

Tabela V.11 - Coeficientes angulares, lineares e de correlação obtidos pelo método de padronização externa para cada pesticida das misturas.

período de pulso: 15 μ s							
Área Total				SMA			
	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	ganho ^a
Dieldrin	933,9	-13954,8	0,99525	421,3	-4827,5	0,99858	+0,33
HCB	1042,1	-6047,5	0,99917	409,0	-2246,3	0,99910	-0,0070
Heptaclor	415,5	-4828,7	0,99546	212,9	-1975,6	0,99488	-0,058
período de pulso: 50 μ s							
Área Total				SMA			
	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	ganho ^a
Dieldrin	2868,6	28172,0	0,99765	1362,3	4978,8	0,99821	+0,056
HCB	3306,3	13952,4	0,99663	1653,2	-4449,2	0,99928	+0,26
Heptaclor	1285,2	803,2	0,99912	649,4	-1244,6	0,99994	+0,082

^a aumento (+) ou redução (-) do coeficiente de correlação com o uso da SMA

Tabela V.12 - Coeficientes angulares, lineares e de correlação obtidos pelo método de padronização interna para cada pesticida nas misturas.

período de pulso: 15 μ s							
Área Total				SMA			
	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	ganho ^a
Dieldrin	1,0667	-0,200	0,99370	1,0458	-0,144	0,99809	+0,44
HCB	1,1321	-0,0529	0,99819	0,9678	-0,0327	0,99922	+0,010
Heptaclor	0,4875	-0,0430	0,99912	0,4889	-0,0256	0,99941	-0,015
período de pulso: 50 μ s							
Área Total				SMA			
	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	coef. angular	coef. linear	coef. de correlação	ganho ^a
Dieldrin	0,8944	0,0197	0,99857	0,7377	0,268	0,99998	+0,14
HCB	1,0539	0,0074	0,99973	0,9211	0,00511	0,99997	+0,024
Heptaclor	0,3776	0,000469	0,99818	0,4290	-0,240	0,99869	+0,051

^a aumento (+) ou redução (-) do coeficiente de correlação com o uso da SMA

A análise das curvas de calibração obtidas a partir das soluções individuais dos compostos, tabela V.10, indica que os coeficientes de correlação e lineares das retas melhoram ou permanecem praticamente inalterados quando utilizadas as SMA ao invés das Áreas Totais. Uma pequena piora na linearidade ocorreu para o Heptaclor cuja assimetria é a mais próxima da unidade. As tabelas V.2 e V.6 indicam que as estimativas dos desvios padrões relativos das áreas (s_r) são, de forma geral, menores quando utilizadas as SMA.

A análise das curvas de calibração obtidas com a mistura dos compostos, tabelas V.11 e V.12, indica melhoras dos coeficientes de regressão e lineares, quando usadas as SMA. Também neste caso houve pequena piora no coeficiente de regressão para o Heptaclor. As tabelas V.3 a V.5 e V.7 a V.9 mostram que, com excessão do Heptaclor, a tendência dos desvios padrões relativos das áreas é a de serem menores com o uso das SMA.

Conclui-se que os coeficientes de correlação tendem a ser mais próximos da unidade quando utilizam-se as SMA. Note-se que quando ocorre o inverso, as diferenças entre os coeficientes de correlação obtidos com as SMA e as Áreas Totais são muito pequenas. A tendência de melhores coeficientes de correlação obtidos com as SMA é indicação de melhores repetibilidades entre injeções em triplicatas.

Outra importante constatação foi a tendência dos coeficientes lineares aproximarem-se mais das origens das curvas de calibração quando são usadas as SMA. Isto também sugere que erros nos cálculos das áreas menores também são minimizados pelo método da SMA.

Em alguns casos houve aparente aumento de faixa dinâmica linear. As figuras V.5A, V.6A e V.11A ilustram este fato, o qual pode ser atribuído a melhoras nas medidas das áreas de picos quando utilizada a SMA.

