

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

"Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS e aprovado pela COMISSÃO JULGADORA".

Campinas, 05 de Dezembro de 1991



Prof. Dr. João Carlos de Andrade
(Orientador)

TESE DE DOUTORADO

Determinação Catalítica de Molibdênio em
Plantas, usando Análise em Fluxo Contínuo
Monossegmentado com Detecção Espectrofotométrica.

por

SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS

Orientador: Prof. Dr. João Carlos de Andrade

CAMPINAS

1991

COMISSÃO JULGADORA

Prof.Dr. João Calos de Andrade
IQ/UNICAMP

Prof.Dr. Henrique Bergamin Filho
CENA/USP

Profa.Dra. Nina Coichev
IQ/USP

Prof.Dr. Roy Edward Bruns
IQ/UNICAMP

Prof.Dr. Célio Pasquini
IQ/UNICAMP

Toda a humanidade é um livro.

Quando um homem morre

o capítulo não é arrancado do livro,
mas traduzido para uma língua melhor.

E cada capítulo deve ser traduzido.

Deus emprega muitos tradutores.

Alguns trechos são traduzidos pela idade,
alguns pela doença, alguns pela guerra,
alguns pela justiça.

Mas a mão de Deus reunirá

as folhas avulsas de novo numa biblioteca
onde cada livro deve ficar aberto
um para o outro.

John Donne

E o céu crivado de estrelas
parece nos responder que
tudo virá a seu tempo ...

IN MEMORIAM

de Alacrino, Maria José e Margarida

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal de Uberlândia por proporcionar minha manutenção durante a realização deste trabalho e principalmente aos amigos do Departamento de Química pela confiança nesse trabalho.
- Ao Instituto de Química-UNICAMP e ao Instituto Agronômico de Campinas pelas facilidades concedidas na execução deste trabalho.
- A CAPES/PICD pela Bolsa de Estudos.
- Aos professores, colegas e funcionários do IQ/UNICAMP, que direta ou indiretamente, ajudaram no decorrer deste trabalho. Em especial aos amigos Efraim, Iraídes, Paulo e Walter.
- Aos amigos Bell, Cida, João Carlos, Lorena, Mônica, Nivaldo, Nívia, Patrício e Solange pela amizade e contribuições durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Dr. Ondino Cleante Bataglia pelas sugestões e pelas discussões com respeito aos aspectos agronômicos deste trabalho.
- Ao Salatíel e Nicanor pelos desenhos.
- Em especial agradeço aos professores:
 - Dr. João Carlos de Andrade, que acreditou no êxito deste trabalho, pela amizade e confiança depositada em mim, pela orientação, apoio e proveitosas discussões durante esse período que trabalhamos juntos, e
 - Dr. Roy Edward Bruns pela amizade, orientação e discussões com respeito aos aspectos quimiométricos, principalmente os que constam neste trabalho.

RESUMO

Foi desenvolvido um procedimento para a determinação espectrofotométrica de molibdênio em plantas usando a técnica de Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado e a oxidação catalítica de I^- por H_2O_2 em meio ácido. O sinal analítico, diferença entre a absorbância resultante da reação catalisada por Mo(VI) e a não catalisada, foi otimizado usando procedimentos multivariado e univariado. Em condições ótimas o sistema deve ser operado com os reagentes KI, H_2SO_4 e H_2O_2 em concentrações a 0,1528 M, 0,0665 M e 0,0041 M, respectivamente, com precisão de $\pm 0,0005$ M. Estes reagentes foram bombeados com vazões de $1,2 \text{ ml min}^{-1}$, enquanto que a vazão da amostra foi fixada em $4,7 \text{ ml min}^{-1}$, o volume de amostragem em $300 \mu\text{l}$, o tempo de reação em 130 s, a temperatura do sistema em $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ e a frequência de injeção em 72 h^{-1} . Nestas condições foram estudadas as interferências de Fe(III), Ti(IV), W(VI), Cr(VI), V(V), que também são catalisadores da reação, além de fosfato e da força iônica do meio. Observou-se que apenas Ti(IV) não interfere no sistema. Em vista disto, optou-se por separar previamente o Mo(VI) usando-se α -benzoinoxima e extração com clorofórmio. A curva de calibração obtida após submeter os padrões à extração é linear até 50 ng ml^{-1} e é descrita pela equação: $\Delta A = 0,014 C_{\text{Mo}} + 0,007$. Foi encontrado um limite de detecção de $1,0 \text{ ng ml}^{-1}$ e um desvio padrão relativo menor que 1,5% sobre toda a faixa de linearidade. A exatidão do método foi avaliada através de amostras de plantas fornecidas pelo "International Plant-analytical Exchange" (IPE) (Wageningen

Agricultural University-The Netherlands). Por comparação direta, todos os resultados encontrados na determinação de Mo(VI) nestas matrizes foram aceitos pelo critério de rejeição empregado pelo IPE.

ABSTRACT

A procedure has been developed for the spectrophotometric determination of molybdenum in plants using the Continuous Monosegmented Flow Analysis technique with catalytic oxidation of I^- by H_2O_2 in acid medium. The analytical signal, the difference between the absorbance resulting from the Mo(VI) catalyzed reaction and the non-catalyzed reaction, was optimized using multivariate and univariate procedures. Under optimum conditions, the system operates with the reagents KI, H_2SO_4 and H_2O_2 in concentrations of 0.1528 M, 0.0665 M and 0.0041 M, respectively, within a precision of 0.0005 M. These reagents were pumped at 1.2 ml min^{-1} . The flow rate of the sample was fixed at 4.7 ml min^{-1} , the sample volume at $300 \mu\text{l}$, the reaction time at 130 s, the system temperature at $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ and the injection frequency at 72 h^{-1} . Under these conditions were studied the interferences of Fe(III), Ti(IV), W(VI), Cr(VI), V(V), which are also catalyzers for this reaction, as well as phosphate and the ionic strength. It was observed that only Ti(IV) does not interfere. It was thus decided to incorporate a prior separation of Mo(VI) from interfering species by means of reaction with α -benzoinoxime and extraction into chloroform. The calibration curve obtained after submitting the standards to the extraction procedure is linear to 50 ng ml^{-1} and is described by the equation: $\Delta A = 0.007 + 0.014 C_{\text{Mo}}$. The limit of detection found was 1.0 ng ml^{-1} and the relative standard deviation was less than 1.5% over the entire linear range. The accuracy of the method was evaluated by means of plant samples

supplied by the "International Plant-analytical Exchange" (IPE), from the Wageningen Agricultural University, The Netherlands. By direct comparison, all of the results obtained for the determination of Mo(VI) in these samples were acceptable by the recommended IPE criteria.

ÍNDICE

	pag.
Capítulo I	
INTRODUÇÃO	1
Capítulo II	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
II.1. MOLIBDÊNIO NA AGRICULTURA	4
O Molibdênio no Solo e nas Plantas	5
II.2. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO	9
II.2.1. Métodos Manuais	9
Método do Ditiol	10
Método do Tiocianato	10
Método Absorção Atômica e ICP-AES	11
Método Catalítico	12
II.2.2. Métodos em Fluxo Contínuo	13
Capítulo III	
PARTE EXPERIMENTAL	23
Capítulo IV	
RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
IV.1. CONDIÇÕES INICIAIS	30
IV.2. PROCEDIMENTOS DE OTIMIZAÇÃO	35
IV.2.1. Planejamento Fatorial Fracionado, 2^{5-1}	36
IV.2.2. Método Simplex Modificado	40
IV.2.3. Análise de Superfície de Respostas	43
Planejamento Fracionado 2^3 , Composto	45

Planejamento Fatorial 2^2 , Composto	48
Caminho da Ascensão Máxima	51
IV.3. ADAPTAÇÕES DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO EM ROTINA	54
Vazão da Amostra versus Vazão dos Reagentes	55
Volume da Alça de Amostragem	58
Temperatura versus Tempo de Reação	58
Sensibilidade e Linearidade do Método	62
Influência da Natureza do Ácido	67
Avaliação do Comportamento das Interferências	69
IV.4. APLICAÇÃO : DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE MOLIBDÊNIO EM PLANTAS	76
Extração com α -Benzoinoxima	76
Método para Determinação de Molibdênio	77
Precisão do Método	83
Exatidão do Método	84
PRETENSÕES FUTURAS	89
Apêndices	
APÊNDICE 1: PROCEDIMENTOS MULTIVARIADO DE OTIMIZAÇÃO	91
APÊNDICE 2: SOLUÇÕES DOS INTERFERENTES	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A determinação de molibdênio em plantas tem grande interesse por se tratar de um nutriente essencial^{1,2}, que desempenha importantes funções bioquímicas na redução do nitrato, biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas e processos bioquímicos relacionados com fixação do nitrogênio molecular por microorganismos livres e bactérias em simbiose com plantas leguminosas³.

Apesar de essencial, o molibdênio ocorre em níveis muito baixos, sendo que plantas deficientes apresentam concentrações geralmente abaixo de 0,1 $\mu\text{g/g}$ na matéria seca. Esses níveis de ocorrência exigem métodos bastantes sensíveis para sua determinação analítica. Por esta razão, uma técnica bastante utilizada para essa determinação tem sido a concentração em solventes orgânicos.

Os métodos atualmente mais utilizados empregando esta técnica baseiam-se na determinação colorimétrica através da complexação com tiocianato^{4,5} ou com ditiol⁶ e na determinação por espectrofotometria de absorção atômica após complexação com tiocianato de amônio e extração em metilisobutilcetona⁷. Em todos os casos, entretanto, a morosidade dos procedimentos e a necessidade de grande quantidade de material vegetal impedem que a maioria dos laboratórios pratiquem essa determinação rotineiramente. A grande quantidade de material traz problema também para a análise de plantas de experimentos em vasos, quando o tamanho das amostras é bastante

limitado.

Uma possibilidade que tem sido testada por alguns autores é a determinação de molibdênio através de seu efeito catalítico na liberação de iodo a partir de íons iodeto, pela água oxigenada⁸⁻¹⁰ através da reação $3 I^- + H_2O_2 + 2 H^+ = I_3^- + 2 H_2O$.

A oxidação do iodeto pelo peróxido de hidrogênio em meio ácido^{11,12}, que segue a expressão cinética

$$\frac{d [I_3^-]}{d t} = (k_1^0 + k_1 [H^+] D [H_2O_2]) [I^-],$$

é catalisada por certos metais no seu estado de oxidação mais elevado e é frequentemente usada para determinação de molibdênio^{8-10,13-18}.

Como os procedimentos manuais para determinações cinéticas são lentos e de difícil controle, tem-se dado atenção para desenvolvimento de procedimentos automáticos¹⁹. Para a determinação catalítica de molibdênio têm sido investigado tanto métodos contínuos segmentados^{9,10,15,16} como não segmentados^{17,18}. Esses sistemas são operados usando diferentes configurações e condições de operação, geralmente estabelecidas pelo uso de procedimento univariado de otimização para estabelecer as condições que apresentam os melhores resultados.

O uso de procedimentos multivariado de otimização(*) são mais recomendados²⁰, e, portanto, é desejável avaliar o comportamento da oxidação de I^- por H_2O_2 em meio ácido tanto catalisada por

(*) Procedimentos multivariado de otimização são apresentados no

molibdênio como não catalisada usando esses procedimentos.

Com esse propósito, o uso de um sistema analítico automático é essencial. Dentre as técnicas de análise em fluxo contínuo, a Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado²¹ (MCFA, do inglês "Monosegmented Continuous Flow Analysis") se apresenta como uma conveniente alternativa, pois esta mantém as características importantes da Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês "Flow Injection Analysis") como simplicidade, reprodutibilidade e ainda reduz a dispersão longitudinal das reações de desenvolvimento lento.

Usando então a configuração MCFA e a oxidação de I^- por H_2O_2 estudou-se, com auxílio de procedimentos multivariado (e univariado quando mais conveniente), os parâmetros característicos mais adequados para a obtenção da maior diferença de velocidade entre a reação catalisada pelo molibdênio e a não catalisada com a finalidade de se conseguir a maior sensibilidade possível para que o método resultante seja aplicável em determinação de molibdênio nas análises de plantas.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. MOLIBDÊNIO NA AGRICULTURA

Há certos elementos minerais que, embora essenciais ao desenvolvimento e produção normais das plantas, são necessários em quantidades tão diminutas que foram denominados de elementos menores, micronutrientes ou oligoelementos (*do grego oligos, pouco*), os quais são considerados biocatalisadores responsáveis pela síntese das substâncias vegetais²². O molibdênio se enquadra na categoria dos micronutrientes, mas esta denominação refere-se à quantidade utilizada pelas plantas e não à importância desses elementos na nutrição vegetal.

Foi em 1930 que o pesquisador alemão Bortels descobriu a relação do molibdênio com os seres vivos e realizou os seus primeiros trabalhos com os microorganismos *Azotobacter croococcum* e *Clostridium pasteurianum*, agentes fixadores do nitrogênio atmosférico^{2,3,23}. Mais tarde, verificou-se que o molibdênio era também essencial às plantas superiores.

O molibdênio participa ativamente como integrante de enzimas envolvidas em reações bioquímicas necessárias ao metabolismo das plantas. Sua disponibilidade no solo depende de diversos fatores, sendo que o tipo de rocha matriz e o estágio de intemperização influenciam marcadamente sua concentração na solução do solo.

O Molibdênio no Solo e nas Plantas

Os teores de molibdênio na litosfera situam-se ao redor de $2 \mu\text{g/g}$, enquanto que nos solos o molibdênio total encontra-se na faixa de $0,5$ a $5 \mu\text{g/g}$, onde ocorre em formas dissolvidas na solução do solo, adsorvido na fração coloidal, retido na rede cristalina de minerais e quelado na matéria orgânica²⁴. Consequentemente a sua disponibilidade não está diretamente relacionada com seu conteúdo total, sendo considerados normais valores médios em torno de $0,2 \mu\text{g/g}$ ²⁵. No Brasil, ainda existe uma grande carência de informações quanto à disponibilidade de molibdênio existente nos solos das diferentes regiões do país, mas informações recolhidas por Lopes²⁶ situam a maior parte da disponibilidade de molibdênio entre $0,01$ a $0,16 \mu\text{g/g}$.

O molibdênio existente na solução do solo encontra-se predominantemente na forma não dissociada de ácido molíbdico (H_2MoO_4) em condições de pH abaixo de 2. Com o aumento do pH, a dissociação do ácido molíbdico gera o íon HMoO_4^- e posteriormente o íon MoO_4^{2-} o qual torna-se predominante em solos de pH neutro a alcalino²⁷.

O molibdato lembra mais o comportamento dos fosfatos e sulfatos (macronutrientes) do que os outros micronutrientes. Normalmente, as concentrações de molibdênio no tecido das plantas decrescem na medida que aumenta as concentrações de sulfato no solo²⁸, pois ocorre uma competição direta entre os íons sulfatos e molibdatos por sítios de absorção na raiz, devido aos seus tamanhos semelhantes. Portanto deve haver um equilíbrio destes para a disponibilidade de molibdênio.

O tipo de material originário do solo também pode afetar a

concentração de molibdênio na solução do solo. O molibdênio ocorre normalmente em feldspatos e minerais ferro-magnesianos como a biotita e a olivina^{29,29}. As rochas sedimentares, por serem formadas após a intemperização e transporte do material originário, retêm uma pequena fração de molibdênio originalmente existente na rocha matriz²⁴. O molibdênio é facilmente liberado dos minerais primários pela intemperização e, comparado com os outros micronutrientes, ele permanece relativamente móvel como molibdatos potencialmente solúveis. Entretanto, estes molibdatos são adsorvidos nas superfícies de minerais primários e da fração coloidal, fazendo com que a disponibilidade do molibdênio no solo seja dependente do pH.

Outro fator importante na disponibilidade de molibdênio é a textura do solo, sendo possível esperar-se deficiências em solos arenosos, mesmo que o pH seja elevado³⁰. A umidade do solo também é um fator importante que afeta a disponibilidade de molibdênio. Com tantos fatores afetando a disponibilidade de molibdênio no solo e sua absorção pelas plantas, associadas com as pequenas concentrações normalmente existentes no solo é de se esperar uma baixa eficiência dos extratores químicos como indicadores das quantidades que são efetivamente extraídas pelas plantas. Apesar de todas as tentativas de encontrar um método sensível e prático para a determinação de molibdênio disponível no solo³¹, a análise de tecido vegetal é a que tem sido caracterizada como melhor indicadora da disponibilidade de molibdênio às plantas²⁴.

Concentrações de molibdênio em torno de 1 $\mu\text{g/g}$ no tecido vegetal têm sido apresentadas como adequadas para a maioria das plantas cultivadas²⁹. O suprimento é feito predominantemente na forma

de molibdato, presente na solução do solo, via fluxo de massa²⁴. A forma pela qual o molibdênio é translocado das raízes para as partes jovens das plantas ainda não é bem caracterizado, mas Tiffin³² propôs que o molibdênio seria transportado no xilema como íon molibdato ou complexado com compostos orgânicos, possivelmente aminoácidos sulfurados, açúcares ou outros compostos polihidroxilados. Devido a sua grande mobilidade, a deficiência de molibdênio manifesta-se inicialmente nas folhas mais velhas ou nas intermediárias, pois em condições de deficiência na solução do solo ele pode ser translocado das partes mais velhas para as mais novas da planta²⁵.

A participação do molibdênio como cofator das enzimas nitrogenase, redutase do nitrato e oxidase do sulfeto, está relacionada com o transporte de elétrons durante as reações bioquímicas. A nitrogenase é uma enzima adaptativa, presente em microorganismos procariontes capazes de fixar o nitrogênio. Essa enzima é formada por dois componentes distintos que se combinam para reduzir o nitrogênio a amônia. Relações adequadas entre os dois componentes e entre molibdênio e ferro na molécula, são necessárias para que haja um perfeito funcionamento da enzima, além de outros fatores que influenciam sua atividade^{2,3}. Assim, a deficiência de molibdênio irá ocasionar uma diminuição na síntese da enzima, que se refletirá em sua menor atividade e, conseqüentemente, numa redução da fixação biológica do nitrogênio.

A redução do nitrato a nitrito é catalisada pela enzima adaptativa redutase do nitrato que requer a presença de flavina e molibdênio durante a reação²⁹. Em condições de deficiência de molibdênio, além da diminuição de atividade da redutase do nitrato,

verifica-se diminuição na atividade de outras enzimas, tais como catalase, aldolase e alaninaaminotransferase, bem como aumento de atividade de peroxidase, β -glycerofosfatase e ribonuclease. Estas alterações podem resultar em modificações no conteúdo de nitrogênio orgânico e de outros compostos como ácidos málico e cítrico, clorofila, vitamina C e açúcares²⁴.

A adição de molibdênio resultará em maior síntese da redutase do nitrato e, conseqüentemente, em maior atividade redutora principalmente na presença de altas concentrações de nitrato. Nestas condições, ocorrerá um aumento na síntese de aminoácidos, devido ao aumento das reações de aminação entre o amônio formado pela redução assimilativa do nitrato e nitrito e os ácidos orgânicos provenientes da fotossíntese²⁹.

Em geral, os solos apresentam níveis de molibdênio suficientes para o desenvolvimento do vegetal. Em condições especiais podem ocorrer deficiências que se caracterizam por clorose generalizada, principalmente em plantas leguminosas, que lembra os sintomas característicos de deficiência de nitrogênio.

Os sintomas de deficiências de molibdênio estão intimamente associados com o metabolismo do nitrogênio, o que resultará em fixação deficiente de nitrogênio. Porém, na maioria dos solos, as necessidades das plantas podem ser supridas pelas reservas do solo ou de semente. Em condições de lavoura, raramente têm sido apresentados problemas de toxidez de molibdênio, a não ser em casos de erros na aplicação que resultam em altas concentrações de molibdênio em áreas localizadas²⁹.

Antes que ocorram sintomas de toxidez de molibdênio nas

plantas, ocorrerão sérios distúrbios nutricionais em animais, principalmente nos ruminantes, devido a uma metabolização deficiente do cobre que resultará na molibdenose²⁴.

Em casos de deficiência, é preferível adicionar pequenas quantidades de molibdênio do que elevar o pH do solo para aumentar a sua disponibilidade natural. Variações na capacidade de absorção, translocação, acúmulo no tecido e utilização são características das espécies cultivadas quanto às suas necessidades em molibdênio, isto é, a potencialidade genética pode ser marcadamente alterada, quando a espécie é submetida a diferentes condições ambientais²⁹. Conseqüentemente, a determinação de molibdênio é fundamental para um controle que permita um desenvolvimento sadio da planta, uma vez que aplicações de molibdênio têm proporcionado acréscimos no teor de proteína^{2,3} e é evidenciado na cultura de soja³⁹.

II.2. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO

Nota-se na literatura que o molibdênio vem sendo determinado em diversas matrizes, inclusive tecidos vegetais, por diferentes métodos, sejam eles manuais ou automatizados. Destacaremos a seguir alguns trabalhos que utilizam métodos espectrofotométricos para a determinação de molibdênio.

II.2.1. Métodos Manuais

Os métodos manuais usualmente recomendados utilizam-se da técnica de extração por solventes seguido de determinação

espectrofotométrica, espectrometria de chama ou o uso do forno de grafite. Métodos com determinação em ICP-AES e método catalítico também têm sido utilizados para a determinação de molibdênio.

Método do Ditiol

A determinação se baseia na formação do complexo colorido pela reação do molibdênio com 4-metil-1,2-dimercaptobenzeno (ditiol). O ditiolato de molibdênio $[(CH_3)_3C_6H_3S_2]_3Mo$ é extraído em acetato de butila e a absorvância do complexo, a 680 nm, é usada para determinação quantitativa do molibdênio³⁴.

O método do ditiol para determinação de molibdênio em digeridos vegetais foi investigado com respeito à constituição do complexo formado, concentração de reagentes, velocidade de reação e estabilidade do complexo³⁵. Outros extratores, além do acetato de butila, foram propostos; tais como tetracloreto de carbono⁶, sendo este mais eficiente do que benzeno ou clorofórmio³⁶, e acetato de isoamila³⁷. O limite de detecção para o método é muito variável e é citado de 0,05 mg/l no trabalho de Quin e Brooks³⁷ a 10 µg/l no trabalho de Chan e Riley³⁸.

Método do Tiocianato

O molibdênio é complexado com tiocianato de amônio em meio ácido e o complexo $[Mo(SCN)_5]$ é extraído em metilisobutilcetona. Separa-se as fases aquosa e orgânica e nesta última determina-se a absorvância a 470 nm³⁹. Neste método a presença de íons férrico afeta fortemente os resultados, então, cloreto estanoso é recomendado para reduzir os íons férricos impedindo a formação do complexo tiocianato

férrico⁴⁰, que é igualmente solúvel no solvente extrator.

Os efeitos de vários ácidos e das concentrações de reagentes foram estudados por Lounama⁴¹. Também foi estudado o efeito da substituição de metilisobutilcetona pela mistura dos solventes álcool butílico e tetracloreto de carbono⁵ ou álcool isoamílico e tetracloreto de carbono⁴² na etapa de extração. Este último sistema apresenta uma linearidade na faixa de 0,10 a 10,0 mg/l de molibdênio.

Método Absorção Atômica e ICP-AES

O uso de absorção atômica, em chama de N₂O-acetileno, para a determinação de molibdênio tem sido empregado e, usando a linha de ressonância de 313,3 nm, um limite de detecção em torno de 10 µg/l é observado⁴³. O uso de absorção atômica com chama é de pouco interesse, pois apresenta a sensibilidade analítica relativamente baixa⁴⁴, requerendo procedimentos de concentração do molibdênio. Determinação de baixas concentrações de molibdênio foram obtidas com o uso de absorção atômica com forno de grafite^{44,45}, mas o procedimento descrito por Neuman e Munshover⁴⁵ para digeridos vegetais apresenta um desvio padrão relativo de 10 % para um nível de 0,50 mg/l de molibdênio.

A espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido em argônio (ICP-AES) também já foi utilizado para a determinação de molibdênio em digeridos vegetais^{46,47}. Lyons e Roofayel⁴⁶ propuseram uma extração seletiva do molibdênio com 8-hidroxiquinolina antes da sua determinação, enquanto que Spiers et alii⁴⁷ apresentam uma análise multielementar por ICP-AES de tecidos vegetais sem extração seletiva. O limite de detecção para o molibdênio nos dois trabalhos

citados anteriormente é 0,09 mg/l e 0,10 mg/l, respectivamente.

Método Catalítico

A dependência da velocidade de reação com a quantidade de substância caracteriza o método cinético, que pode ser didaticamente dividido em método cinético, catalítico, enzimático e velocidade de reação diferencial⁴⁸. Destacaremos o método catalítico no qual busca-se a determinação do catalisador ou ativador/inibidor.

A velocidade de uma reação: $A + B \rightleftharpoons X + Y$, pode ser alterada na presença de um catalisador. A catálise homogênea, onde reagentes, produtos e catalisador se encontram na mesma fase, é a mais frequentemente usada em métodos cinéticos de análise¹³.

Para medir a velocidade da reação catalítica é necessário que ela exceda, pelo menos, a 10% a velocidade da reação não catalisada⁴⁹, de modo que $V_c / V = K_c C_c / K \geq 0,1$, ou $C_{c(mínimo)} \geq 0,1 K / K_c$ (onde V_c = velocidade da reação catalisada; V = velocidade da reação não catalisada; K_c = constante de velocidade da reação catalisada; K = constante de velocidade da reação não catalisada e C_c = concentração do catalisador). Portanto, a concentração mínima de material que pode ser determinada por método catalítico depende da razão das respectivas constantes de velocidade.

Os métodos que podem ser usados na determinação da concentração das substâncias em solução¹³ são:

a) Método das tangentes - a concentração é determinada a partir da inclinação da curva obtida pela variação do tempo contra uma função da concentração da substância indicadora,

b) Método do tempo fixo - a determinação da concentração é

feita a partir de dados sobre a extensão da reação, após intervalos de tempos medidos, regularmente, e,

c) Método da concentração fixa - a determinação da concentração é obtida a partir de dados sobre o tempo requerido para atingir determinado ponto da reação.

A primeira determinação espectrofotométrica de molibdênio empregando um método catalítico foi apresentada por Yatsimirsky e Afanaseva¹⁴. O método proposto foi desenvolvido baseado no fato de que molibdênio catalisa a oxidação do iodeto pelo peróxido de hidrogênio em meio ácido. Soluções de iodeto de potássio, ácido sulfúrico e amido foram colocados em frascos aos quais foram adicionados peróxido de hidrogênio, molibdênio e por fim elevado a volume adequado. Após 3 minutos foram anotadas as absorbâncias a 553 nm, com intervalos de 1 minuto. O limite de detecção do método foi de 0,10 mg/l e precisão de aproximadamente 10 %.

Svehla e Erdey⁵⁰ recorrendo ao Efeito Landolt⁵¹, propuseram um procedimento alternativo para a determinação catalítica de molibdênio usando a reação entre peróxido de hidrogênio e iodeto. O tempo de reação foi medido na presença e na ausência de molibdênio e a razão entre eles apresentou um aumento linear com a concentração de molibdênio. Foram descritos procedimentos para determinação de 0,1-1,0 µg/ml e 10-100 µg/ml de molibdênio com um erro relativo de aproximadamente 10%.

II.2.2. Métodos em Fluxo Contínuo

Os métodos de análise em fluxo contínuo são processos

analíticos nos quais a concentração da espécie de interesse é medida sem interromper o fluxo carregador. As amostras são introduzidas de maneira sucessiva e a intervalos regulares de tempo em um tubo condutor onde se encontra o reagente. Os reagentes também podem ser introduzidas posteriormente através de tubos condutores auxiliares, que confluem com o principal. O fluxo principal contendo a mistura resultante passa por um sistema de detecção monitorado continuamente. Cada amostra dá origem a um sinal transitório em forma de pico e, em geral, a altura máxima é relacionada com a concentração em cada amostra⁵²⁻⁵⁵.

Foi em 1957 que Skeggs⁵⁶ introduziu a Análise em Fluxo Contínuo Segmentado (SCFA, do inglês "Segmented Continuous Flow Analysis") a qual foi aplicada na determinação de uréia e glicose no sangue. O desenvolvimento posterior do equipamento utilizado por ele e seus colaboradores resultou no sistema "Auto Analyzer". Neste sistema, a amostra move-se impulsionada por uma bomba peristáltica através de condutos tubulares a uma cela de detecção. A amostra é introduzida no sistema que está segmentado com bolhas de ar (Figura II.1), para limitar a dispersão longitudinal da amostra^{53,55,57} e evitar a intercontaminação entre as sucessivas amostras que passam pelo mesmo caminho, separadas por um fluido de limpeza. Durante o trajeto da amostra, diversas operações e tratamentos como dialise, adição de reagentes, destilação e extração por solventes podem ser executadas. Como pode ser observado na Figura II.1, o sistema SCFA trabalha em condição dita "de estado estacionário" na qual o sinal atinge uma situação invariável durante um certo intervalo de tempo (patamar)⁵⁸.

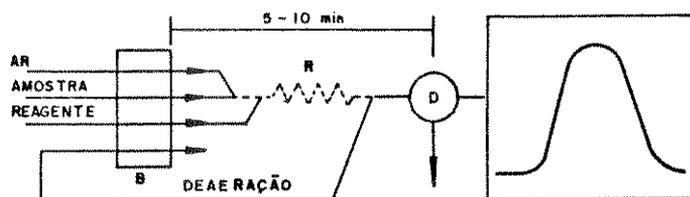


Figura II.1 Diagrama do sistema de Análise em Fluxo Contínuo Segmentado e o sinal analítico típico obtido pela técnica⁵⁸.

B, bomba peristáltica; R, reator e D, detector.

A análise em fluxo contínuo não-segmentado, conhecida como Análise por Injeção em Fluxo (FIA), pode ser resumida como sendo um processo onde a amostra é introduzida em um fluido carregador não segmentado, que pode ser constituído de um reagente ou de um líquido inerte, o qual transporta até o detector. A Figura II.2 apresenta uma configuração FIA, denominada linha única, e o sinal analítico característico. No sistema FIA, durante o trajeto da amostra, desde a injeção até a detecção, esta se dispersa no fluido carregador de forma muito mais acentuada do que nos sistemas multi-segmentados comprometendo, desta forma, a sensibilidade e a frequência de injeção para processos que exigem tempos de residência longos.

A dispersão é um fator de grande importância na técnica FIA podendo ser afetada por diversos fatores. Quanto maior o volume injetado da amostra observa-se um maior coeficiente de dispersão e, portanto uma menor sensibilidade. O aumento da vazão do fluido

carregador, assim como o aumento do caminho da amostra até o detector são fatores que promovem um acréscimo do coeficiente de dispersão.

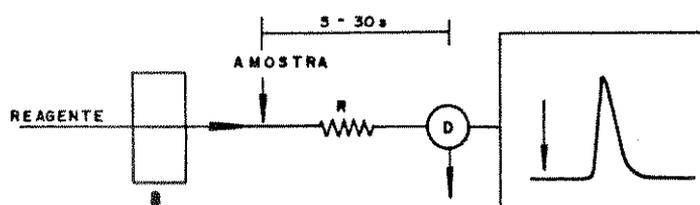


Figura II.2 Diagrama do sistema de fluxo contínuo não-segmentado em linha única e o sinal típico obtido com o uso desta técnica⁵⁸.

B, bomba peristáltica; R, reator e D, detector.

As reações que apresentam uma cinética lenta, necessitam, evidentemente, de um percurso maior da amostra, o que provocará uma queda na sensibilidade das medidas. A técnica FIA apresenta, portanto, dificuldades em conciliar frequência de injeção, tempo de residência e sensibilidade quando uma reação de cinética lenta deve ser empregada em um processo analítico.

Em 1984, Pasquini⁵⁸ introduziu a técnica de Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado (MCFA), que pode ser avaliada como uma variação do sistema de análise em fluxo contínuo que utiliza as boas características do sistema de fluxo contínuo não-segmentado, FIA, como simplicidade, reprodutibilidade, versatilidade e alta frequência de injeção de amostra, associados à baixos valores de dispersão, que caracterizam os sistemas de fluxo contínuo segmentado (SCFA). Isto faz com que a técnica MCFA seja, potencialmente, útil em

determinações que empregam reações cineticamente lentas.

No sistema MCFA, a amostra, juntamente com os reagentes, é introduzida em um fluido carregador, separada por duas bolhas de ar (Figura II.3).

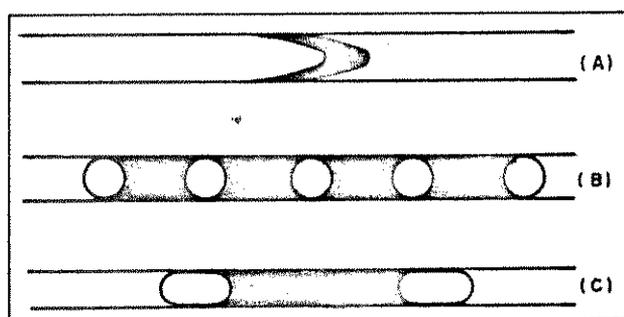


Figura II.3 Microestrutura da zona da amostra⁵⁸.

A, para o sistema não-segmentado. B, para o sistema segmentado. C, para o sistema monos-segmentado. As regiões sombreadas indicam a ocupação pela amostra.

A existência das duas bolhas de ar faz com que a dispersão seja mínima durante o transporte da mistura reagente através de uma bobina de reação, mesmo que o tempo necessário para a indução da reação seja longo.

Previamente à detecção, os segmentos de ar são removidos e o fluxo resultante, agora contínuo, é imediatamente transportado para uma cela de detecção, onde são feitas as leituras e o registro de sinais. Os sinais analíticos observados são picos semelhantes aos obtidos em FIA, conforme mostra a Figura II.4.

A eficiência do sistema MCFA foi avaliada com determinação

espectrofotométrica de cromo (VI), amônia e fosfato²¹ obtendo um limite de detecção igual a 5, 20 e 3 ng/ml, respectivamente, com uma frequência de injeção de 120 h^{-1} e o tempo de residência podendo variar de 30 s a 5 min com coeficiente de dispersão ainda aceitável.

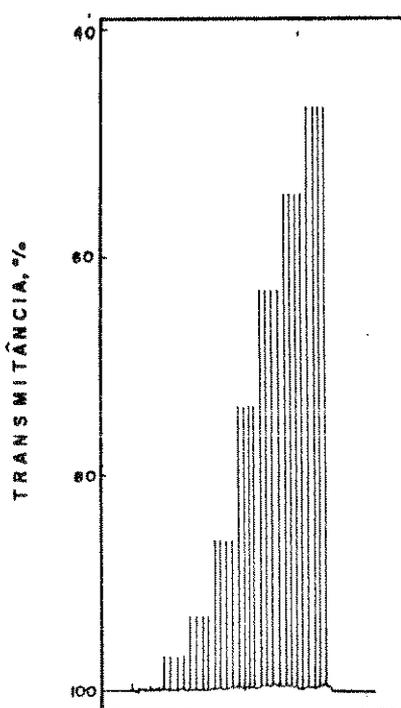


Figura II.4 Curva de calibração obtida quando se utiliza de MCFA na determinação de cromo (VI), segundo Pasquini²³.

O uso do MCFA para determinação de boro também foi avaliado por Pasquini⁵⁸, e, posteriormente, a técnica foi aplicada para determinação de boro em plantas^{59,60}, e a eficiência da técnica pode ser comparada na Tabela II.1⁵⁹.

Tabela II.1 Alguns parâmetros de comparação de métodos para a determinação de boro⁵⁹.

Parâmetro	Métodos			
	Manual (IAC*)	SCFA (Auto Analyzer)	FIA	MCFA
Sensibilidade (UA/ $\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,20	0,10	0,08	0,25
Velocidade de determinação	70 dia ⁻¹	30 h ⁻¹	60 h ⁻¹	120 h ⁻¹
Tempo de reação (s)	1800	480	40	280
Precisão	-	1 %	1 %	1 %

* IAC - Instituto Agronômico de Campinas

Como pode ser observado na tabela acima, o sistema MCFA apresentou resultados satisfatórios demonstrando que o sistema tem um melhor desempenho que os demais. A sensibilidade obtida com o método MCFA é a maior dentre os métodos de fluxo, sem prejuízo na velocidade de determinação.

Métodos de análise em fluxo contínuo segmentado e não-segmentado já foram empregados para determinação espectrofotométrica de molibdênio. A seguir destacaremos alguns trabalhos que utilizam reações catalíticas.

Usando o sistema "Auto Analyzer" da Technicon e amostras geológicas e biológicas, Fuge⁹ propôs um método catalítico para determinação de molibdênio com a ação catalítica dos íons molibdatos na reação entre peróxido de hidrogênio e iodeto de potássio, a 353 nm. O sistema permitiu determinação de molibdênio na faixa de 0,2 a 250 $\mu\text{g/l}$ com uma frequência de injeção de 10 h⁻¹. O efeito da

presença dos íons Fe(II), Fe(III), Cr(VI), V(V) e W(VI) foi estudado. A maior interferência foi causada por Fe(III) e V(V). Na determinação de 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ de molibdênio, o método tolerou fosfato (10 mg), fluoreto (10 mg), borato (10 mg) e brometo (100 mg) em um litro de solução. O efeito da concentração iônica das amostras foi observado na inclinação da curva.

Bradfield e Stickland¹⁶ otimizaram um sistema, semelhante ao proposto por Fuge⁹, para determinação de molibdênio pelo método catalítico. Devido a interferência da alta concentração iônica, foi proposto uma extração preliminar com α -benzoinoxima e clorofórmio. A interferência de ferro (III) foi eliminada com a utilização de solução de fluoreto de amônio. O limite de detecção foi de 0,003 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (usando 2 g de amostra para um volume final de 20 ml) a uma frequência de injeção de 40 h^{-1} .

Ainda usando um sistema da Technicon, Quin e Woods¹⁰ propuseram modificações no método proposto por Bradfield e Stickland¹⁶ como a redução do tempo de reação e a adição de H_2O_2 antes de I^- para prevenir qualquer redução do ferro (III) anterior à complexação com fluoreto e minimizar o efeito do fosfato. O efeito da concentração iônica foi também estudado, resultando na sugestão de adição de quantidades apropriadas de íons às soluções padrão para amostras com altas concentrações iônicas. O limite de detecção do método foi de 0,01 $\mu\text{g}/\text{g}$ de molibdênio em plantas com uma frequência de injeção de 35 h^{-1} .

O sistema "Auto Analyzer" da Technicon com modificações no seu sistema de eliminação de bolhas para aumentar a sensibilidade, foi empregado por Eivazi et alii¹⁵ para determinação de molibdênio em

tabaco e soja, o qual apresentou um limite de detecção inferior a 0,1 mg/l e frequência de injeção de 30 h^{-1} . A interferência de Fe(III), Ti(IV), V(V), W(VI) e Cr(VI) foi atenuada pela complexação com fluoreto. Os efeitos interferentes do fosfato e da concentração iônica foram eliminados com o mesmo recurso usado por Quin e Woods¹⁰.

As condições da oxidação de I^- por H_2O_2 , catalisada e não catalisada por molibdênio, foram estudadas por Zhao-Lun e Shu-Lun¹⁷ num sistema de análise em fluxo contínuo não-segmentado para a determinação de molibdênio em águas naturais. O comportamento dos interferentes e da concentração iônica foram verificados. A interferência de tungstênio foi minimizada pela adição de EDTA na solução de iodeto de potássio, mas com perda de sensibilidade em cerca de 30 %. A interferência de ferro(III) foi eliminada ajustando o pH da amostra para 8 antes da sua introdução no sistema. Verificaram que a concentração iônica, estudada com a injeção de solução de cloreto de sódio a 3 %, causou uma depressão em torno de 4% no sinal. A precisão do método foi de 0,83 % para $50 \mu\text{g/l}$ e de 1,9% para $13 \mu\text{g/l}$ de molibdênio, e o limite de detecção encontrado foi $0,7 \mu\text{g/l}$, associado com uma linearidade na faixa de $1\text{-}1000 \mu\text{g/l}$ de molibdênio. O método foi operado com uma frequência de injeção de 90 h^{-1} .