V.2.3 - Tratamento Estatístico (relativa as referências 23, 34, 35, 36)

Os dados obtidos durante a construção de curvas de calibração foram ajustados a modelos lineares teóricos os quais deveriam fornecer a melhor curva possível. A aceitação ou não desses modelos é frequentemente feita através da análise de variância (ANOVA).

Como discutido no capítulo IV, item 2.3.4, a análise de variância utiliza a soma dos quadrados (SQ) das fontes de variações do modelo dividida pelos respectivos graus de liberdade. Esta relação é chamada de média quadrática (MQ), e é estatisticamente igual a estimativa da variância (s^2). As médias quadradas podem ser utilizadas para testar hipóteses sobre os modelos adotados. No capítulo IV foi discutido a variância de Fisher para a regressão. Neste capítulo será discutido a razão de F para a falta de ajuste, a qual determina se o modelo adotado é estatisticamente significativo para a falta de ajuste. Este teste é calculado como:

$$F_{fa} = \frac{s_{fa}^2}{s_{ep}^2} \quad (\text{equação V.5})$$

Sendo ep erro puro e fa falta de ajuste.

A tabela V.13, a qual é uma complementação da tabela IV.14, mostra como fazer os cálculos para determinar o teste F para falta de ajuste.

Quanto maior o valor numérico de $F_{falta\ de\ ajuste}$ maior é a certeza de que o modelo apresenta uma real falta de ajuste. A esta razão de F também está associado um nível de confiança, e para que o modelo seja significativo, o valor tabelado deverá ser maior que o valor de F calculado.

As tabelas V.14 a V.16 apresentam os resultados da ANOVA para todas as curvas de calibração adotadas neste capítulo.

Tabela V.13 - Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados. Sendo, n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos; $n = \sum n_i$; xm = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Número de Graus de Liberdade	Média Quadrática
Falta de Ajuste	$SQ_{fa} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{fa} = SQ_{fa} / (m - p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$

Tabela V.14 - Análise de variância para as curvas de calibração dos pesticidas analisados isoladamente e dos álcoois.

Área Total						
	GL ^a ($\nu_1; \nu_2$)	Freg.	Ftabelado	GL ($\nu_1; \nu_2$)	F falta de ajuste	F tabelado
Aldrin	1; 11	580,35	4,75	3; 7	3,82	4,07
Dieldrin	1; 5	415,47	6,61	1; 4	0,072	7,71
HCB	1; 13	816,55	4,67	3; 10	0,11	3,71
Heptaclor	1; 14	1276,98	4,60	4; 10	0,32	3,48
1octanol	1; 15	1533,10	4,54	4; 11	2,12	3,36
1nonanol	1; 15	964,61	4,54	4; 11	3,94	3,36
SMA						
	GL ^a ($\nu_1; \nu_2$)	Freg.	Ftabelado	GL ($\nu_1; \nu_2$)	F falta de ajuste	F tabelado
Aldrin	1; 12	341,37	4,54	3; 8	3,36	4,07
Dieldrin	1; 5	346,15	6,61	1; 4	0,10	7,71
HCB	1; 13	11116,46	4,67	3; 10	0,31	3,71
Heptaclor	1; 14	798,56	4,60	4; 10	0,34	3,48
1octanol	1; 15	2204,76	4,54	4; 11	0,19	3,36
1nonanol	1; 14	1537,69	4,60	4; 10	1,01	3,48

^a G.L. = graus de liberdade

Tabela V.15 - Análise de variância para as curvas de calibração dos pesticidas analisados conjuntamente, utilizando método do padrão externo.