O efeito catalítico do molibdênio na oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio também foi utilizada por Pessenda⁶¹ e Pessenda et alii¹⁸ para a determinação espectrofotométrica de molibdênio em plantas por análise em fluxo contínuo não-segmentado. Uma coluna de resina de troca iônica foi empregada para remover os íons interferentes. Segundo os autores, o emprego da resina de troca

iônica eliminou a interferência de ferro(III) e, em associação com cloreto de amônio como carregador da amostra, eliminou a interferência da concentração iônica das amostras. As interferências de cromo, titânio, tungstênio e vanádio não foram observadas, enquanto que a interferência de fosfato foi eliminada adicionando-se o peróxido de hidrogênio em meio clorídrico antes do iodeto de potássio. Com uma frequência de injeção de 40 h^{-1} , o método apresentou uma faixa de linearidade de 1 a $40 \mu\text{g Mo/l}$ e os autores sugerem ainda que concentrações inferiores a $1 \mu\text{g/l}$ de Mo podem ser determinadas com aumento do volume de amostragem.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos usando a configuração do sistema de Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado (MCFA), representada na Figura III.1, usando água como carregador.

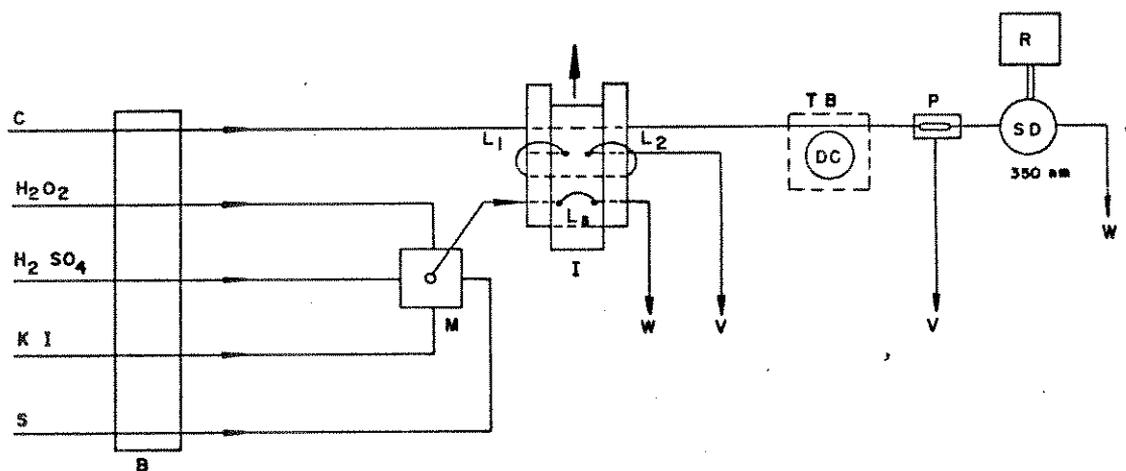


Figura III.1 Configuração do sistema MCFA usado na determinação espectrofotométrica de molibdênio através da oxidação catalítica de iodeto pelo peróxido de hidrogênio em meio ácido. B, bomba peristáltica; M, câmara de mistura; I, injetor; L_1 e L_2 , alça para introdução de bolhas de ar; L_s , alça de amostragem; TB, banho termostático; DC, bobina de reação; P, cela de permeação; SD, detector; R, registrador; W e V, descarte e vácuo, respectivamente.

Nesta configuração as soluções dos reagentes, da amostra (padrão ou água) e carregador são simultaneamente impulsionadas por uma bomba peristáltica Gilson Miniplus-2 operando com cabos de propulsão de Tygon (Technicon), para uma câmara de mistura (M, indicada na Figura III.1 e detalhada na Figura III.2). O uso das quatro linhas independentes dos reagentes foi adotada por conveniência, uma vez que facilita as mudanças de concentrações requeridas pelo estudo multivariado empregado na otimização das concentrações dos reagentes.

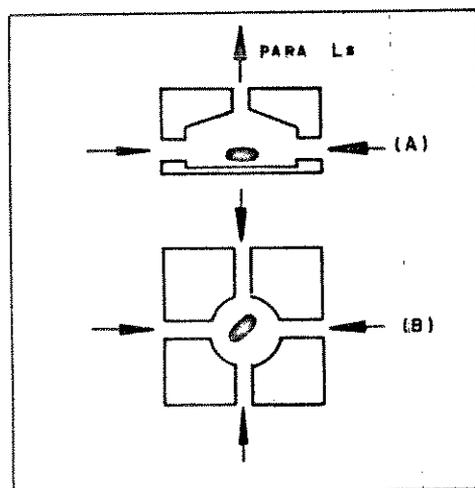


Figura III.2 Câmara de mistura.

A, corte transversal e B, vista superior.

Volume interno líquido é de 220 μ l.

(O desenho não está em escala).

Como todas as combinações binárias de ordem de adição simultânea dos reagentes mostraram não afetar a velocidade da reação

catalisada por Mo(VI)⁶², optamos pela mistura simultânea de todos os reagentes numa câmara de mistura baseada numa similar usada na determinação de boro em plantas⁶⁰, que foi construída em acrílico e é composta de duas partes que são fixadas entre si com cola de silicone. A parte inferior possui quatro entradas para os fluidos confluentes e a parte superior uma saída para o injetor. No seu interior foi colocado uma barra magnética de agitação revestida com teflon, resultando em um volume interno líquido de 220 μ l.

Alíquotas da reação resultante foram inseridas entre duas bolhas de ar de aproximadamente 50 μ l (medidos com água), e conduzidas à linha do carregador. O sistema AFCM foi operado com o tempo de reação medidos a partir da saída da câmara de mistura.

O injetor de acrílico tipo proporcional⁶³ (I, indicado na Figura III.1) comumente utilizado em análises por injeção em fluxo (FIA), com um arranjo apropriado para o sistema MCFA^{21,60} e ilustrado na Figura III.3, foi operado por meio de dois solenóides (Solemar). Os solenóides foram controlados por um contador de tempo sequencial programado em tempos fixos para carregar e descarregar a alça de amostragem, definindo assim a frequência de injeção.

Tubos de polietileno (d.i. = 0,8 mm) foram usados para a alça de amostragem e linhas de transmissão, enquanto que tubo de teflon (d.i. = 2,0 mm), num suporte cilíndrico de 10 cm de diâmetro, foi empregado como bobina de reação. A temperatura da bobina de reação foi mantida, de acordo com a necessidade, com um banho termostático acoplado a um controlador de temperatura Robertshaw 50 TR e as partes restantes do sistema MCFA permaneceram a temperatura ambiente (22 ± 2)°C, mantida por aparelhos de ar condicionado.

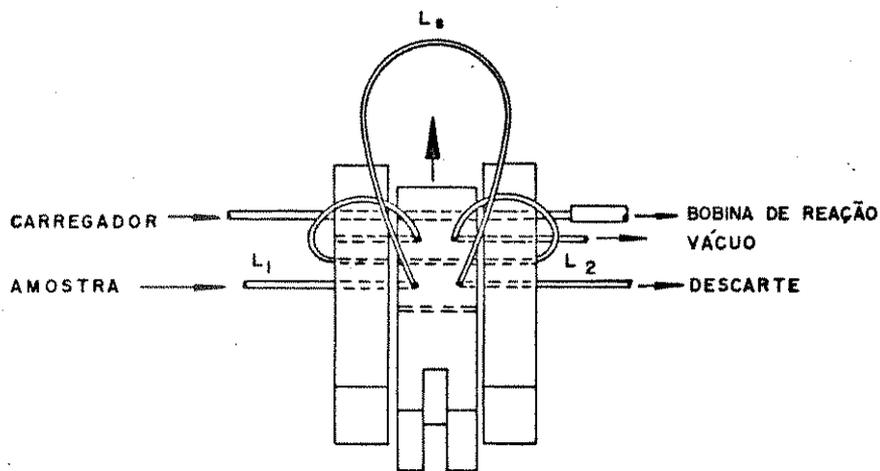


Figura III.3 Injetor tipo proporcional para introdução da amostra monossegmentada²¹.

L_1 e L_2 , segmentos que definem o volume das bolhas de ar; L_3 , segmento que define o volume da amostra.

Antes da detecção do sinal analítico, as bolhas de ar são removidas por uma cela de permeação (P, indicada na Figura III.1 e esquematizada na Figura III.4). Uma membrana de teflon comercial (fita vedarosa, marca Incoflon) de aproximadamente $68 \mu\text{m}$ de espessura foi utilizada para a permeação das bolhas de ar. Esta cela foi confeccionada de acordo com a descrição de Pasquini e Oliveira²¹, porém na forma mais compacta, como a proposta por Ferreira⁵⁹ e acatando suas recomendações operacionais de substituição da membrana a cada 8 horas de trabalho.

As medidas de absorção foram realizadas em um Espectrofotômetro Zeiss PM2A de feixe simples operando a 350 nm , com uma cela de fluxo construída com quartzo, de $80 \mu\text{l}$. Os sinais

analíticos observados foram registrados em transmitância e, posteriormente, calculado o seu valor correspondente em absorbância.

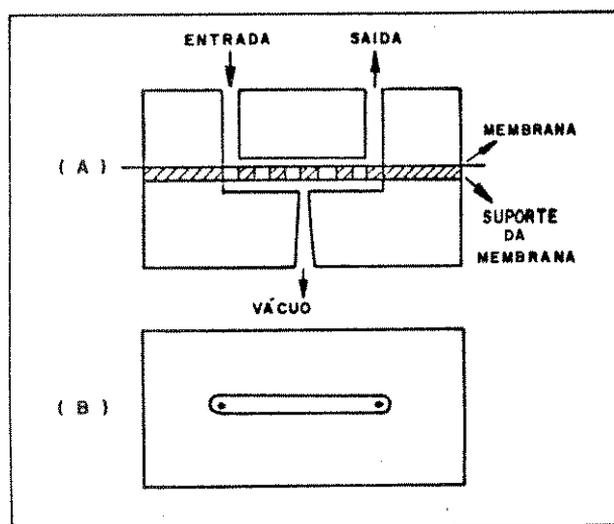


Figura III.4 Cella de permeação.

A, corte transversal e B, vista superior.

Ranhura 2 cm x 2 mm x 0,2 mm e volume de 8 μ l. Externo 30 x 15 x 16 mm.

(Desenho não esta em escala).

Um contador numérico digital, construído usando o mostrador e o circuito lógico de uma calculadora de bolso⁶⁴, foi acoplado ao injetor com a finalidade de fornecer, em qualquer tempo, o número da amostra e o número de injeções realizadas.

Devido à diferença de compressibilidade entre líquidos e gases, é necessário que o procedimento de determinação tenha início somente após o preenchimento total da bobina de reação com o fluido segmentado conforme descrito por Ferreira⁵⁹. Além disso, deve-se

também esperar que toda a linha de transmissão utilizada para o transporte do descarte esteja totalmente preenchida pelo fluido. Isto é realizado com a utilização de água nas linhas de transmissão do sistema em substituição aos reagentes.

Neste trabalho, todas as soluções utilizadas foram preparadas usando água deionizada e reagentes de grau analítico. Quando houve armazenamento, este foi efetuado em frascos escuros ou frascos de polietileno de alta densidade.

As soluções de trabalho de iodeto de potássio foram obtidas pela dissolução de quantidade adequada do sólido KI (Merck) em água, enquanto que as soluções de trabalho do ácido sulfúrico foram preparadas pela diluição de alíquotas da solução concentrada (H_2SO_4 : Merck, $d = 1,84 \text{ g cm}^{-3}$ e $\tau = 96 \%$).

As soluções de trabalho de peróxido de hidrogênio foram preparadas diariamente a partir da solução concentrada (Perhidrol : Merck, 30 % m/v), sendo que o perhidrol foi padronizado periodicamente com o procedimento recomendado por Baccan et alii⁶⁵ e mantido em refrigerador.

Uma solução estoque de Mo(VI), de $1.000 \mu\text{g ml}^{-1}$, foi preparada pela dissolução de 1,5000 g de MoO_3 (Merck) em 10 ml de solução de amônia (Merck) 1 + 1 e completado o volume a 1.000 ml com água. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente por diluições da solução estoque.

As soluções dos ácidos clorídrico e perclórico foram preparadas pela diluição de alíquotas adequadas das soluções concentradas (HCl : Merck, $d = 1,19 \text{ g cm}^{-3}$ e $\tau = 37 \%$ e $HClO_4$: Merck, $d = 1,69 \text{ g cm}^{-3}$ e $\tau = 72 \%$).

A solução de perclorato de sódio usada para o ajuste da força iônica do meio, foi preparada pela dissolução de quantidade adequada do sólido NaClO_4 (Merck) em água, enquanto que as soluções de interferentes Fe(III) , Ti(IV) , W(VI) , V(V) , Cr(VI) e fosfato foram preparadas como descrito no Apêndice 2.

As soluções de α -benzoínoxima (Schering-Kahlbaum), empregadas no processo de extração do molibdênio foram preparadas por dissolução do sólido em etanol (Merck) seguido de agitação. O solvente extrator empregado foi clorofórmio (Carlo Erba) pré-saturado. Para a pré-saturação foram adicionados volumes de clorofórmio e de solução de HCl 1 M, na proporção de 1:4, em funil de separação. O funil foi agitado por 2 min e foram separadas as fases.

A solução de fenolftaleína, usada para o indicar o pH no processo de medida, foi preparada pela dissolução de 1,0 g do composto em 60 ml de etanol e diluiu-se com água a 100 ml.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. CONDIÇÕES INICIAIS

Para o desenvolvimento do método espectrofotométrico de determinação catalítica de molibdênio em plantas tomamos como referência inicial o trabalho de Yatsimirsky e Afanaseva¹⁴ juntamente com a configuração de Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado, MCFA, apresentada na Figura III.1.

A vazão do fluido carregador foi estabelecida em conjunto com o comprimento da bobina de reação, pois o maior interesse era no tempo de reação. Para um tempo de reação de 180 s, utilizado por Yatsimirsky e Afanaseva¹⁴, foi estabelecido a vazão de $4,6 \text{ ml min}^{-1}$ para o fluido carregador (neste trabalho água deionizada) e foi mantida até o final. Outros tempos de reação foram obtidos variando o comprimento da bobina de reação, pois a vazão de $4,6 \text{ ml min}^{-1}$ permite uma boa limpeza da cela de fluxo sem provocar a quebra das bolhas de ar, o que pode ocorrer com vazões mais elevadas para o fluido carregador. As demais vazões na configuração MCFA, por contingências experimentais, foram fixadas a $1,2 \text{ ml min}^{-1}$.

No trabalho referência¹⁴, as concentrações das soluções de KI, H_2SO_4 e H_2O_2 , após a mistura, são 0,0002 M; 0,08 M e 0,001 M, respectivamente. Nas condições estabelecidas no AFCM, para que estas concentrações fossem obtidas na câmara de mistura as concentrações analíticas iniciais das soluções foram : KI = 0,0008 M; $\text{H}_2\text{SO}_4 =$

0,320 M e $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,004 \text{ M}$, e foi empregado um volume de alça de amostragem de 400 μl operando com uma frequência de injeção de 72 h^{-1} , isto é, 20 s para preencher a alça de amostragem e 30 s para descarrega-la.

Sob estas condições e uma concentração de molibdênio a 80 ng ml^{-1} não foi detectado nenhum sinal analítico a 350 nm, tanto para a reação catalisada, por molibdênio como para a reação não-catalisada. Isto ocorreu devido, provavelmente, à diferença de absorvidade molar da espécie determinada. No sistema MCFA a espécie é o íon triiodeto, enquanto que no trabalho de Yatsimirsky e Alfanaseva¹⁴ é o complexo β -amilose- I_3^- .

Comparando estas concentrações com aquelas utilizadas em sistemas de fluxo contínuo para esta mesma reação^{9,10,15-18}, nota-se que a concentração da solução de KI está sempre em excesso. Então, o comportamento do sistema foi avaliado aumentando a concentração analítica da solução de KI e mantendo as demais condições constante. As concentrações analíticas da solução de KI foram 0,006 M e 0,030 M. Isto corresponde a um aumento de cerca de 2 e 10 vezes, respectivamente, em relação à concentração inicial empregada neste trabalho, quando comparadas com a mistura final das soluções.

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela IV.1, indicam que a concentração analítica de KI a 0,030 M é a mais conveniente, pois apresenta valores de absorbância intermediários, que, em princípio, permitirão variações no sistema sem comprometer os valores com os limites da escala de medida do equipamento que utilizamos.

Na Figura IV.1, estão representados os picos correspondentes à concentração 0,030 M da solução de KI da Tabela IV.1. Os picos da

Tabela IV.1 e os demais desse trabalho foram registrados em transmitância, pois o equipamento utilizado não permite registro de sinais em absorbância.

Tabela IV.1 Absorbâncias obtidas para o sistema MCFA com variação da concentração da solução de KI.

soluções de Mo, ng ml ⁻¹	Absorbância	
	KI, 0,006 M	KI, 0,030 M
0	0,035	0,296
20	0,048	0,415
80	0,065	0,598

Para cada conjunto de picos sob a uma mesma condição no sistema MCFA, cada um destes picos foi medido individualmente e calculado seu valor correspondente em absorbância. A média das absorbâncias obtidas representa a medida de absorbância para aquelas condições do sistema MCFA.

Para avaliar o tempo de reação efetuamos um estudo alterando a configuração MCFA para uma configuração de Parada de Fluxo ("stopped-flow"⁶⁶). As modificações consistem na eliminação da bobina de reação e cela de permeação, assim como modificação na configuração do injetor (a configuração Parada de Fluxo esta representada na Figura IV.2). Com as demais condições estabelecidas para o MCFA, obteve-se, então, o sinal correspondente à reação catalisada por 80 ng ml⁻¹ de molibdênio e para a reação não-catalisada e são mostrados na Figura IV.3.

Observa-se (Figura IV.3) que o tempo de reação afeta tanto a reação catalisada como a não-catalisada em proporções mais ou menos

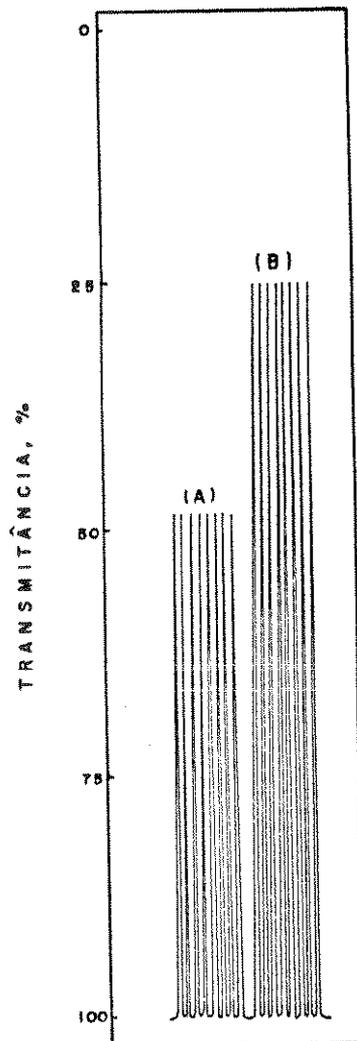


Figura IV.1 Sinal típico obtido pelo sistema MCFA para concentração analítica de KI = 0,030 M.

(A) solução de Mo substituída por água.

(B) solução de Mo = 80 ng ml⁻¹

As demais condições estão descritas no texto.

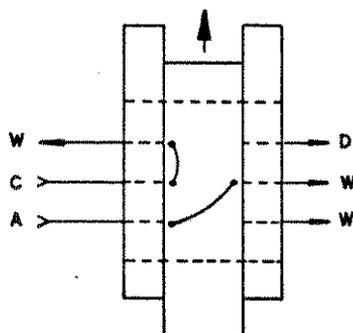


Figura IV.2 Configuração do injetor em Parada de Fluxo⁶⁶.