Área Total						
	G.L. ^a ($\nu_1; \nu_2$)	Freg.	F _{tabelado}	G.L. ($\nu_1; \nu_2$)	F _{falta de ajuste}	F _{tabelado}
Dieldrin (15 μ s)	1; 9	43,28	5,12	2; 7	0,18	4,74
HCB (15 μ s)	1; 16	1763,96	4,49	5; 11	1,02	3,20
Heptaclor (15 μ s)	1; 14	253,03	4,60	4; 10	0,77	5,96
Dieldrin (50 μ s)	1; 11	319,48	4,84	4; 7	0,33	4,12
HCB (50 μ s)	1; 13	307,40	4,67	3; 10	1,01	3,71
Heptaclor (50 μ s)	1; 9	2482,04	5,12	4; 5	16,48	5,19
SMA						
	G.L. ^a ($\nu_1; \nu_2$)	Freg.	F _{tabelado}	G.L. ($\nu_1; \nu_2$)	F _{falta de ajuste}	F _{tabelado}
Dieldrin (15 μ s)	1; 9	83,15	5,12	2; 7	0,099	4,74
HCB (15 μ s)	1; 6	6,21	4,49	5; 11	0,75	3,20
Heptaclor (15 μ s)	1; 14	274,16	4,60	4; 10	0,19	5,96
Dieldrin (50 μ s)	1; 8	570,11	5,32	3; 5	0,86	5,41
HCB (50 μ s)	1; 11	1311,69	4,84	3; 8	0,90	4,07
Heptaclor (50 μ s)	1; 10	928,13	4,96	4; 6	0,018	4,53

^a G.L. = graus de liberdade

Tabela V.16 - Análise de variância para as curvas de calibração dos pesticidas analisados conjuntamente, utilizando método do padrão interno.

Área Total						
	G.L. ^a ($\nu_1; \nu_2$)	Freg.	Ftabelado	G.L. ($\nu_1; \nu_2$)	F falta de ajuste	F tabelado
Dieldrin (15 μ s)	1; 9	95,97	5,12	2; 7	0,73	4,74
HCB (15 μ s)	1; 17	785,17	4,45	5; 12	0,76	3,11
Heptaclor (15 μ s)	1; 14	2481,96	4,60	4; 10	0,57	5,96
Dieldrin (50 μ s)	1; 7	165,07	5,59	2; 5	0,17	5,79
HCB (50 μ s)	1; 9	1077,56	5,12	2; 7	0,27	4,74
Heptaclor (50 μ s)	1; 7	520,93	5,59	3; 4	0,41	6,59
SMA						
	G.L. ^a ($\nu_1; \nu_2$)	Freg.	Ftabelado	G.L. ($\nu_1; \nu_2$)	F falta de ajuste	F tabelado
Dieldrin (15 μ s)	1; 9	199,55	5,12	2; 7	0,73	4,74
HCB (15 μ s)	1; 17	989,66	4,45	5; 12	0,30	3,11
Heptaclor (15 μ s)	1; 14	589,51	4,60	4; 10	0,24	5,96
Dieldrin (50 μ s)	1; 6	263,54	5,99	2; 4	0,0029	6,94
HCB (50 μ s)	1; 10	948,17	4,96	3; 7	0,013	4,35
Heptaclor (50 μ s)	1; 9	903,08	5,12	4; 5	1,70	5,19

^a G.L. = graus de liberdade

Todos os testes F para regressão e falta de ajuste foram significativos, exceto para Heptaclor a 50 μ s (tabela V.15) cujo valor calculado de F para falta de ajuste foi maior que o tabelado. Porém,

apesar deste resultado, o modelo adotado é estatisticamente significativo. Isto pode ser concluído pela observação dos baixos valores de estimativa de desvio padrão relativo deste composto apresentado na tabela V.5. Isto significa que a precisão dos experimentos foi muito boa e consequentemente a variância do erro experimental é muito pequena. Assim, quando o denominador da equação 5 é baixo, resulta em valores altos de F para a falta de ajuste, cuja a interpretação deve ser muito cuidadosa.

Outro tratamento estatístico aplicado aos dados das curvas de calibração foi o teste t com 95% de confiabilidade. Este tratamento pode ser visualizado junto as figuras V.2 a V.12 as quais mostram os limites superior e inferior da média dos fatores de resposta de cada composto. Em todos os casos, os fatores de resposta estão dentro dos limites de confiança e portanto aumentam a confiabilidade das curvas de calibração.

VI - Modo de preparação das soluções para a análise quantitativa

Foi adotado o método de adicionar volumes iguais de solução e de solvente, com uma seringa Hamilton de 250,0 microlitros com o êmbolo travado em uma posição fixa, como tentativa de contornar os problemas de precisão nas medidas de volumes.⁽³⁷⁾

Com este método de diluição, foram preparadas baterias de soluções padrão por dois modos diferentes. Pelo primeiro, as soluções diluídas foram obtidas pela adição de solvente à uma mesma solução estoque. Pelo segundo modo, cada solução era diluída a partir da solução anterior, ou seja, por diluição sucessiva.

As tabelas VI.1 e VI.2 contêm os parâmetros das regressões lineares das curvas de calibração obtidas com as duas baterias de soluções utilizando, respectivamente, períodos de pulso do DCE de 15 μ s e 50 μ s. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas no estudo da SMA como um novo parâmetro de cálculo de área - capítulo V.

As faixas de concentrações dos compostos utilizados para o estudo do melhor modo de preparar as soluções foram aproximadamente as mesmas e o critério de comparação foi a linearidade, verificada pelas comparações dos coeficientes de correlação obtidos para cada composto nas duas formas de diluição. Testes de análise de variância (teste F para regressão e falta de ajuste) indicaram que os modelos adotados de curvas de calibração foram significantes a um nível de 95% de confiabilidade.

Tabela VI.1 - Tabela comparativa entre os modos de diluição à volume fixo utilizando 15 μ s de período de pulso.

Diluição à partir da solução estoque			
	HCB	Heptaclor	Dieldrin
coeficiente angular	1042,1	451,5	933,9
coeficiente linear	-6047,5	-4828,7	-13954,8
coeficiente de correlação	0,9992	0,9955	0,9952
Diluição sucessiva			
	HCB	Heptaclor	Dieldrin
coeficiente angular	1390,8	470,9	796,8
coeficiente linear	2141,2	883,8	-8481,9
coeficiente de correlação	0,9981	0,9997	0,9992

Tabela VI.2 - Tabela comparativa entre os modos de diluição à volume fixo utilizando 50 μ s de período de pulso.

Diluição a partir da solução estoque			
	HCB	Heptaclor	Dieldrin
coeficiente angular	3306,3	1285,2	2868,6
coeficiente linear	13952,4	803,2	28172,0
coeficiente de correlação	0,9966	0,9976	0,9991
Diluição sucessiva			
	HCB	Heptaclor	Dieldrin
coeficiente angular	1211,7	1138,3	2586,5
coeficiente linear	2281,7	5281,5	-11346,2
coeficiente de correlação	0,9996	0,9988	0,9987

Devido à proximidade dos coeficientes de correlação das curvas de calibração para cada composto, nas duas formas de preparo de soluções, foi concluído que os dois modos são bons para a preparação das soluções. Contudo optou-se pelo método de diluição a partir da solução estoque, porque ele facilita distribuir as concentrações para adequarem-se às curvas de calibração. A figura VI.1 e VI.2 compara as curvas de calibração obtidas nos dois modos de preparação.