C, fluido carregador.

A, amostra proveniente da câmara de mistura.

D, cela de fluxo do detector.

W, descarte.

constantes. Conseqüentemente, a diferença entre a absorbância da reação catalisada e a não-catalisada, ΔA , que representa o sinal analítico do método sofrerá influência semelhante. Isto implica dizer que a variável tempo de reação parece ser pouco indicada para melhorar o sinal analítico, ΔA .

Pode-se ainda notar que o aumento do tempo de reação, apesar de aumentar o sinal analítico, provocará um aumento no sinal da reação catalisada. Isto implica dizer que o sinal da reação catalisada poderia estar comprometido, não somente com a escala de medida, mas com a linearidade do método resultante. Achamos, portanto, mais conveniente diminuirmos o tempo de reação, para as condições iniciais do sistema MCFA, de 180s para 130 s. O tempo de reação de 130 s foi escolhido por contingências experimentais, e apesar da perda no sinal analítico com a diminuição do tempo de

reação, esperamos recuperar a perda deste sinal com a otimização do método.

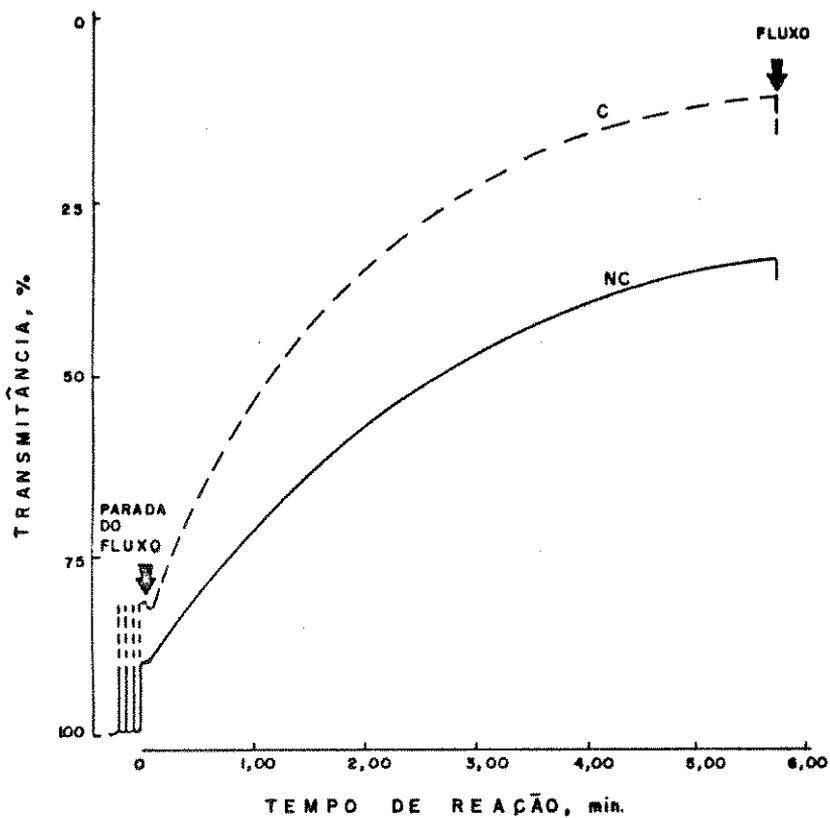


Figura IV.3 Registro do sinal com a técnica Parada de Fluxo.

C, reação catalisada - 80 ng ml^{-1}

NC, reação não-catalisada.

IV.2. PROCEDIMENTOS DE OTIMIZAÇÃO

Usando o sistema MCFA, as reações catalisada por molibdênio (C) e a não-catalisada (NC), que serão chamadas simplesmente de

catalisada e branco, respectivamente, foram seguidas individualmente dentro das condições experimentais estabelecidas ou requeridas pelos procedimentos multivariado de otimização empregado.

Os sinais observados, como citados anteriormente, foram registrados em transmitância e, posteriormente, calculado o seu valor correspondente em absorbância, sendo estes os que serão apresentados e discutidos. Os valores obtidos pela diferença da média da absorbância da reação catalisada e do branco, para um dado conjunto de condições experimentais, será representado por ΔA e citado como sinal analítico. Estas medidas foram obtidas dentro de cada conjunto experimental contendo pelo menos cinco replicatas.

Por conveniência para a discussão dos resultados, o termo concentração será empregado sempre representando a concentração analítica da espécie em questão.

IV.2.1. Planejamento Fatorial Fracionado, 2^{5-1}

Por razões operacionais o estudo de otimização foi conduzido inicialmente com cinco variáveis: a vazão para a solução de Mo, as concentrações das soluções de KI, H_2SO_4 e H_2O_2 e o tempo de reação, pois são as que aparentam ter maior relevância no sinal analítico.

Um planejamento fatorial fracionado^{67,68} do tipo 2^{5-1} apresentado na Tabela IV.2, com condições escolhidas para permitir o acompanhamento da reação catalisada e do branco, foi efetuado dando início ao procedimento de otimização, sendo os níveis das variáveis escolhidos baseados no estudo das condições iniciais (item IV.1) e testes preliminares que apresentaram respostas no sistema.

Tabela IV.2 Planejamento Fatorial 2^{5-1} para resposta das reações catalisadas e não-catalisadas e as suas diferenças ^(a).

Variáveis	Níveis	
	(-)	(+)
l_1 : vazão de Mo, ml min ⁻¹	1,2	3,0
l_2 : conc. H ₂ SO ₄ , M	0,1600	0,3200
l_3 : conc. KI, M	0,0150	0,0300
l_4 : conc. H ₂ O ₂ , M	0,0020	0,0040
l_5 : tempo de reação, s	90	130

ordem de execução	variáveis					respostas ^(b)		
	l_1	l_2	l_3	l_4	l_5	C	NC	ΔA
5	-	-	-	-	+	0,160	0,062	0,098
13	+	-	-	-	-	0,063	0,016	0,052
12	-	+	-	-	-	0,114	0,053	0,061
4	+	+	-	-	+	0,126	0,040	0,086
11	-	-	+	-	-	0,215	0,091	0,124
3	+	-	+	-	+	0,264	0,063	0,201
6	-	+	+	-	+	0,397	0,203	0,194
14	+	+	+	-	-	0,164	0,051	0,113
10	-	-	-	+	-	0,153	0,068	0,085
2	+	-	-	+	+	0,181	0,059	0,122
7	-	+	-	+	+	0,307	0,168	0,139
15	+	+	-	+	-	0,121	0,055	0,066
8	-	-	+	+	+	0,585	0,296	0,289
16	+	-	+	+	-	0,265	0,080	0,185
9	-	+	+	+	-	0,445	0,253	0,192
1	+	+	+	+	+	0,485	0,199	0,286

(a) Condições de operação: volume da alça de amostragem, 400 μ l; conc. de Mo(VI), 80 ng ml⁻¹; vazão dos reagentes, 1,2 ml min⁻¹ e temperatura, (25,0 \pm 0,2)°C.

(b) As respostas estão em termos de unidades de absorvância dos valores médios de 5 replicatas.

Os resultados dos 16 experimentos com respeito a absorvância para a reação catalisada e para o branco, assim como suas respectivas diferenças, ΔA , estão incluídos nessa tabela. Os valores dos efeitos

principais e efeitos de interação binários relativos às variações nas respostas são dados na Tabela IV.3.

Tabela IV.3 Efeitos principal e binários das variáveis experimentais na resposta analítica ^(a).

Efeitos	Respostas		
	C	NC	ΔA ^(b)
$l_1 \rightarrow 1 + 2345 =$	-0,088	-0,079	-0,009
$l_2 \rightarrow 2 + 1345 =$	0,034	0,036	-0,002
$l_3 \rightarrow 3 + 1245 =$	0,199	0,089	0,109
$l_4 \rightarrow 4 + 1235 =$	0,129	0,075	0,054
$l_5 \rightarrow 5 + 1234 =$	0,120	0,053	0,067
$l_{12} \rightarrow 12 + 345 =$	-0,004	-0,004	0,000
$l_{13} \rightarrow 13 + 245 =$	-0,028	-0,034	0,005
$l_{14} \rightarrow 14 + 235 =$	-0,022	-0,019	-0,003
$l_{15} \rightarrow 15 + 234 =$	-0,011	-0,013	0,003
$l_{23} \rightarrow 23 + 145 =$	0,007	0,008	-0,001
$l_{24} \rightarrow 24 + 135 =$	0,010	0,007	0,003
$l_{25} \rightarrow 25 + 134 =$	-0,002	-0,003	0,001
$l_{34} \rightarrow 34 + 125 =$	0,056	0,030	0,026
$l_{35} \rightarrow 35 + 124 =$	0,041	0,019	0,022
$l_{45} \rightarrow 45 + 123 =$	0,024	0,014	0,010
desvio padrão	$\pm 0,005$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$

(a) l_i , $i = 1, 2, \dots, 5$ são valores definidos na Tabela IV.2.

(b) Os valores dos efeitos de ΔA foram calculados usando a tabela de coeficientes de contrastes e os valores de ΔA como resposta. Dentro de uma margem de erro esses valores são a diferença entre as colunas C e NC.

Como indicado, esses efeitos são misturados; efeitos principais com efeitos de interação de quarta ordem e efeitos de interação binário com efeitos ternários. Por exemplo, se os efeitos quaternários são desprezíveis, l_3 representa o efeito principal da concentração de KI sobre as respostas do sistema. Para a reação

catalisada o valor 0,199 indica que um aumento da concentração da solução de KI de 0,0150 M para 0,0300 M aumenta a resposta de 0,199 unidades de absorvância (u.a.). Entretanto essa mesma mudança também aumenta a resposta em relação ao branco de 0,089 u.a.. E deste modo resulta um aumento de ΔA de 0,110 u.a..

A observação mais importante que se pode fazer no conjunto de valores da Tabela IV.3. é que tanto os valores dos efeitos principais como os valores dos efeitos de interação para a reação catalisada e para o branco apresentam os mesmos sinais. Isto significa que qualquer mudança das condições experimentais que visem aumentar o sinal para a reação catalisada provocará, também, um aumento no sinal relativo ao branco. Por esta razão, os efeitos calculados para o ΔA são, em geral, menores que os valores para os sinais da reação catalisada e do branco. A alta correlação entre a resposta da catalisada e do branco como função das variáveis experimentais estudadas, com fins de aplicação para determinação de Mo, aparenta ser um fator limitante com respeito ao aumento de sensibilidade usando a técnica MCFA.

Convém lembrar que os resultados da Tabela IV.3 são válidos somente dentro dos limites dos valores estabelecidos para as variáveis experimentais, mas outros experimentos realizados fora destes limites usando o Método Simplex^{69,70} e o Método de Análise de Superfície de Respostas⁶⁷, discutidos a seguir, também indicaram alta correlação entre estes sinais.

O resultado do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , indica que um aumento no sinal analítico, ΔA , pode ser obtido pelo aumento das concentrações de KI e H_2O_2 , assim como aumentando o tempo de

reação. As demais variáveis apresentam efeitos principal e binário desprezíveis ou pouco significativo com respeito ao ΔA . Por outro lado, vale ressaltar que o aumento da vazão de Mo poderá diminuir o valor de absorbância para as reações catalisada e não-catalisada sem afetar de maneira significativa o sinal analítico, ΔA .

IV.2.2. Método Simplex Modificado

Na tentativa de aumentar a sensibilidade do método MCFA para propósitos analíticos foi realizado experimentos usando o procedimento do Método Simplex Modificado⁷¹⁻⁷³ para se verificar a possibilidade de aumentar o valor de ΔA . Por dificuldades operacionais as variáveis vazão de molibdênio e o tempo de reação não foram incluídos neste estágio do estudo de otimização. Entretanto, como a manipulação dos valores das concentrações são fáceis, no nosso conjunto de experimentos foi incluído a concentração de H_2SO_4 apesar de, no estudo anterior, se mostrar menos importante que as concentrações de KI e H_2O_2 .

O vértice inicial do simplex corresponde aos valores de alta concentração para as soluções de KI, H_2SO_4 e H_2O_2 (0,0300 M; 0,3200 M e 0,0040 M; respectivamente), usados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} . Uma solução de Mo de 40 ng ml^{-1} , metade da concentração empregada no planejamento fatorial fracionado, foi usada no estudo simplex para evitar problemas de respostas com altos valores para a reação catalisada e o limite da escala. Para o tempo de reação e vazão de Mo, foi estabelecido os valores 130 s e $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ (níveis superiores do estudo anterior), respectivamente,

pois conforme análise dos efeitos (Tabela IV.3) estes valores são mais favoráveis com respeito ao sinal analítico.

Os resultados experimentais para o valor de ΔA como função da concentração dos reagentes estão apresentados na Tabela IV.4. O décimo oitavo vértice experimental do simplex resulta no máximo valor de ΔA , 0,595 u.a.. Esse valor é o dobro do maior valor de ΔA da Tabela IV.2, sendo que a solução de Mo, nesse estudo, é duas vezes mais diluída que aquela usada no planejamento fatorial fracionado.

No movimento do simplex em direção ao valor máximo de ΔA a concentração de KI aumentou gradualmente em torno de três vezes o seu valor inicial, enquanto que a concentração de H_2O_2 não apresentou variações significativas. Por outro lado, o valor da concentração de H_2SO_4 diminuiu em relação às usadas no planejamento fatorial fracionado logo nos primeiros movimentos do simplex. Próximo ao vértice ótimo do simplex (n° 18) a concentração de H_2SO_4 oscilou entre valores altos e baixos e apresentou valores negativos no décimo quinto e décimo nono vértices.

O menor valor de ΔA da Tabela IV.4 ocorre para o vigéssimo quinto vértice, próximo aos valores de concentração de KI e H_2O_2 correspondente ao ótimo. Uma concentração de ácido muito pequena para os experimentos neste vértice, 0,0005 M, provoca uma diferença muito pequena entre o sinal da catalisada e do branco.

Se for acompanhado o desenvolvimento do simplex, nota-se que até a localização do valor de $\Delta A = 0,595$ (vértice 18) o tamanho do simplex aumentou em torno de 8 vezes em relação ao simplex inicial (veja Apêndice 1). Um simplex grande pode provocar movimentos que

Tabela IV.4 Desenvolvimento do simplex para a resposta de ΔA como função das concentrações analíticas de KI, H_2SO_4 e H_2O_2 .

Condições de operação: vazão da amostra (Mo ou branco), $3,0 \text{ ml min}^{-1}$; vazão para os reagentes, $1,2 \text{ ml min}^{-1}$; concentração de Mo, 40 ng ml^{-1} ; alça de amostragem, $400 \mu\text{l}$; tempo de reação, 130s ; temperatura de reação, $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.

Vért.	Mov.	Vért. Retido	$C_{H_2SO_4}$	C_{KI}	$C_{H_2O_2}$	ΔA
01			0,4200	0,0300	0,0040	0,183
02			0,3200	0,0400	0,0040	0,314
03			0,3200	0,0300	0,0050	0,236
04 (b)			0,3200	0,0300	0,0040	0,198
05	R	02,03,04	0,2200	0,0367	0,0047	0,253
06	R	02,03,05	0,2533	0,0411	0,0051	0,307
07	R	02,05,06	0,2089	0,0485	0,0042	0,352
08	E	02,05,06	0,1533	0,0578	0,0038	0,372
09	R	02,06,08	0,2644	0,0559	0,0039	0,353
10	R	02,08,09	0,2385	0,0614	0,0027	0,341
11	R	08,09,10	0,1175	0,0767	0,0029	0,457
12	E	08,09,10	0,0162	0,0951	0,0024	0,370
13	R	08,09,11	0,1183	0,0655	0,0044	0,523
14	E	08,09,11	0,0582	0,0676	0,0052	0,528
15	R	08,11,14	-0,0451*	0,0788	0,0041	--
16	CMD	08,11,14	0,1870	0,0616	0,0039	0,426
17	R	11,14,16	0,0885	0,0795	0,0042	0,542
18	E	11,14,16	0,0561	0,0903	0,0044	0,595
19	R	11,14,18	-0,0325*	0,0948	0,0044	--
20	CMD	11,14,18	0,1321	0,0699	0,0040	0,421
21**		--	0,0868	0,0835	0,0037	0,479
22		--	0,0572	0,0790	0,0048	0,517
23		--	0,1216	0,0760	0,0042	0,481
24	R	18,22,23	0,0698	0,0800	0,0052	0,516
25	R	18,22,24	0,0005	0,0902	0,0054	0,116
26	CMD	18,22,24	0,0913	0,0796	0,0045	0,531
27	R	18,22,26	0,0666	0,0859	0,0039	0,550
28	R	18,26,27	0,0855	0,0915	0,0037	0,527
29	C	18,26,27	0,0784	0,0884	0,0040	0,560
30	R	18,27,29	0,0427	0,0968	0,0037	0,503

(a) movimentos do simplex: R, refelexão; E, expansão; CMD, contração com mudança de direção e C, contração.

(b) vértice inicial do simplex.

* como a concentração do ácido requereu valores negativos, suas respostas foram consideradas piores resultados.

** corresponde a uma contração maciça mantendo o vértice 18.

ultrapassam linhas de contorno da superfície de resposta levando a resultados menos desejáveis. A partir daí, os movimentos observados são acompanhados de reduções das dimensões do simplex e nos vértices 26, 27 e 28 ele está com o mesma dimensão do simplex inicial, porém não apresenta melhoria no resultado. A redução das dimensões do simplex para a metade do inicial (vértices 29 e 30), também mostrou ser ineficiente.

Os movimentos do simplex a partir do vértice 18 leva a concluir que a) um valor máximo foi encontrado ou b) o simplex está localizado sobre alguma encosta onde as linhas de contorno são espaçadas e o seu tamanho esta inadequado. O conhecimento da superfície de respostas permitirá, além de esclarecer a dúvida anterior, melhorar o resultado.

IV.2.3. Análise de Superfície de Respostas

Dando sequência ao estudo multivariado de otimização das concentrações de KI, H_2SO_4 e H_2O_2 para ΔA como resposta analítica, um planejamento fatorial composto⁶⁷ foi conduzido usando as condições do décimo oitavo vértice do simplex como ponto central do sólido geométrico que representa este tipo de planejamento (Figura IV.4).

Como o valor de ΔA obtido no estudo simplex aparenta ser relativamente insensível à concentração de H_2O_2 (veja os maiores valores de ΔA) os pontos da "estrela" do fatorial composto foram determinados usando um fator escalonado de $\sqrt{2}$ que é menor que o valor convencional $\sqrt{3}$ para o planejamento fatorial composto para três variáveis, tendo o ponto central um conjunto de três

experimentos de controle.

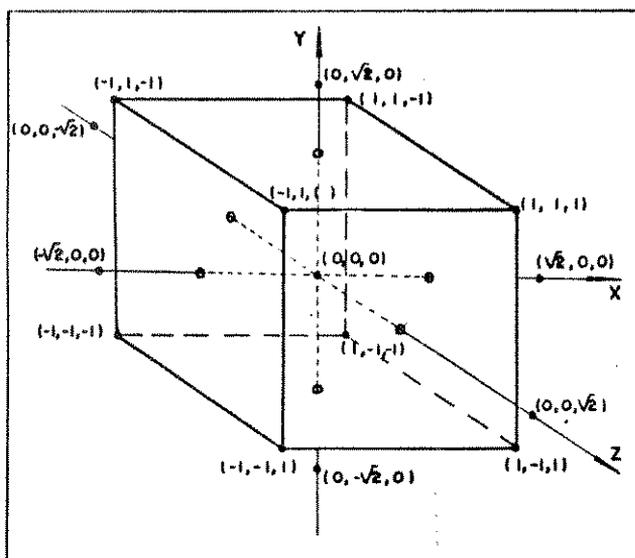


Figura IV.4 Representação espacial do planejamento fatorial composto.

X - conc. escalonada de H_2SO_4 .

Y - conc. escalonada de KI.

Z - conc. escalonada de H_2O_2 .