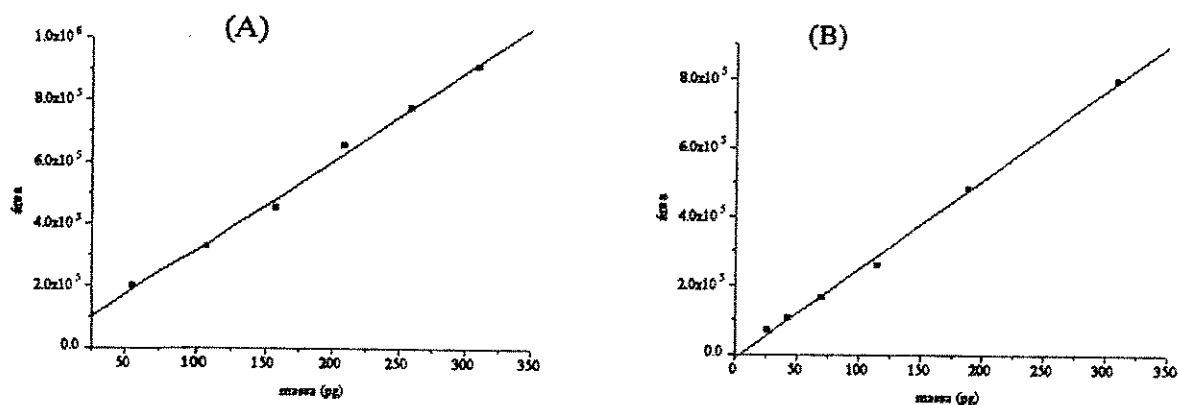


Figura VI.1 - Comparação entre duas curvas de calibração do Dieldrin, cujas soluções foram preparadas de dois modos de diluição diferentes. A: diluição a partir da solução estoque, B: diluição sucessiva.

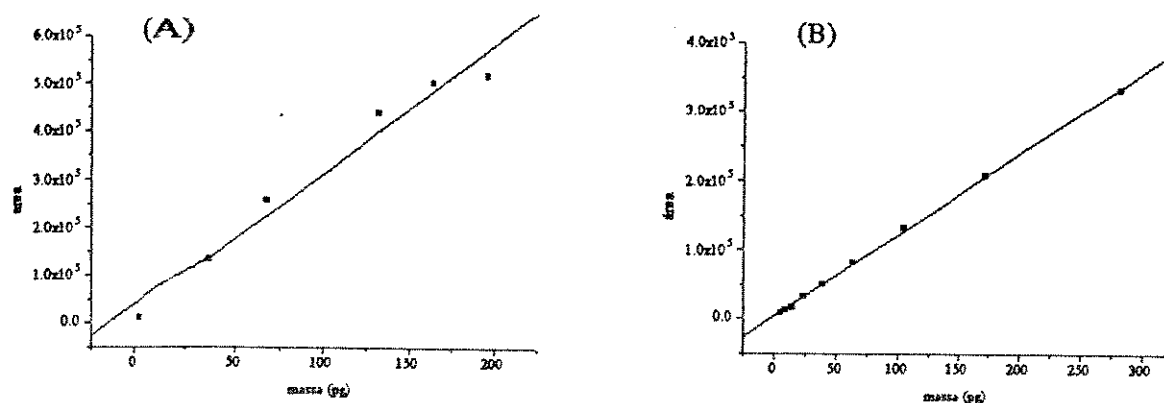


Figura VI.2 - Comparação entre duas curvas de calibração do Hexaclorobenzeno, cujas soluções foram preparadas de dois modos de diluição diferentes. A: diluição a partir da solução estoque, B: diluição sucessiva.

A observação das figuras VI.1 e VI.2 indica que quando utilizado o modo de diluição sucessiva, os pontos obtidos para a construção das curvas de calibração estão, em sua maioria, próximos a origem da reta. É provável que estes pontos atuem com maior intensidade na determinação dos parâmetros das regressões.

Também foi verificado menores desvios da média da triplicata em relação ao modelo adotado, nos primeiros pontos da regressão, quando preparada as soluções a partir da solução estoque.

VII - Pré-concentração dos Pesticidas

Neste estudo foi realizado a pré-concentração dos pesticidas utilizando um micro-extrator semelhante ao construído por Verzele e colaboradores⁽³⁰⁾, no qual o enriquecimento dos pesticidas é realizado por extração líquido-líquido com destilação contínua de vapor.

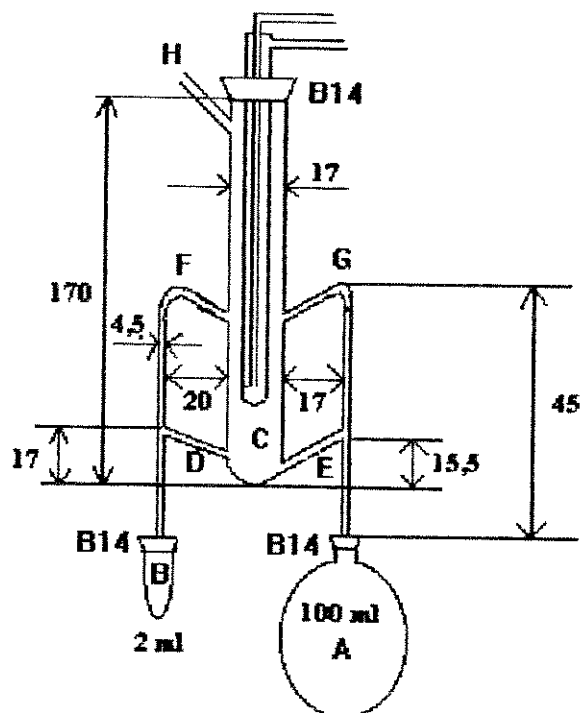


Figura VII.1 - Micro-extrator desenvolvido para enriquecimento dos pesticidas, escala em milímetros

Para a operação do micro-extrator (figura VII.1) coloca-se 50,0 ml de amostra de água, contendo os pesticidas (Dieldrin e HCB, neste estudo) no frasco A e 1,0 ml de iso-octano no frasco B e em C adiciona-se 1,5 ml de água destilada e 1,5 ml de iso-octano, de forma a preencher os braços D e E e promover a separação entre as duas camadas de líquido. O braço F é aquecido por uma resistência ligada a um varivolt. Um dedo frio, no qual circula água gelada, é introduzido no corpo do micro-extrator e é iniciado o refluxo de iso-octano por aquecimento do frasco B a 150°C, em banho de

óleo de silicone. O iso-octano é refluxado por 5 minutos, após o que inicia-se o aquecimento da amostra de água, também a 150°C. Os vapores de água e solvente são condensados em C pelo dedo frio. Devido a menor densidade do solvente em relação a água seu condensado retorna para o frasco B; o contrário ocorre com o condensado de água que retorna para o frasco A. Quando o vapor de água entra na parte central do micro-extrator é iniciada a contagem do tempo de extração.

Completando o tempo de extração, o aquecimento da água é interrompido e a extração com solvente é mantida por mais 15 minutos. O solvente contido no frasco B é diretamente analisado por cromatografia gasosa. A tabela VII.1 contém as concentrações das amostras para Dieldrin, a sua quantidade contida em 50 ml de solução e a porcentagem de recuperação deste pesticida após extração. O tempo de extração usado foi de 1,5 horas.

Tabela VII.1 - Resultados da recuperação para Dieldrin

Conc. Amostra (mg/ml)	Massa de Dieldrin (mg)	Recuperação (%)
0,03818	2,28	102,9
0,03818	2,28	106,9
0,03818	2,28	107,5

Os valores da tabela VII.1 são para amostras com cerca de 38 ppm de Dieldrin. Também foi tentado uma extração de Dieldrin de solução aquosa a aproximadamente 4 ppm, que resultou numa recuperação de 108%. Este valor, contudo, precisa ser confirmado com repetições do procedimento.

Não foram mencionados na tabela VII.1 os resultados obtidos para o HCB, devido à sua baixa recuperação: menor que 10%. Outros testes estão sendo feitos para melhorar a recuperação do HCB. Tais testes incluirão a escolha de solvente adequado, visto que este método é altamente dependente do tipo de solvente utilizado, e determinação de valores de tempos para refluxo de amostra e solvente e apenas solvente. Uma modificação será tentada no micro-extrator, que é a entrada concêntrica de vapores de amostra e solvente, ao invés destas serem feitas pelos braços laterais F e G mostrados na figura VII.1.

VIII - Conclusões

Os trabalhos com o detector por captura de elétrons revelaram que a sua operação necessita de cuidadoso trabalho de otimização. Apesar do uso de 3 programas quimiométricos sequencialmente, terminando com a aplicação dos dados à metodologia de Superfície de Resposta (que analisa os dados considerando, inclusive, interações não lineares entre eles), os resultados de otimização somente foram conclusivos quando estudaram-se os compostos em soluções isoladas em iso-octano. Com os dados obtidos para os 4 compostos cromatografados a partir de sua mistura em iso-octano não foram obtidas condições que otimizam as respostas do DCE para todos eles. Isto pode ser devido a inadequações da função de otimização utilizada (capítulo IV). Portanto, as tentativas de estabelecer qual seria a função mais adequada devem continuar. Os nossos resultados permitem concluir que a otimização das condições de operação do DCE não é uma tarefa trivial, e que ela se torna tão mais complexa quanto mais componentes devam ser detectados e quantificados.