O escalonamento utilizado para os valores das variáveis obedece a equação geral:

$$C' = \frac{C - \bar{m}}{(S - I)/2} \quad \text{onde,}$$

C e C', concentrações escalonadas e não-escalonadas, respectivamente. S e I, limites superior e inferior, respectivamente, da região estudada e \bar{m} , média aritmética entre S e I.

O vértice 18 do simplex, ponto central do planejamento fatorial composto, no escalonamento representa a média dos limites superior e inferior, \bar{m} . Para definir a região explorada, os limites superior e inferior foram estabelecidos tomando o vértice 17 (simplex) como referência, que em relação ao ΔA difere do vértice 18 não mais que 10 %. Os parâmetros para o procedimento de cálculos estão definidos na Tabela IV.5.

Tabela IV.5 Parâmetros para definição da região explorada pelo planejamento fatorial composto.

variável	vért. 18	1º limite vért. 17	$[\Delta v. (18-17)]$	2º limite (Vért. 18 + Δv).
$C_{H_2SO_4}$	0,0561	0,0885	-0,0324	0,0237
C_{KI}	0,0903	0,0795	0,0108	0,1011
$C_{H_2O_2}$	0,0044	0,0042	0,0002	0,0046

Portanto, as equações utilizadas para o escalonamento das variáveis são:

$$C'_{H_2SO_4} = \frac{C_{H_2SO_4} - 0,0561}{0,0324} \quad , \quad C'_{KI} = \frac{C_{KI} - 0,0903}{0,0108} \quad e$$

$$C'_{H_2O_2} = \frac{C_{H_2O_2} - 0,0044}{0,0002}$$

Planejamento Fatorial 2^3 , Composto

Com valores escalonados para as variáveis, os pontos do

planejamento fatorial composto foram experimentados e os resultados obtidos são mostrados na Tabela IV.6.

Tabela IV.6 Planejamento fatorial composto para $C_{H_2SO_4}$, C_{KI} e $C_{H_2O_2}$

Exper.	Variáveis			Absorbância		
	$C'_{H_2SO_4}$	C'_{KI}	$C'_{H_2O_2}$	Catalis.	Branco	ΔA
01	-1	-1	-1	0,615	0,243	0,372
11	1	-1	-1	0,840	0,354	0,486
02	-1	1	-1	0,834	0,358	0,476
12	1	1	-1	1,115	0,492	0,623
09	-1	-1	1	0,668	0,294	0,374
10	1	-1	1	0,891	0,384	0,507
03	-1	1	1	0,895	0,405	0,490
04	1	1	1	1,149	0,543	0,606
15	-1,4	0	0	0,621	0,313	0,308
08	1,4	0	0	1,027	0,472	0,555
06	0	-1,4	0	0,782	0,317	0,465
16	0	1,4	0	1,132	0,504	0,628
14	0	0	-1,4	0,927	0,389	0,538
07	0	0	1,4	0,969	0,420	0,549
05	0	0	0	0,934	0,398	0,536
13	0	0	0	0,973	0,424	0,549
17	0	0	0	0,963	0,425	0,538

C' , concentração escalonadas.

Condições experimentais definidas na Tabela IV.4.

Com análise de regressão múltipla⁷⁴ dos valores de absorbância para cada situação resposta e os valores das concentrações escalonadas obtem-se as equações de superfície de respostas, listadas na página seguinte.

Comparando os coeficientes das equações observa-se que, ao contrário dos coeficientes para a concentração escalonada de KI e H_2SO_4 , os coeficientes para os termos contendo H_2O_2 na equação para o ΔA são desprezíveis, conforme havia sido observado no estudo simplex.

Isto confirma a insensibilidade do valor de ΔA com respeito às variações da concentração de H_2O_2 na faixa de 0,0041 M a 0,0047 M, que foi mais uma vez confirmado no estudo do caminho de ascensão máxima, que será discutido mais a diante.

Equações das superfícies de resposta:

a) Para resposta da reação catalisada:

$$\begin{aligned}
 A_{cat.} &= 0,9596 + 0,1298 C'_{H_2SO_4} + 0,1228 C'_{KI} + 0,0215 C'_{H_2O_2} \\
 &- 0,0700 C'^2_{H_2SO_4} - 0,0035 C'^2_{KI} - 0,0080 C'^2_{H_2O_2} \\
 &+ 0,0109 C'_{H_2SO_4} C'_{KI} - 0,0036 C'_{H_2SO_4} C'_{H_2O_2} - 0,0011 C'_{KI} C'_{H_2O_2} \quad (1)
 \end{aligned}$$

$$r = 0,9971$$

b) Para resposta do branco:

$$\begin{aligned}
 A_{br.} &= 0,4190 + 0,0582 C'_{H_2SO_4} + 0,0656 C'_{KI} + 0,0186 C'_{H_2O_2} \\
 &- 0,0158 C'^2_{H_2SO_4} - 0,0068 C'^2_{KI} - 0,0098 C'^2_{H_2O_2} \\
 &+ 0,0089 C'_{H_2SO_4} C'_{KI} - 0,0021 C'_{H_2SO_4} C'_{H_2O_2} + 0,0021 C'_{KI} C'_{H_2O_2} \quad (2)
 \end{aligned}$$

$$r = 0,9943$$

c) Para a resposta analítica, ΔA :

$$\begin{aligned}
 \Delta A &= 0,5406 + 0,0716 C'_{H_2SO_4} + 0,0572 C'_{KI} + 0,0030 C'_{H_2O_2} \\
 &- 0,0542 C'^2_{H_2SO_4} + 0,0033 C'^2_{KI} + 0,0018 C'^2_{H_2O_2} \\
 &+ 0,0020 C'_{H_2SO_4} C'_{KI} - 0,0015 C'_{H_2SO_4} C'_{H_2O_2} - 0,0032 C'_{KI} C'_{H_2O_2} \quad (3)
 \end{aligned}$$

$$r = 0,9924$$

Planejamento Fatorial 2^2 , Composto

Considerando a concentração de H_2O_2 constante e igual ao valor do ponto central do planejamento fatorial 2^3 (Tabela IV.6) isto é 0,0044 M, este planejamento fatorial pode ser decomposto para um outro planejamento fatorial composto para as variáveis escalonadas das concentrações de H_2SO_4 e KI. Na Tabela IV.7 é apresentado o planejamento fatorial composto para os valores de ΔA com variação das concentrações de H_2SO_4 e KI. A análise de regressão⁷⁴ dos valores de ΔA com os valores das concentrações escalonadas de H_2SO_4 e KI, resulta na equação:

$$\Delta A = 0,5420 + 0,0757 C'_{H_2SO_4} + 0,0573 C'_{KI} - 0,0545 C'^2_{H_2SO_4} + 0,0030 C'^2_{KI} + 0,0020 C'_{H_2SO_4} C'_{KI} \quad (4)$$

(0,0029) (0,0023) (0,0023) (0,0023)

onde os valores em parênteses são desvios padrões nos valores dos coeficientes. Além do termo constante nesta equação, somente os termos lineares e o quadrático para a concentração de H_2SO_4 são estatisticamente significantes em torno de 95 % de nível de confiança.

A equação 4 quando aplicada para uma faixa maior de concentrações escalonadas das variáveis representa uma superfície de resposta do tipo "ponto de cela" mostrada na Figura IV.5.

Tabela IV.7 Planejamento fatorial composto para valores de resposta de ΔA como função das concentrações escalonadas de H_2SO_4 e KI.

variáveis		absorbância
$C_{H_2SO_4}$	C_{KI}	ΔA
-1	-1	0,373
1	-1	0,497
-1	1	0,483
1	1	0,615
-1,4	0	0,308
1,4	0	0,555
0	-1,4	0,465
0	1,4	0,628
0	0	0,538
0	0	0,549
0	0	0,536
0	0	0,549
0	0	0,538

Condições experimentais são as mesmas estabelecidas na Tabela IV.4 e $C_{H_2O_2} = 0,0044$ M.

Embora não totalmente válida para a faixa de concentração escalonada representada (a área sombreada naquela figura corresponde à região de concentração investigada pelo planejamento fatorial composto e a porção inicial do caminho da ascensão máxima), é possível visualizar o caminho seguido do ponto inicial do simplex ao planejamento fatorial composto até o topo da superfície.

As linhas de contorno da superfície de respostas da área sombreada na Figura IV.5 são mostradas na Figura IV.6, com círculos

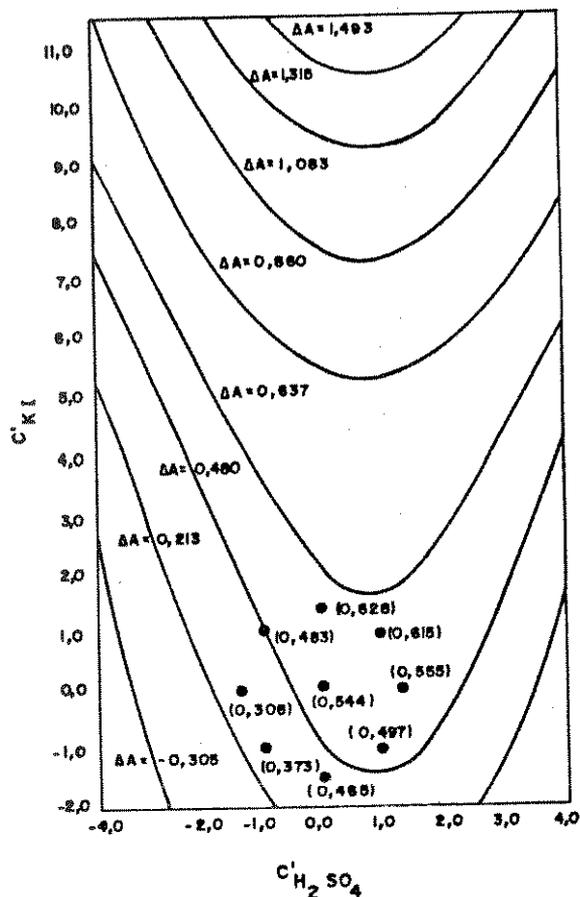


Figura IV.6 Linhas de contorno da superfície de respostas para o ΔA como função das concentrações escalonadas dos reagentes e concentração analítica de H_2O_2 a 0,0041 M.

Caminho da Ascensão Máxima

Expressando em concentrações reais de H_2SO_4 e KI os termos significativos da equação (4), temos:

$$\Delta A = -0,022 + 8,16 C_{\text{H}_2\text{SO}_4} + 0,66 C_{\text{KI}} + 51,92 C_{\text{H}_2\text{SO}_4}^2 \quad (5).$$

Esta equação gera as linhas de contorno da Figura IV.7 com respeito às variáveis reais das concentrações de KI e H_2SO_4 .

Diversos experimentos, indicados pelos círculos vazados na Figura IV.7, com concentrações de H_2SO_4 e KI no caminho da ascensão máxima do planejamento fatorial composto (linha do ponto central desse planejamento e perpendicular às linhas de contorno) foram realizados.

A linha que representa o caminho da ascensão máxima e os pontos experimentais foram definidos no gráfico da Figura IV.6. Estes experimentos foram realizados com duas concentrações para a solução de H_2O_2 (0,0041 M e 0,0047 M, valores mínimo e máximo do planejamento fatorial composto) pois para obtenção da superfície admitiu-se que ela não interferiria na resposta de ΔA .

Os resultados experimentais do caminho da ascensão máxima se encontram na Tabela IV.8 e confirmam a insensibilidade do ΔA com respeito à concentração de H_2O_2 e, portanto, a concentração de 0,0041 M foi adotada como a mais conveniente para o estudo do caminho da ascensão máxima (Figura IV.7).

O maior valor de ΔA obtido nesses experimentos é 0,743 u. a. correspondente a um aumento significativo na resposta analítica quando comparada com os valores obtidos para o planejamento fatorial. Os experimentos realizados para o caminho da ascensão máxima com valores de concentração mais afastados da região do planejamento fatorial resultam em valores de ΔA menores, 0,718 e 0,699 u. a.. A diminuição desses valores com respeito ao valor de ΔA previsto no

planejamento fatorial composto pode ser explicado: a) a superfície de respostas para altos valores de concentração de KI possui uma rampa diferente daquela próxima ao planejamento fatorial impedindo extrapolações para regiões afastadas e b) o sinal analítico para a reação catalisada aproxima do limite da escala de resposta analítica para esses valores mais elevados de concentrações de KI.

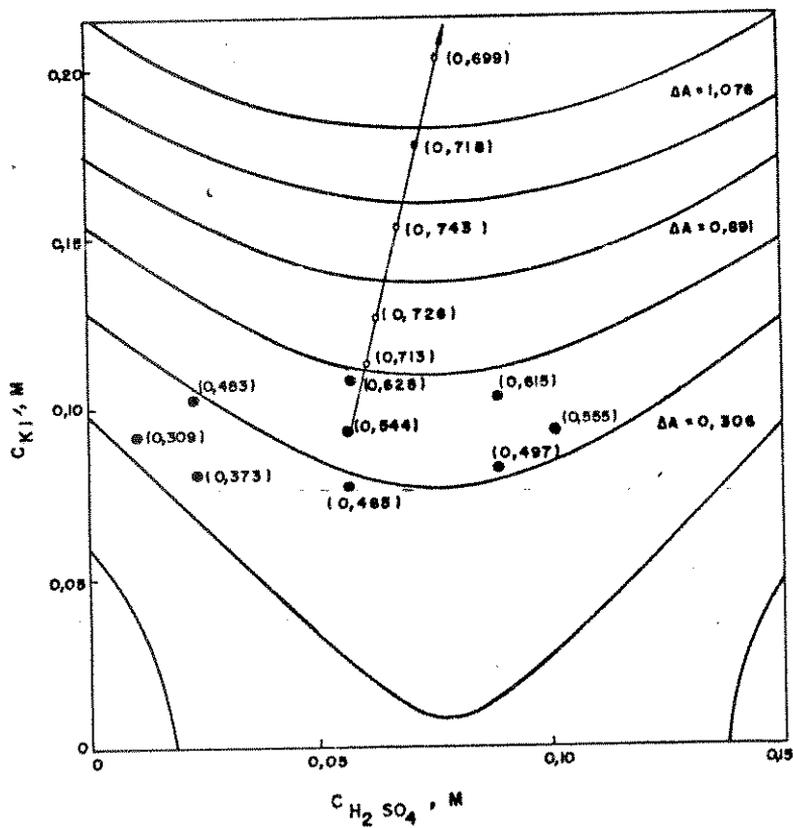


Figura IV.7 Linhas de contorno da superfície de resposta para o ΔA e caminho da ascensão máxima como função das concentrações reais dos reagentes e concentração de H_2O_2 a 0,0041 M.

Resaltamos então que os valores de 0,1528 M, 0,0665 M e 0,0041 M foram tomadas como sendo as concentrações analíticas ótimas para soluções de KI, H_2SO_4 e H_2O_2 , respectivamente, as quais produzem os sinais analíticos de 1,455 u.a., 0,712 u.a. e 0,743 u.a. para a reação catalisada, branco e ΔA , respectivamente, nas condições operacionais empregadas (ver Tabela IV.4).

Tabela IV.8 Caminho da ascensão máxima.

Exper. *	H_2O_2	Concentr. Molar		Absorbância		
	Conc. Molar	H_2SO_4	KI	Catalis.	Branco	ΔA
02	0,0041	0,0597	0,1119	1,180	0,467	0,713
04	0,0047	0,0597	0,1119	1,292	0,582	0,710
01	0,0041	0,0613	0,1270	1,300	0,574	0,726
10	0,0047	0,0613	0,1270	1,401	0,671	0,730
07	0,0041	0,0665	0,1528	1,455	0,712	0,743
03	0,0047	0,0665	0,1528	1,563	0,823	0,740
06	0,0041	0,0720	0,1778	1,576	0,858	0,718
09	0,0047	0,0720	0,1778	1,690	0,975	0,715
08	0,0041	0,0772	0,2028	1,682	0,983	0,699
05	0,0047	0,0772	0,2028	1,762	1,075	0,687

* a ordem dos experimentos foi aleatória e não sequencial (veja Apêndice 1), pois também era desejável avaliar o comportamento do ΔA em relação à concentração de H_2O_2 .

IV.3. ADAPTAÇÕES DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO EM ROTINA

Conhecido os aspectos gerais do comportamento do sistema em relação às concentrações dos reagentes, conjuntos específicos de experimentos complementares foram realizados para

adaptação do método para a determinação de traços de Mo(VI) em rotina.

Nos experimentos anteriores ficou evidenciado que um aumento no valor de ΔA está correlacionado com um aumento do sinal do branco. No entanto, apesar de ser mais importante a precisão da medida do branco do que o seu tamanho quando se deseja ganho de sensibilidade e limite de detecção, foram realizados estudos para a diminuição do valor de absorbância do branco sem comprometer os valores de ΔA .

Primeiramente, soluções de iodo (tanto preparada previamente como gerado em linha) foram empregadas como carregador em substituição à água. Observou-se uma linha base instável, associada com um grande efeito "carry over"(*), indicando resultados indesejáveis com este procedimento, de modo que optamos pela manutenção de água como carregador.

Vazão da Amostra versus Vazão dos Reagentes

Como os resultados do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} mostraram que o efeito de diluição em linha diminui o sinal do branco pouco afetando o valor do ΔA , então o efeito de aumento de vazões foi estudado. Um planejamento fatorial 2^2 (Tabela IV.9), para as vazões dos reagentes (KI , H_2SO_4 e H_2O_2) e a vazão da amostra (Mo ou branco) foi efetuado com o objetivo de observar o comportamento do sinal

CARRY OVER - aumento crescente da altura dos picos subsequentes sem alteração significativa da linha base. Geralmente causada por resíduos na linha.

analítico do branco.

Na Tabela IV.9, encontra-se as condições e resultados dos experimentos, assim como a estimativa dos efeitos as quais indicam que tanto aumentando a vazão da amostra como diminuindo a vazão dos reagentes pode-se obter decréscimo no sinal do branco com uma perda aceitável de ΔA , em proporções mais ou menos iguais para qualquer uma das duas alternativas adotadas. A primeira opção foi escolhida porque pode ser empregada sem alterar a frequência de injeção, o que não é possível com a segunda.

Tabela IV.9 Planejamento fatorial 2^2 e os efeitos das vazões da amostra e dos reagentes nos valores de absorbância ^(a).

variáveis, ml min ⁻¹	níveis	
	(-)	(+)
l_1 - vazão da amostra	3,0	4,7
l_2 - vazão dos reagentes	0,8	1,2

exper.	variáveis		resposta		
	l_1	l_2	catalis.	branco	ΔA
01	-	-	1,191	0,457	0,743
04	+	-	0,786	0,242	0,544
02	-	+	1,531	0,745	0,786
03	+	+	1,180	0,449	0,731

efeitos	resposta		
	catalis.	branco	ΔA
l_1	-0,378	-0,256	-0,123
l_2	0,367	0,248	0,120
$l_1 \times l_2$	0,027	0,041	0,068
desvio padrão	$\pm 0,017$	$\pm 0,001$	$\pm 0,016$

(a) condições de operação: concentração de Mo(VI), 40 ng ml⁻¹ e volume da amostra, 400 μ l. As demais condições são mostradas na Tabela IV.4.

Um estudo univariado suplementar, mantendo as vazões dos reagentes constantes em $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ (Figura IV.8) indicou que vazões da amostra acima de $6,0 \text{ ml min}^{-1}$ provoca um decréscimo mais pronunciado nos valores de ΔA .