Apesar dos resultados das otimizações para as misturas dos compostos não serem tão favoráveis quanto os das soluções isoladas, foi possível constatar que a otimização traz benefícios para obterem-se as curvas de calibração para o trabalho quantitativo. Comparando-se as curvas de calibração obtidas em condições não otimizadas e otimizadas por quimiometria, foi evidenciado que no segundo caso os coeficientes angulares das curvas são maiores, o que significa melhora da sensibilidade do DCE com a otimização. Outro resultado importante é que, com otimização, os coeficientes lineares das curvas aproximam-se da origem. Isto significa que os afastamentos das retas da origem podem ser devidos a funcionamento do detector em condições inadequadas.

Os estudos da modificação da metodologia computacional convencional de cálculo de área para compostos que apresentam picos assimétricos revelaram melhoras das características das suas curvas de calibração. Os resultados obtidos pela comparação entre os parâmetros das curvas de calibração obtidas utilizando o método convencional e o das SMA (página 40) indicaram que os coeficientes de correlação e os coeficientes lineares resultam melhores quando usam-se as SMA. Atribuem-se esses resultados à minimização dos erros de cálculo de áreas pelas SMA. Conclui-se que o método da SMA pode ser promissor para fins de análises cromatográficas quantitativas, e que deve ser explorado para uso com DCE, devido à possibilidade deste detector gerar picos assimétricos, pela dificuldade de otimização de suas condições experimentais.

A obtenção de curvas de calibração confiáveis depende de vários fatores experimentais. Um deles, discutido acima, é o trabalho do detector em condições o mais próximo possível de otimizadas. Outro ficou evidenciado como sendo a forma computacional de cálculo das áreas cromatográficas - neste trabalho optou-se pelo uso das áreas denominadas de SMA. Existem, também, os fatores relacionados com a experiência e qualidade técnica geral do analista, que podem ser melhorados com treinamento adequado. Um outro fator, particularmente importante quando as quantidades de padrões

e solventes purificados são pequenas, é a técnica de preparo das soluções para a construção das curvas. Os dois métodos testados baseiam-se em adições de volumes iguais, de soluções de partida e de solvente. Supostamente, repetir a medida de um determinado volume, usando o mesmo instrumento de medida - uma seringa no presente caso - minimiza erros de leitura de volumes. O método de obter soluções pela adição de solvente a uma mesma solução estoque foi considerado o mais conveniente, porque é o que envolve manipulações mais simples e, conseqüentemente é o mais rápido. No entanto, observou-se mesmas qualidades das curvas de calibração obtidas com este método e com o segundo, pela adição de solvente a cada nova solução preparada.