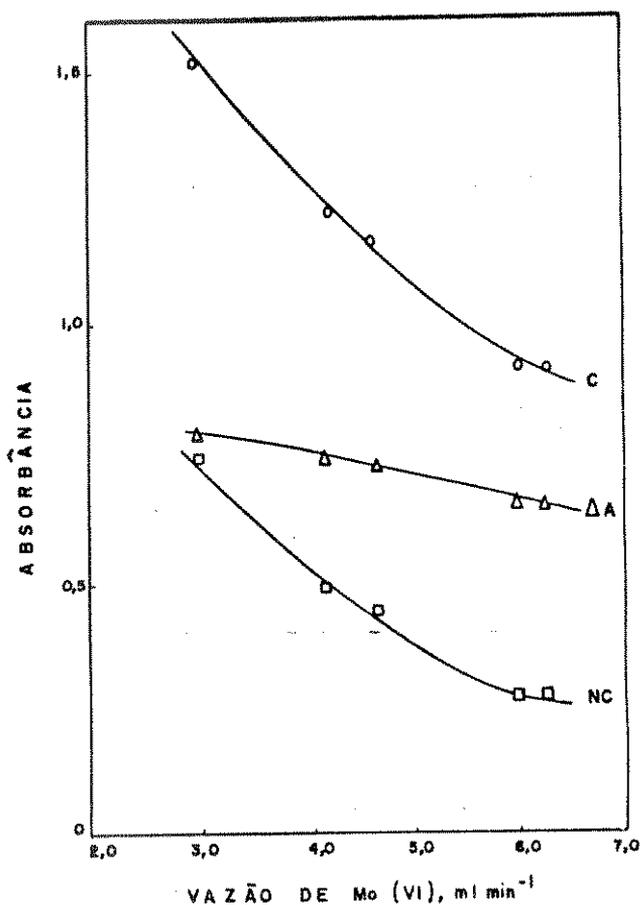


Figura IV.8 Estudo do efeito da vazão de Mo(VI), com vazão dos reagentes a $1,2 \text{ ml min}^{-1}$. Condições experimentais: Tabela IV.4.

Para os estudos subsequentes, a vazão de $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ para cada um dos reagentes foi mantida e a vazão de $4,7 \text{ ml min}^{-1}$ para a

amostra [Mo(VI) ou branco] foi adotada. Nessa condições uma perda de aproximadamente 2% no valor do ΔA foi obtida quando comparado com o valor obtido na otimização das concentrações, enquanto que foi conseguido uma diminuição razoável do branco (de 0,712 para 0,449 u.a.).

Volume da Alça de Amostragem

O volume de amostra introduzido no sistema AFCM é uma característica que pode aumentar a sensibilidade da determinação exigindo um menor volume de amostra quando comparado com sistema segmentado⁵⁸. Por outro lado, o volume de amostra esta relacionado com o volume da cela de fluxo do detector, pois volume muito grande pode levar a um sinal estacionário que exigirá um longo tempo de limpeza. Para a cela de fluxo de 80 μl que utilizamos, um estudo univariado do volume da alça de amostragem de 100 μl a 600 μl foi efetuado e os resultados se encontram na Figura IV.9.

Analisando as curvas da Figura IV.9 nota-se que para volumes acima de 300 μl as medidas de ΔA tendem a se estabilizar. Portanto 300 μl ficou estabelecido como volume recomendado para alça de amostragem.

Temperatura versus Tempo de Reação

Um aumento do sinal analítico através de variações no tempo de reação, como já discutido no item IV.1, parece ser pouco indicado. Todavia, um estudo do comportamento da temperatura e tempo de reação foi efetuado com um planejamento fatorial 2^2 e é mostrado na Tabela IV.10.

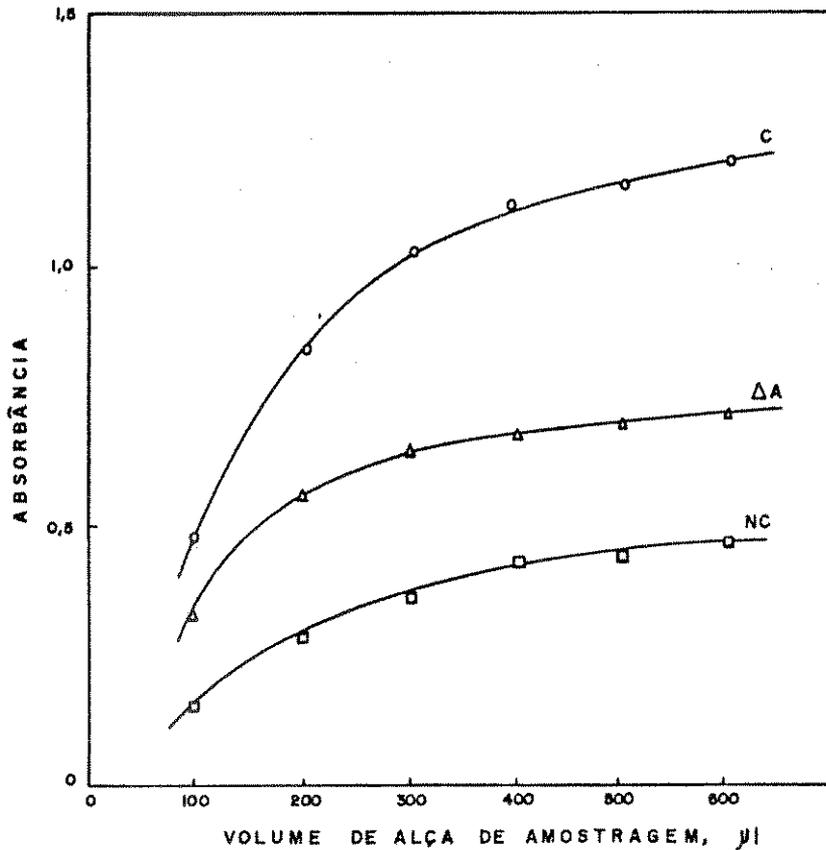


Figura IV.9 Estudo do volume da alça de amostragem. Condições : concentrações otimizadas dos reagentes. As demais condições estão na Tabela IV.4, com vazão de Mo e reagentes a 4,7 e 1,2 ml min⁻¹, respectivamente.

Os efeitos mais importantes que podem ser observados na Tabela IV.10 são aqueles relacionados aos efeitos para branco e ΔA. Nota-se que aumentar a temperatura implica em um aumento de ΔA, porém acompanhado de um aumento, ainda maior, no branco.

O efeito do tempo de reação é igual para ambos, branco e ΔA,

Tabela IV.10 Planejamento fatorial 2^2 e os efeitos de temperatura e tempo de reação no valor de absorvância^(a).

variáveis	níveis	
	(-)	(+)
t_1 - temperatura, C	20	30
t_2 - tempo de reação, s	110	170

exper.	variáveis		resposta		
	t_1	t_2	catalis.	branco	ΔA
03	-	-	0,865	0,288	0,577
04	+	-	1,295	0,562	0,723
02	-	+	1,199	0,415	0,784
01	+	+	1,599	0,757	0,482

efeitos	resposta		
	catalis.	branco	ΔA
t_1	0,415	0,308	0,102
t_2	0,319	0,161	0,163
$t_1 \times t_2$	-0,015	0,034	-0,044
desvio padrão	$\pm 0,008$	$\pm 0,004$	$\pm 0,004$

(a) concentração de Mo(VI), 40 ng ml^{-1} . Concentrações, vazões e volume de amostra otimizados.

As demais condições: Tabela IV.4.

confirmando os teste preliminares (item IV.1). Observa-se ainda que, o efeito de interação das variáveis para o branco e ΔA são significativos e de mesma grandeza, porém com sinais contrários. Isto quer dizer que o efeito de interação afeta o sinal do branco e o valor de ΔA de maneira inversa. Isto significa que o aumento da temperatura e do tempo de reação provocará um aumento na absorvância do branco e um decréscimo no valor de ΔA .

Uma otimização multivariada destas variáveis nos levariam a inconveniências experimentais. No entanto, analisando a faixa de

temperatura estudada (20 a 30° C) com respeito ao efeito principal observa-se que um aumento de apenas 0,010 u.a. no valor de ΔA é esperado para uma variação de 1 °C, indicando que, nesta faixa de temperatura, o controle rigoroso da mesma não será necessário. Isto é muito conveniente quando este método for empregado em trabalhos de rotina, pois significa que bastaria um controle de temperatura com um sistema de ar condicionado que mantenha o ambiente a (25 ± 2) °C para a obtenção de resultados reprodutíveis. Esta possibilidade foi verificada, posteriormente, confirmando as previsões do planejamento fatorial.

Uma análise semelhante poderia ser efetuada para o tempo de reação. Entretanto, os parâmetros físicos que definem o tempo de reação no MCFA, bobina de reação e vazão do carregador, fazem com que o tempo de reação seja reprodutível para todas as alíquotas analisadas e, conseqüentemente, esta variável apresenta um valor discreto e não um intervalo de trabalho permitido. Portanto, um estudo univariado complementar do comportamento desta variável, mostrado na Figura IV.10, foi efetuado para estabelecer o melhor tempo de reação para o sistema.

Observa-se (Figura IV.10) que para tempos de reação em torno de 130 s ou superiores o comportamento do ΔA e branco são semelhantes, conforme previsto pelo Fatorial (Tabela IV.10). Nota-se ainda que para valores de tempo de reação superiores a 130 s, o valor de absorvância para a reação catalisada é muito elevado, o que implica em limitações com a escala de medidas, principalmente quando altas concentrações de molibdênio forem empregadas. Portanto, o tempo de reação a 130 s foi adotado neste trabalho.

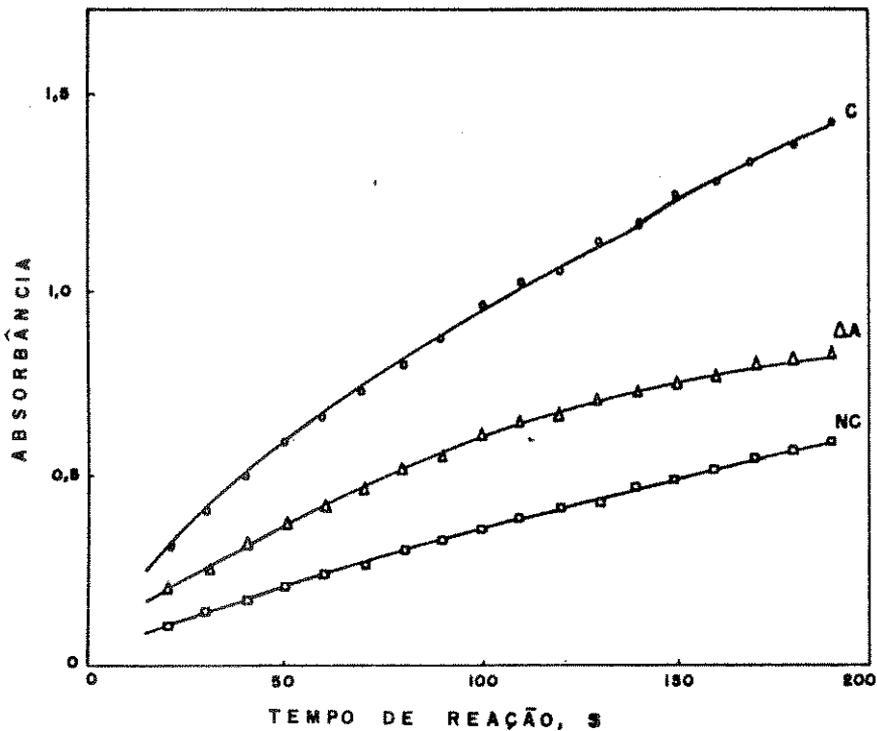


Figura IV.10 Influência do tempo de reação.

Vazão de Mo(VI) : $4,7 \text{ ml min}^{-1}$.

Vazão dos reagentes: $1,2 \text{ ml min}^{-1}$.

Volume da alça de amostragem :

$300 \mu\text{l}$. Conc. de Mo(VI): 40 ng ml^{-1} .

As demais condições: Tabela IV.4.

Sensibilidade e Linearidade do Método

Sob as condições experimentais estabelecidas no decorrer deste trabalho, obtivemos uma curva de calibração (Figura IV.11). Observa-se que a curva apresenta linearidade até 50 ng ml^{-1} de Mo(VI). O desvio padrão relativo varia pouco sobre a faixa de

concentração investigada. Para um conjunto de 10 replicatas o desvio padrão variou de 1,2% no nível de 1 ng ml^{-1} de Mo(VI) a 0,5% no

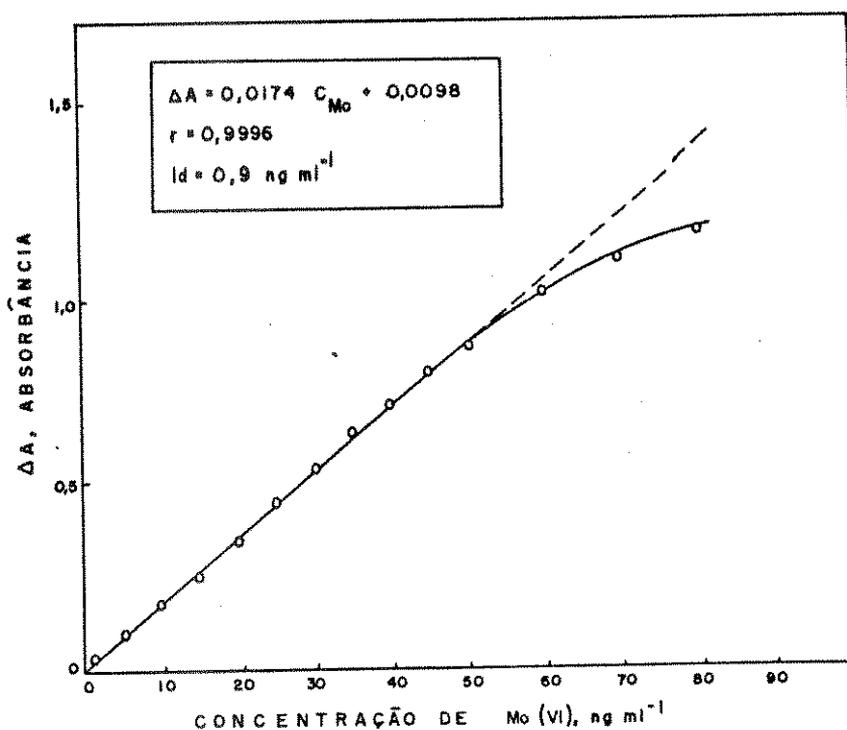


Figura IV.11 Curva de calibração.

Vazão dos reagentes	$1,2 \text{ ml min}^{-1}$
Vazão da amostra	$4,7 \text{ ml min}^{-1}$
Con. Analítica de H_2SO_4	0,0665 M
Con. Analítica de KI	0,1528 M
Con. Analítica de H_2O_2	0,0041 M
Vol. alça de amostragem	300 μl
Tempo de reação	130 s
Temperatura de reação	$(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

nível de 50 ng ml^{-1} . O limite de detecção de $0,9 \text{ ng ml}^{-1}$ foi calculado em relação ao sinal observado para o branco e considerando-se três

vezes o seu desvio padrão segundo as recomendações da IUPAC⁷⁵, o que corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%. A linha base no sistema MCFA é muito estável, apresentando um "drift"(*) menor que 0,1% sob diversas horas de trabalho contínuo.

Como discutido anteriormente no item IV.3, o comportamento do sistema frente ao volume da alça de amostragem e ao tempo de reação são semelhantes (Figuras IV.9 e IV.10). Um estudo conjunto destas variáveis através de um planejamento fatorial 2^2 (Tabela IV.11) foi efetuado para avaliar o comportamento das variáveis tempo de reação e volume de alça de amostragem. Encontram-se naquela Tabela os resultados dos experimentos do fatorial assim como as estimativas dos efeitos.

Observa-se que os valores mais altos destas variáveis favorecem o valor de ΔA . Nota-se ainda que o tempo de reação apresenta maior influência sobre a reação catalisada e sobre o ΔA que o volume da alça de amostragem, enquanto que esta última afeta mais o valor do branco.

Para as três respostas analisadas, o efeito de interação é bastante acentuado, principalmente com respeito à reação catalisada. Portanto, embora os efeitos sugeriram que regiões de maiores valores para as variáveis devam ser explorados para obter um aumento no valor do ΔA , este efeito sobre a reação catalisada nos indica que valores mais elevados para as variáveis nos levará a altos valores de

DRIFT - desvio da linha base sem alteração significativa da altura dos picos. Geralmente causado por instabilidade do detector.

Tabela IV.11 Planejamento fatorial 2^2 e os efeitos do tempo de reação e volume de alça de amostragem no valor de absorvância^(a).

variáveis	níveis	
	(-)	(+)
t_1 - Tempo de reação, s	40	130
t_2 - Alça de amostragem, μ l	100	300

exper.	variáveis		resposta		
	t_1	t_2	catalis.	branco	ΔA
02	-	-	0,248	0,076	0,172
03	+	-	0,476	0,133	0,343
01	-	+	0,417	0,155	0,318
04	+	+	1,081	0,333	0,748

Efeitos	resposta		
	catalis.	branco	ΔA
t_1	0,446	0,118	0,302
t_2	0,387	0,140	0,275
$t_1 \times t_2$	0,218	0,061	0,131
Desvio Padrão	$\pm 0,003$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$

(a) Concentração de MO(VI), 40 ng ml^{-1} . As demais condições estão listadas na Figura IV.11.

absorvância para a reação catalisada e, certamente, haverá problemas com o limite de escala de leitura do equipamento utilizado.

Como estas variáveis apresentam dificuldades de manuseio para estudos multivariado de otimização, optou-se por obtenção de curvas de calibração em cada uma das combinações dos níveis estudados no fatorial com intuito de avaliar o comportamento destas variáveis com respeito à sensibilidade e limite de detecção. Na Figura IV.12 estão apresentadas as curvas de calibração obtidas.

Como pode ser observado (Figura IV.12), o método AFCM apresenta versatilidade para a determinação de Mo(VI). Combinações

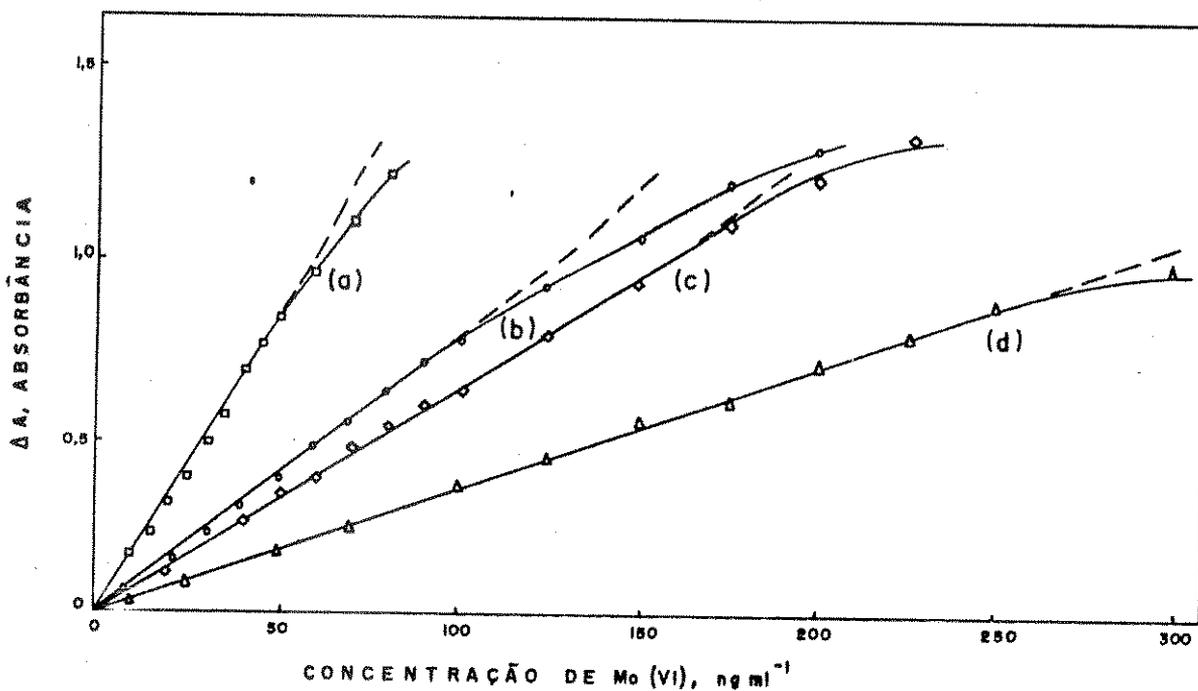


Figura IV.12 Efeito do tempo de reação x volume de amostragem.

equação da curva	r	línea.*	ld, ng ml ⁻¹
(a) $\Delta A = 0,0172 C_{Mo} - 0,0018$	0,9988	50	0,9
(b) $\Delta A = 0,0079 C_{Mo} - 0,0044$	0,9993	100	1,5
(c) $\Delta A = 0,0062 C_{Mo} + 0,0261$	0,9989	175	1,0
(d) $\Delta A = 0,0035 C_{Mo} + 0,0040$	0,9993	250	1,7

* linearidade.

Condições experimentais:

	Alça de amostragem, μ l	tempo de reação, s
(a)	300	130
(b)	100	130
(c)	300	40
(d)	100	40

simples do volume da alça de amostragem e tempo de reação permite a obtenção de diferentes faixas de linearidade sem grande prejuízo para o limite de detecção. As inevitáveis perdas de sensibilidade podem ser parcialmente recuperadas com combinações de valores intermediários aos aqui utilizados para o volume da alça de amostragem e tempo de reação.

Neste estudo, o melhor limite de detecção foi obtido com a condição de volume de alça de amostragem a 300 μl e o tempo de reação a 130 s, condição esta que também apresenta a maior sensibilidade apesar da linearidade ser apenas até 50 ng ml^{-1} contra os 250 ng ml^{-1} da condição de 100 μl e 40 s para volume da alça de amostragem e tempo de reação, respectivamente.

Portanto, nota-se que, apesar de suas limitações, outras condições podem ser utilizadas sem grandes prejuízos para o método. Todavia, o volume de amostragem de 300 μl e tempo de reação de 130 s, são os recomendados e foram utilizados nos próximos estudos.

Influência da Natureza do Ácido

Apesar do trabalho tomado como referência¹⁴ utilizar o ácido sulfúrico para esta reação, diversos trabalhos^{8-10,16,18} utilizam o ácido clorídrico para esta mesma reação. Portanto um estudo da natureza do ácido foi efetuado substituindo o ácido sulfúrico por ácido clorídrico e por ácido perclórico.

Para este estudo foi obtido curvas de calibração onde a concentração analítica dos ácidos clorídrico e perclórico foram tais que a concentração hidrogeniônica das soluções fossem a mesma da solução de ácido sulfúrico até então empregada.

Foi observado neste estudo que o menor valor de absorvância obtido para o branco foi com o uso do ácido clorídrico e que este foi 10% menor do que aquele registrado com uso do ácido sulfúrico. Este último foi o que apresentou maior valor de absorvância para o branco mas, por outro lado, o maior valor de desvio padrão para o branco foi observado quando do uso do ácido clorídrico. Entretanto, a sensibilidade do método não foi alterada devido a natureza do ácido, conforme mostrado na Tabela IV.12.

Tabela IV.12 Estudo da natureza do ácido.

ácido	equação	correl.	linea.*	ld, ng ml ⁻¹
H ₂ SO ₄	$\Delta A = 0,0175 C_{Mo} + 0,0079$	0,9992	50	1,0
HCl	$\Delta A = 0,0176 C_{Mo} + 0,0025$	0,9992	60	1,3
HClO ₄	$\Delta A = 0,0175 C_{Mo} + 0,0096$	0,9980	50	0,9

* linearidade

Concentração analítica:

$$C_{H_2SO_4} = 0,0665 \text{ M}$$

$$C_{HCl} = 0,0758 \text{ M}$$

$$C_{HClO_4} = 0,0758 \text{ M}$$

Como pode ser notado, a natureza dos ácidos estudados não apresentam efeito significativo na curva de calibração, de modo que ácido sulfúrico, clorídrico ou perclórico podem ser utilizados, indistintamente, no sistema que é proposto, desde que a concentração hidrogeniônica das soluções seja respeitada. Consequentemente, pode-se afirmar que os efeitos observados até agora com respeito ao ácido foram devidos à concentração hidrogeniônica, sem interferência do ânion. Assim, podemos concluir que os ânions SO₄²⁻, Cl⁻ e ClO₄⁻ não

interferem na reação nas concentrações aqui utilizadas.

Avaliação do Comportamento das Interferências

A oxidação do iodeto pelo peróxido de hidrogênio em meio ácido, além de ser catalisada por Molibdênio pode, também, ser catalisada por Ferro, Titânio, Tungstênio, Cromo, Vanádio, Zircônio, Háfnio, Tório e Tálcio^{19,18}, os quais são interferentes em potencial para o método que apresentamos. Além disso, como o teor de Fósforo nos tecidos vegetais é bastante elevado, este elemento também deve ser considerado como provável interferente já que o mesmo pode formar o ânion molibdofosfato⁷⁶. Entretanto, como Zircônio, Háfnio, Tório e Tálcio não são relacionados como nutrientes normalmente encontrados nos tecidos vegetais⁷⁷, estes elementos não foram testados como interferentes neste trabalho. Por outro lado, sabendo-se que o método de extração de molibdênio dos tecidos vegetais caracteriza-se por um tratamento ácido, onde o extrato resultante apresenta uma Força Iônica bastante elevada (estimada pela equação de Debye-Huckel em 0,35 M) e como a velocidade das reações catalíticas podem ser consideravelmente afetadas pela força iônica, este parâmetro foi observado com mais atenção.

Portanto, os efeitos de interferências que avaliamos foram os devidos ao Ferro(III), Titânio(IV), Tungstênio(VI), Cromo(VI), Vanádio(V), Fosfato e Força Iônica. Os sais empregados e concentrações foram escolhidos de forma a gerarem em solução a forma iônica e concentração mais encontrada nos tecidos vegetais^{27,79} (ver Tabela IV.13).

Uma primeira avaliação do comportamento das interferências

Tabela IV.13 Micronutrientes mais comumente encontrado nos tecidos vegetais.

elemento	forma iônica	conc. média*
Mo	MoO_4^{2-}	80 ppb
Fe	Fe^{3+}	40 ppm
Ti	Ti^{4+}	800 ppb**
W	WO_4^{2-}	800 ppb**
Cr	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	800 ppb**
V	VO_3^-	400 ppb**
P	HPO_4^{2-}	200 ppm
N	NO_3^-	2 ppm
K	K^+	1200 ppm
Ca	Ca^{2+}	1600 ppm
Mg	Mg^{2+}	400 ppm
S	SO_4^{2-}	200 ppm
B	BO_3^{3-}	8 ppm
Cu	Cu^{2+}	8 ppm
Mn	Mn^{2+}	40 ppm
Zn	Zn^{2+}	8 ppm
Al	Al^{3+}	40 ppm

* , valores estimados na matéria seca tomando-se como base os resultados de análise de rotina do Instituto Agronômico de Campinas³⁴.

** , valores citados por Pessenda et alli¹⁸.

foi efetuada através de um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , que exige um conjunto de 16 experimentos, tendo como variáveis as concentrações de Mo(VI) e dos íons interferentes e a força iônica do meio. A fração estudada no planejamento fatorial corresponde apenas a 1/16 avos do que seria o planejamento fatorial completo 2^8 , pois este último exigiria um conjunto de 256 experimentos sem replicatas, que não seriam possíveis de serem executados no mesmo dia.

No planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , os efeitos de interação não são puros, isto é, são resultados da adição de efeitos de interação dois a dois das espécies estudadas²⁰. Como os efeitos de interação eram acentuados e estas interações não foram possíveis de serem identificadas e nem os seus efeitos puderam ser estimados com apenas esta fração do fatorial, pode-se apenas concluir que Tl(IV) não interfere no sinal analítico até concentrações normalmente encontradas nos tecidos vegetais (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Devido o exposto acima, o comportamento das interferências foi então avaliado com procedimento univariado e soluções de Mo(VI) contendo diferentes concentrações do íon interferente em estudo. Os valores de concentração dos interferentes normalmente encontrados nos tecidos vegetais foram estabelecidos como limite máximo de concentração para este estudo e para avaliar o efeito da força iônica, diferentes quantidades de solução de perclorato de sódio foram adicionados às soluções de Mo(VI). Os experimentos foram conduzidos sob as condições experimentais citadas na Figura IV.11.

Os graus de interferência discutidos a seguir foram determinados por um número denominado Fator de Interferência⁷⁸, que é definido como a razão entre o valor de ΔA (em absorbância) da reação

catalisada por molibdênio na presença do interferente e o valor de ΔA (em absorbância) da mesma reação catalisada por molibdênio mas na ausência do interferente. Todos os valores de ΔA utilizados para os cálculos do Fator de Interferência foram obtidos contra um branco. Um Fator de Interferência igual a 1,00 indica que não há interferência, enquanto que os fatores maiores e menores que 1,00 significam interferência positiva ou negativa, respectivamente.

Nas tabelas IV.14 a IV.20, encontram-se os Fatores de Interferência para Ti(IV), Cr(VI), W(VI), Fe(III), V(V), PO_4^{3-} e Força Iônica em relação a concentração de Mo(VI) de 5, 20 e 40 ng ml^{-1} . Dos valores obtidos conclui-se que somente o íon Ti^{4+} não interfere no sistema (Tabela IV.14) até concentrações normalmente encontradas nos tecidos vegetais.

Tabela IV.14 Interferência do Ti(IV) na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

$C_{\text{Ti(IV)}}$ ng ml^{-1}	Fator de Interferência		
	$C_{\text{Mo(VI)}}$, ng ml^{-1}		
	5	20	40
100	1,01	0,99	0,99
200	1,02	1,00	0,99
400	1,05	1,00	1,00
600	1,05	1,01	1,01
800	1,05	1,01	1,01

Os íons $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ e WO_4^{2-} (Tabelas IV.15 e IV.16) apresentam comportamento semelhante, isto é, a interferência desses íons é bastante acentuada para o nível de 5 ng ml^{-1} de Mo(VI), enquanto que para o nível de 20 ng ml^{-1} de Mo(VI) ou superior, o sistema suporta

uma concentração de 200 ng ml^{-1} dos íons interferentes. Nota-se ainda que, para concentrações de Mo(VI) a 40 ng ml^{-1} , não é observado interferência do íon WO_4^{2-} até concentrações normalmente encontradas nos tecidos vegetais.

Tabela.15 Interferência do Cr(VI) na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

$C_{\text{Cr(VI)}}$ ng ml^{-1}	Fator de Interferência		
	$C_{\text{Mo(VI)}}, \text{ng ml}^{-1}$		
	5	20	40
50	1,17	1,04	1,00
100	1,27	1,05	1,02
200	1,54	1,09	1,04
400	1,93	1,24	1,16
600	2,47	1,36	1,23
800	3,11	1,54	1,23

Tabela IV.16 Interferência do W(VI) na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

$C_{\text{W(VI)}}$ ng ml^{-1}	Fator de Interferência		
	$C_{\text{Mo(VI)}}, \text{ng ml}^{-1}$		
	5	20	40
100	1,28	1,05	1,01
200	1,59	1,10	1,03
400	1,99	1,13	1,05
600	2,49	1,18	1,06
800	2,80	1,25	1,10

Os íons Fe^{3+} são os que apresentam maior efeito de interferência (Tabela IV.17), principalmente para concentrações

menores de Mo(VI). Para concentração de Mo(VI) iguais ou maiores que 20 ng ml^{-1} pode-se afirmar que o sistema suporta uma concentração de 500 ng ml^{-1} de Fe^{3+} , sem alteração significativa do sinal analítico. Para concentração de 40 ng ml^{-1} de Mo(VI), uma concentração de 1000 ng ml^{-1} Fe^{3+} provoca um aumento de apenas 6% no sinal analítico. Entretanto, as concentrações de Fe^{3+} toleradas no sistema MCFA, e citadas anteriormente, são muito inferiores àquelas normalmente encontradas nos tecidos vegetais.

Tabela IV.17 Interferência do Fe(III) na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

$C_{\text{Fe(III)}}$ $\mu\text{g ml}^{-1}$	Fator de Interferência		
	$C_{\text{Mo(VI)}}$, ng ml^{-1}		
	5	20	40
0,1	1,11	1,02	1,00
0,5	1,30	1,02	1,00
1,0	1,67	1,16	1,06
5,0	3,96	1,61	1,26
10,0	6,11	2,23	1,51
20,0	11,08	3,31	1,82
30,0	15,09	4,04	2,12
40,0	16,67	4,40	2,28

Como pode ser observado na Tabela IV.18, uma concentração de aproximadamente 100 ng ml^{-1} de VO_3^- não provoca variações significativas no sinal analítico.

Tabela IV.18 Interferência do V(V) na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

$C_{V(V)}$ ng ml ⁻¹	Fator de Interferência		
	$C_{Mo(VI)}$, ng ml ⁻¹		
	5	20	40
25	1,00	1,00	1,01
50	1,03	1,03	1,03
100	1,10	1,06	1,05
200	1,47	1,17	1,13
300	1,82	1,29	1,18
400	1,88	1,32	1,22

O íon PO_4^{3-} afeta o sinal analítico, diminuindo-o (Tabela IV.19). Entretanto, até concentração de 5 ng ml⁻¹ de PO_4^{3-} este não afeta o sistema. Concentrações de Mo(VI) de 20 e 40 ng ml⁻¹ suportam concentrações de 50 e 150 µg ml⁻¹ de PO_4^{3-} , respectivamente, sem que o sinal analítico se altere de forma considerável.

Tabela IV.19 Interferência de PO_4^{3-} na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

$C_{PO_4^{3-}}$ µg ml ⁻¹	Fator de Interferência		
	$C_{Mo(VI)}$, ng ml ⁻¹		
	5	20	40
5	1,00	0,99	0,99
10	0,92	0,97	0,98
50	0,89	0,93	0,96
100	0,81	0,88	0,93
150	0,76	0,86	0,90
200	0,68	0,83	0,89

Em relação à Força Iônica do meio, o sistema suporta apenas

concentrações iônicas na ordem de 0,04 M (Tabela IV.20), sendo que concentrações iônicas superiores a esta afetam de maneira profunda o sinal analítico. A concentração iônica que o sistema aceita sem interferência significativa no sinal analítico está, também, muito abaixo daquela esperada nos extratos vegetais, 0,35 M.

Tabela IV.20 Interferência da força iônica na determinação de Mo(VI), usando o sistema MCFA.

Força Iônica*	Fator de Interferência		
	C _{Mo(VI)} , ng ml ⁻¹		
M	5	20	40
0,04	1,09	1,06	1,02
0,08	1,66	1,19	1,04
0,10	1,77	1,26	1,14
0,20	2,12	1,35	1,22
0,30	2,43	1,41	1,25
0,40	2,53	1,45	1,26
0,50	2,64	1,49	1,28

* Ajustada com solução de NaClO₄

IV.4. APLICAÇÃO : DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE MOLIBDÊNIO EM PLANTAS

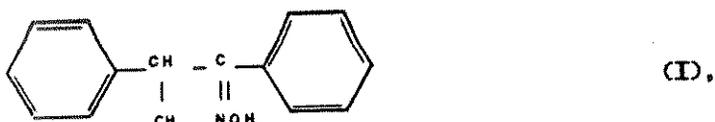
Como a determinação de molibdênio usando o sistema MCFA está sujeita a um número elevado de interferências, optou-se por uma separação prévia do molibdênio antes da determinação no sistema MCFA.

Escolhemos a separação de molibdênio por extração com α -benzoinoxima e clorofórmio como extrator pois esta já foi aplicada há algum tempo⁷⁹⁻⁸¹ e pode atender de maneira eficiente os propósitos

deste trabalho. A utilização de resina de troca iônica em linha ou mascarantes foram descartadas pois poderiam invalidar os estudos de otimização já efetuados.

Extração com α -Benzoinoxima

O composto α -Benzoinoxima, também conhecido como "cupron" (D),



é um sólido branco que se exposto a luz torna-se levemente escuro. É praticamente insolúvel em água mas dissolve-se, sem grandes dificuldades, em soluções alcalinas, álcool etílico e outros solventes orgânicos^{82,83}. Particularmente em clorofórmio, sua dissolução exige agitação vigorosa.

A extração de molibdênio com α -benzoinoxima exige um meio bastante ácido^{84,85} e o complexo extraído apresenta uma razão molar de 1:2^{84,86}, $\text{MoO}_2(\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2)_2$. Em concentração de ácido clorídrico de 0,01 a 2 M a extração é seletiva, muito útil para a separação de molibdênio^{85,87} em matrizes complexas tais como digeridos vegetais¹⁶.

Método para Determinação de Molibdênio

Um procedimento para a determinação espectrofotométrica de molibdênio em plantas foi elaborado baseado na preparação do extrato vegetal empregado no Instituto Agronômico de Campinas (IAC)³⁴ e separação de molibdênio com α -benzoinoxima/clorofórmio proposta por Bradfield e Stickland¹⁶ e Marczenko⁸⁵. A seguir é apresentado o

roteiro resultante na forma de diagramas de blocos (Figuras de IV.13 a IV.16) e a configuração e as condições recomendadas para o sistema MCFA que foi empregado na determinação de molibdênio em tecidos vegetais.

A concentração de α -benzoinoxima em etanol foi adotada após uma avaliação do comportamento da curva de calibração obtida com padrões de extração em relação à concentração do quelante. Extrações com concentrações de α -benzoinoxima a 0,1%, 0,3% e 0,5% foram efetuadas e esta última apresentou uma curva de calibração muito semelhante à obtida com padrões aquosos e portanto a concentração de 0,5% foi adotada para o método.

Após a extração e separação das fases, a fase orgânica sofreu um tratamento que consiste em evaporar o clorofórmio, adicionar 5 ml de HNO_3 concentrado e 1 ml de HClO_4 concentrado para destruição do complexo e de resíduos de compostos orgânicos⁸⁸.

Como o molibdênio resultante no processo de extração se encontra num meio ácido, foi necessário um acerto de pH dos padrões de extração para se aproximar das condições dos padrões utilizados nos estudos de otimização deste trabalho. Um ajuste aproximado de pH com o uso de solução de fenolftaleína se mostrou eficiente além de não dificultar a aplicação do método em trabalhos de rotina.

Salientamos ainda que, conforme citado no item IV.3, estudos com extração de padrões foram efetuados a uma temperatura de $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, mantida com aparelhos de ar condicionado, e não foi observado alteração significativa na curva de calibração comparada com aquela obtida quando a temperatura era mantida com o banho termostático a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.

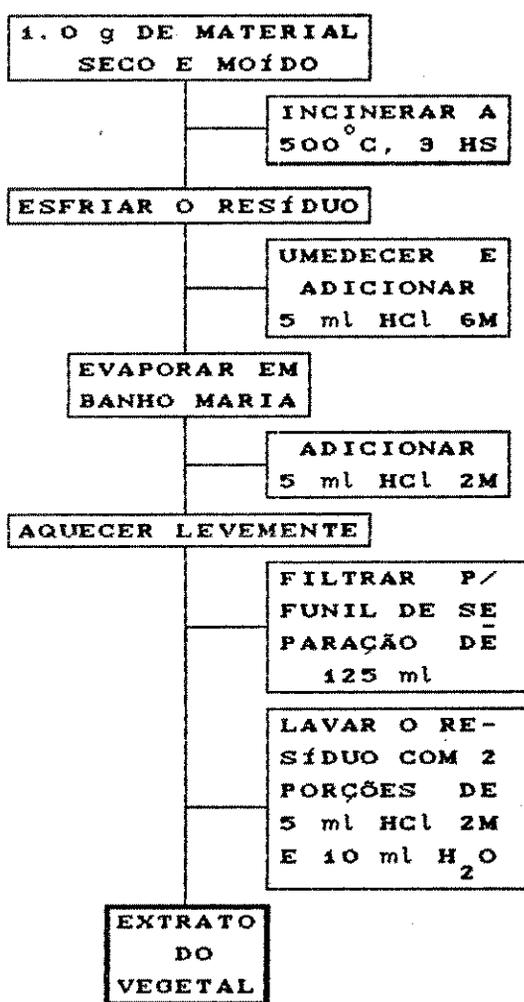


Figura IV.13 Diagrama de blocos: Preparação do Extrato de Tecido Vegetal.