A recuperação total do Dieldrin é um indício de que o micro-extrator utilizado para a pré-concentração dos pesticidas pode ser um dispositivo de grande utilidade a baixo custo. Os testes com este extrator, para determinar como operá-lo e, eventualmente, como modificá-lo terão continuidade. Será conveniente testá-lo exaustivamente com os quatro compostos aqui estudados, posteriormente ampliar o número de compostos e comparar os resultados com outros métodos de pré-concentração disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Woodget, B.W.; *Analytical proceeding* (1989), **26**, 283.
- (2) Byron, K.; *Journal Analytical Chemistry* (1990), **337**, 808.
- (3) Leithe, W.; *Analyses of Organic Pollutants in Water and Waste Water* (1975), 2º edição, **26**.
- (4) Poole, S.K.; Dean, T.A.; Oudsema, J.W.; Poole, C.F.; *Analytica Chimica Acta*, (1990), **236**, 42 .
- (5) Debbrecht, F.J.; "Qualitative and Quantitative Analysis by Gas Cromatography", in GROB, R.L. (editor): *Modern practise of Gas Cromatography*: 2º edição; John Willey & Sons; New York, 1985.
- (6) Collins, C. H.; Braga, G. L.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 1ª edição; Editora da UNICAMP; 1987
- (7) Mcwillian, L.G.; Bolton, H.C.; *Analytical Chemistry* (1969), **41**, 1755.
- (8) Mcwillian, L.G.; Bolton, H.C.; *Analytical Chemistry*, (1969), **41**, 1762.
- (9) Kirkland, J.J.; Yau, W.W.; Stoklosa, H.J.; Dilks, C.J. JR; *Journal Chromatography Science*, (1977), **15**, 303.
- (10) Lovelock, J.E.; *Analytical Chemistry* (1963), **4**, 474.
- (11) Pellizzari, E.D.; *Journal of Cromatography* (1974), **98**, 323.
- (12) Simmonds, P.G.; Fenimore, D.C.; Pettitt, B.C.; Lovelock, J.E.; Zlatkis, A.; *Analytical Chemistry* (1967), **12**, 1428.
- (13) Gosselin, C.; Martin, G.B.; Boudreau, A.; *Journal of Chromatography* (1974), **90**, 113.
- (14) Lovelock, J.E.; *Analitycal Chemistry* (1961), **33**, 168.

- (15) Rotocki, P.; Drozdowicz, B.; Journal of Chromatography (1988), 446, 329.
- (16) Knighton, W.B.; Grimsrud, E.P.; Analytical Chemistry (1983), 4, 713.
- (17) Maggs, R.J.; Joynes, P.L.; Davies, A.J.; Lovelock, J.E.; Analytical Chemistry (1971), 14, 1966.
- (18) Shoemake, J.J.; Fenimore, D.C.; Zlatkis, A.; Journal Gas Chromatography (1965), 3, 285.
- (19) Bruns, E.R.; Faigle, J.F.G.; Química Nova (1985), 8, 84.
- (20) Gowie, C.E.; Box, P.O.; Journal Liquid Chromatography (1981), 7, 1431.
- (21) BRUNS, R. E.; Otimização em Química - Apostila, UNICAMP, Campinas.
- (22) Dodge, Y.; Analysis of experiments with missing data, editor John Wiley & Sons, New York, 1985.
- (23) Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S.; Statistics for Experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building; editor John Wiley & Sons, New York, 1976.
- (24) Perry, J.A.: Introduction to analytical Gas Chromatography; Marcel Dekker, New York, 1981.
- (25) Frank, I.E.; Kowalsky, B.R.; Analytical Chemistry (1982), 54, 232R.
- (26) programa quimiométrico Trend fornecido pelo Prof. Doutor Roy E. Bruns.
- (27) Deming, S. N.; Chemtech (1989), April, 249.
- (28) programa quimiométrico Regger fornecido pelo Prof. Doutor Roy E. Bruns.
- (29) Augusto, F.; Desenvolvimento e aplicação de software para cromatografia gasosa, tese de mestrado (1990), Unicamp, Campinas, SP.

- (30) Godefroot, M.; Stechele, M.; Sandra, P.; Verzele, M.; Journal of High Resolution Chromatography (1982), 5, 75.
- (31) Dyson, N.; RSC Chromatography Monographs (1990), Grã Bretanha.
- (32) McNair, H.M.; Bonelli, E.J.; Basic Gas Chromatography; 5ª edição, Varian Aerography, Palo Alto, 1969, 137.
- (33) Papas, A.N.; CRC Crit. Rev. Anal. Chem. (1989), 20, 359.
- (34) Deming, S.N.; Chemtech (1989); August, 504.
- (35) Deming, S.N.; Chemtech (1989), January, 52.
- (36) Bajpai, A.C.; Calus, I.M.; Fairley, J.A.; Statistical Methods for Engineers and Scientists, A students' course book, 1978, Great Britain.
- (37) Valente, A.L.P. ; Desenvolvimento e Avaliação de Métodos Cromatográficos para Compostos do tipo C_xClyH_n , Tese de Doutorado (1984), 22-25, UNICAMP, Campinas.