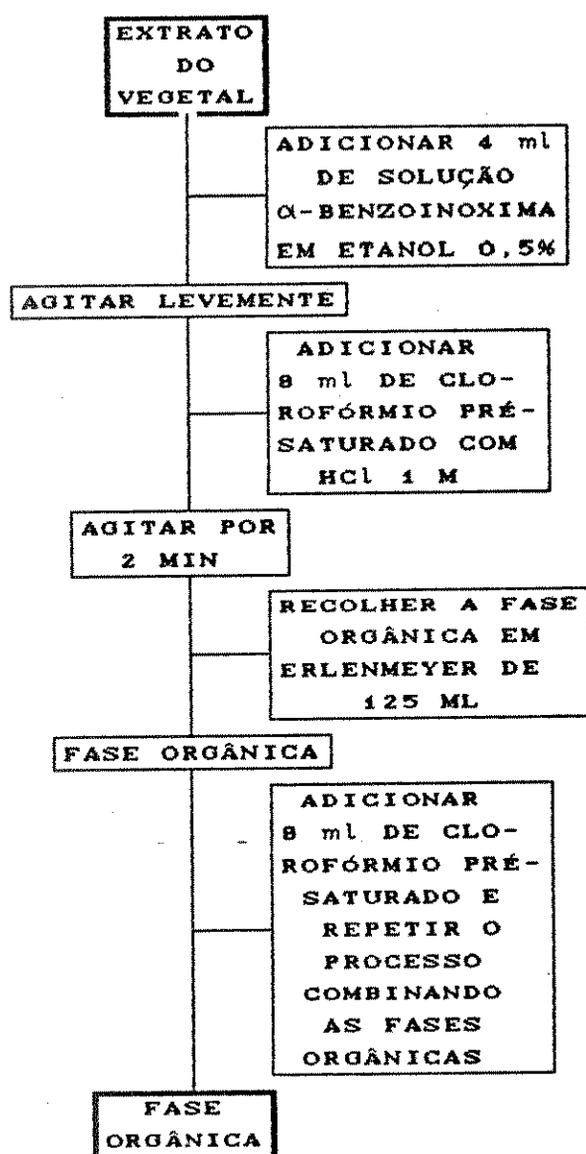


Figura IV.14 Diagrama de blocos: Extração de Molibdênio com α -Benzoinoxima/Clorofórmio.

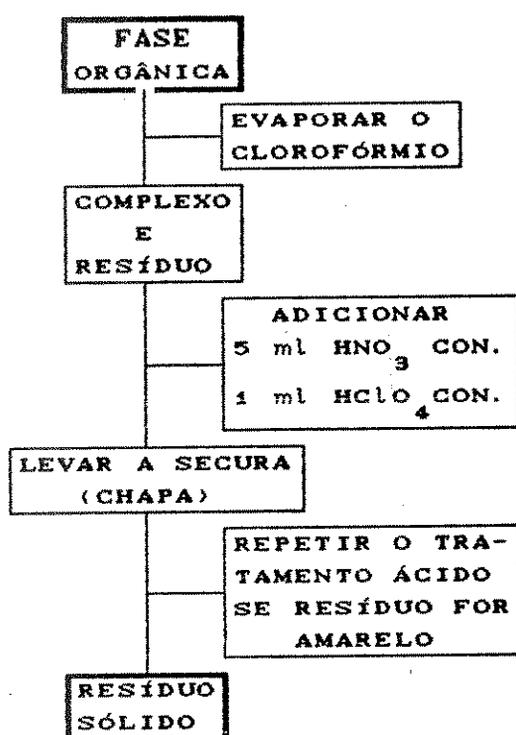


Figura IV.15 Diagrama de blocos: Tratamento da Fase Orgânica.

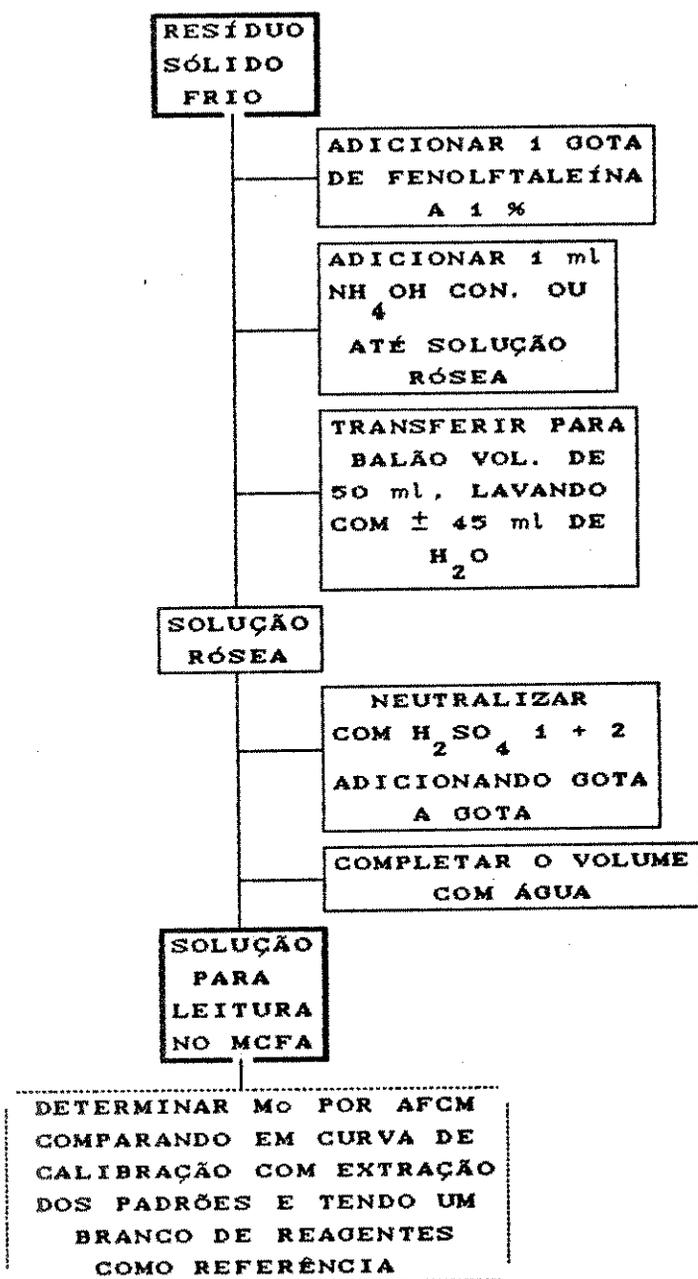


Figura IV.16 Diagrama de blocos: Ajuste de pH e Determinação de Molibdênio.

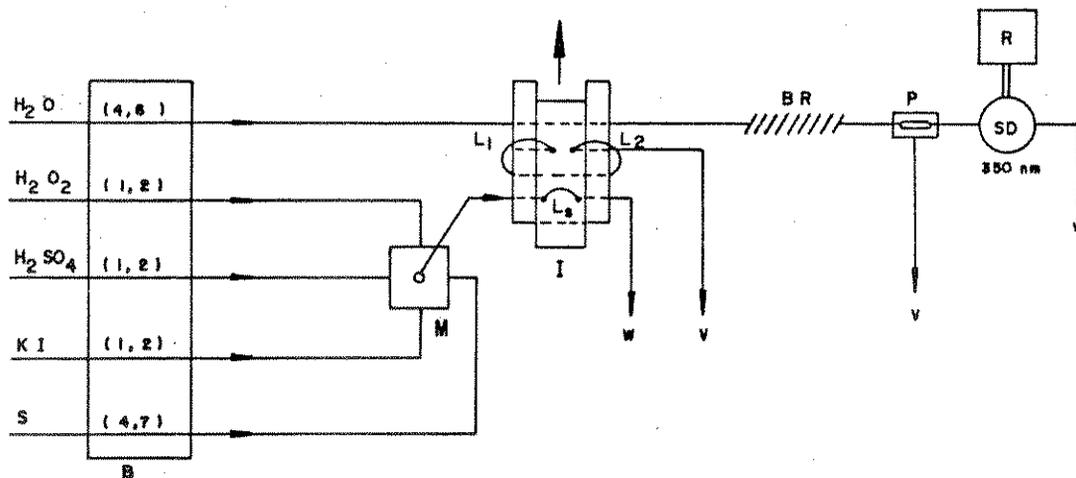


Figura IV.17 Configuração MFA para determinação de molibdênio em tecidos vegetais.

Volume da câmara = 220 μl ; volume da alça de amostragem = 300 μl ; tempo de reação = 130 s; temperatura = $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; cela de fluxo = 80 μl ; $\lambda = 350$ nm; concentrações dos reagentes em torno de: KI = 0,1528 M, $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,0665$ M e $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,0041$ M. Os números entre parenteses são as vazões recomendadas, em ml min^{-1} .

Precisão do Método

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo, calculado a partir de dez determinações em replicatas para os pontos de uma curva de calibração com padrões submetidos à extração com α -benzoínoxima (Figura IV.18).

O desvio padrão relativo variou de 0,8% a 1,3% para os

níveis de 50 ng ml^{-1} e 1 ng ml^{-1} , respectivamente. O limite de detecção obtido nesta condição foi de $1,0 \text{ ng ml}^{-1}$ e foi calculado em relação ao sinal do branco de reagentes submetidos às mesmas condições de extração dos padrões.

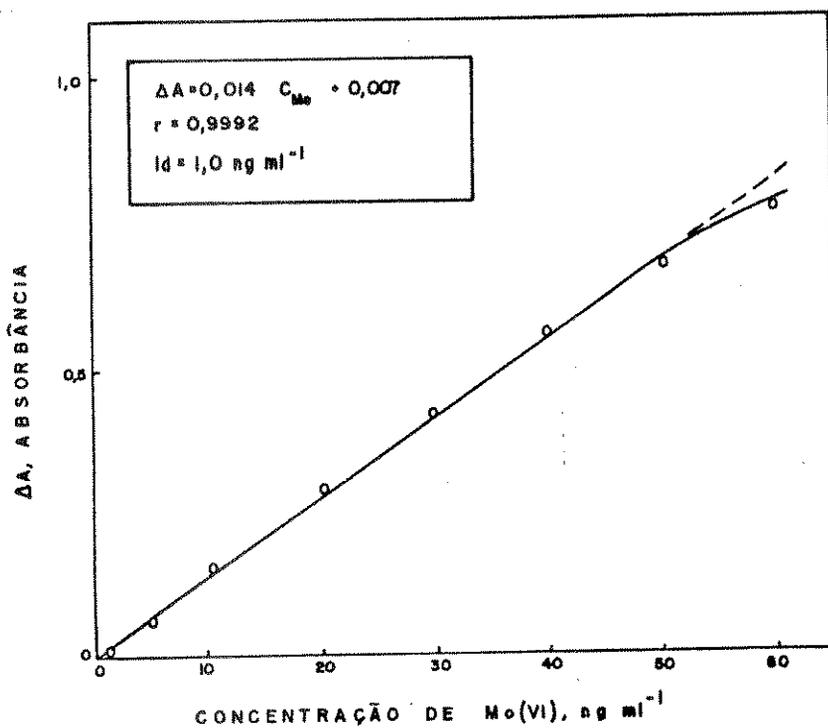


Figura IV.18 Curva de calibração com padrões de extração.

Cond. Experimentais: Figura IV.11.

Exatidão do Método

Devido a falta de padrões certificados, a exatidão do método para determinação de molibdênio foi avaliada através de amostras de plantas fornecidas pelo "International Plant-analytical Exchange" (IPE)⁸⁹ da Universidade de Wageningen (Holanda). Mais de 200 laboratórios participam deste programa de calibração, os quais

níveis de 50 ng ml^{-1} e 1 ng ml^{-1} , respectivamente. O limite de detecção obtido nesta condição foi de $1,0 \text{ ng ml}^{-1}$ e foi calculado em relação ao sinal do branco de reagentes submetidos às mesmas condições de extração dos padrões.

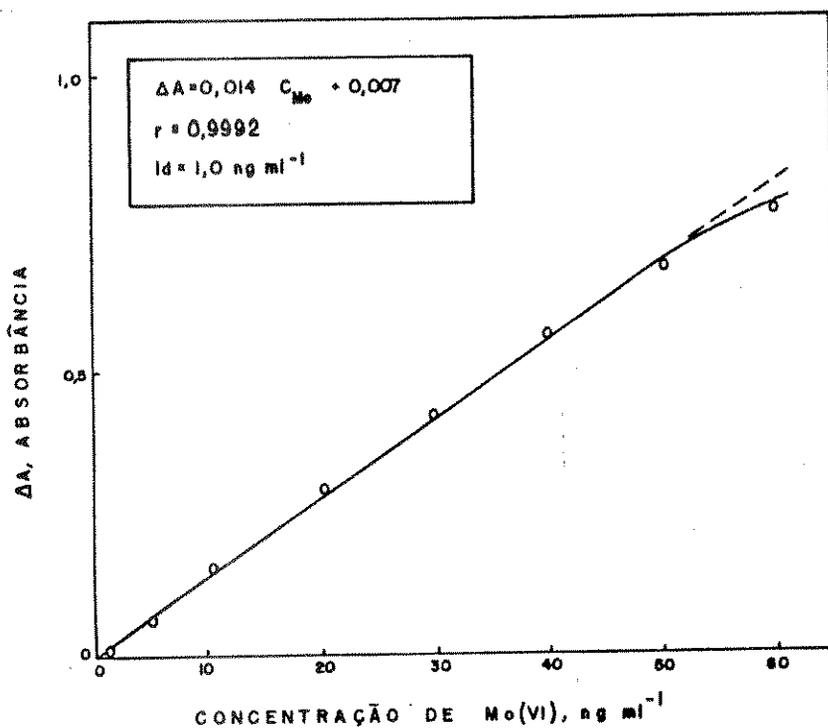


Figura IV.18 Curva de calibração com padrões de extração.

Cond. Experimentais: Figura IV.11.

Exatidão do Método

Devido a falta de padrões certificados, a exatidão do método para determinação de molibdênio foi avaliada através de amostras de plantas fornecidas pelo "International Plant-analytical Exchange" (IPE)⁸⁹ da Universidade de Wageningen (Holanda). Mais de 200 laboratórios participam deste programa de calibração, os quais

recebem as amostras de material vegetal e determinam os diversos elementos desta matriz, de acordo com os seus próprios procedimentos de rotina. Apenas 10 laboratórios apresentaram resultados da determinação de molibdênio para as amostras fornecidas pelo IPE. Os materiais nos quais molibdênio foi determinado são:

<u>Amostra</u>	<u>Código</u>	<u>Material</u>
1	883	Carnation (Straw)
2	957	Japweed
3	958	Bladder Wrack
4	963	Hibiscus
5	883	Carnation (Straw)
6	959	Sea Aster

Neste trabalho, cada amostra de planta analisada foi dividida em duas porções e tratadas independentemente. Como as amostras recebidas para testes já estavam secas e moídas, então, seguindo as recomendações do IPE⁸⁹, o material vegetal foi levado a estufa a 105°C por 3 horas e esfriado em dessecador antes de pesar a massa desejada.

As soluções resultantes foram injetadas no sistema MCFA em quintuplicatas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela IV.21 e descritos pela média dos resultados obtidos e a variação das medidas, juntamente com um resumo dos resultados apresentados no relatório do IPE⁸⁹.

Os critérios para rejeição de resultados, empregado pelo IPE, utilizam a mediana dos valores encontrados e um desvio,

calculado a partir da mediana dos desvios absolutos, em lugar da média e do desvio padrão geralmente empregados em tratamentos estatísticos convencionais⁹⁰, pois os dados reunidos envolvem resultados de diferentes procedências e diversos procedimentos analíticos. O critério de rejeição é dado por:

$$\frac{|(X - \mu)|}{\sigma \cdot f} > 2 \quad (6)$$

onde X = resultado em teste,

μ = mediana dos resultados,

σ = mediana dos desvios absolutos,

f = fator de correção dado por:

$$f = \left[0,7722 + \frac{1,604}{n} \right] \times t \quad (7)$$

onde n = número de resultados,

t = valor de "Student", com 95% de probabilidade,

para $n-1$ graus de liberdade.

Num primeiro momento, os resultados de um conjunto de medidas são submetidos ao teste de rejeição (equação 6) e aqueles que excederem ao valor 2 recebem dois asterísticos. Num segundo momento, os resultados isentos de asterísticos são novamente submetidos ao teste de rejeição recebendo um asterístico os que excederem a 2. Finalmente, os resultados que não receberam asterísticos constituem o conjunto de resultados aceitos os quais definem o intervalo de aceitação e a mediana.

Analisando os resultados obtidos pelo método MCFA proposto

(Tabela IV.21), observa-se que a maior variação absoluta apresentada em um conjunto de duplicatas é de 32 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de molibdênio na matéria seca, referente à amostra 1-883, mas esta variação corresponde apenas a 1,5% de variação entre os resultados individuais. O maior percentual de variação entre um conjunto de duplicatas foi de 2,2%, observado para a amostra 3-958. Portanto, apesar da quantidade de amostras recebidas não permitirem um maior número de replicatas, os resultados apresentados foram considerados confiáveis.

Tabela IV.21 Determinação de molibdênio em extratos de Plantas.

amostra código	Método MCFA $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ^(a)		resultados do IPE $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ^(a)		
	média	var. ^(b)	mediana	intervalo	intervalo
				aceito ^(c)	observado ^(d)
1-883	2074	32	2199	2040-2500	1738-3060
2-957	608	5	519	279- 637	110-1663
3-958	621	14	617	381- 750	381-1332
4-963	717	15	560	271- 872	271-1276
5-883	2035	9	2175	1985-2660	1635-2900
6-959	1022	18	985	601-1184	601-1184

(a) concentração na matéria seca.

(b) diferença entre as duas medidas.

(c) intervalo dos valores aceitos pelo IPE.

(d) intervalo dos valores descritos no relatório do IPE.

Por comparação direta, verifica-se que todos os resultados obtidos pelo MCFA se encontram no intervalo aceito de acordo com o procedimento de rejeição empregado pelo IPE. É claro que este procedimento não é o mais recomendado, estatisticamente, para avaliar

a exatidão do método proposto. No entanto, isto não invalida o uso da comparação direta para determinar a confiabilidade dos resultados obtidos.

PRETENSÕES FUTURAS

Devido a importância do molibdênio na agricultura, pretendemos dar continuidade a este trabalho, buscando viabilizar também a aplicação da técnica MCFA em análise de solo. Dada a complexidade desta matriz e da cinética da reação envolvida, torna-se necessário otimizar o processo de separação do molibdênio do solo.

Neste sentido pensamos em aplicar a técnica de extração líquido-líquido por fase única, que já demonstrou a sua potencialidade como técnica de separação.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

PROCEDIMENTOS MULTIVARIADO DE OTIMIZAÇÃO

1. MÉTODO SIMPLEX

É um método classificado como método sequencial de otimização, introduzido na sua forma original por Spendley, Hext e Himsworth⁶⁹ em 1962, e é chamado hoje de Método Simplex Básico (MSB).

Um simplex é definido como sendo uma figura geométrica em n dimensões, constituído de $n+1$ pontos. Cada dimensão corresponde a uma variável a ser otimizada⁶⁹. Um simplex em duas dimensões é um triângulo, em três é um tetraedro. O método pode ser estendido para maiores dimensões, mas não será fácil a visualização dos simplexes. Apesar disto, o método simplex pode ser aplicado, teoricamente, para qualquer número de variáveis. O desenvolvimento do método simplex é efetuado por aplicação de regras de movimentação⁷⁰ que descarta o resultado menos desejado e se desloca na direção do melhor resultado. O desenvolvimento do método também pode ser acompanhado com auxílio de programa computacional^{72,73}, que facilita o trabalho quando o número de variáveis é elevado.

Em 1965, Nelder e Mead⁷¹, propuseram modificações no procedimento original de movimentação do simplex, que permitiu obter um ponto ótimo estacionário com suficiente precisão e clareza, além de permitir um desenvolvimento mais rápido do simplex em direção ao ótimo, originando o denominado Método Simplex Modificado (MSM).

As regras de movimentação do MSM⁷⁰, podem ser melhor

entendidas com o auxílio da Figura A1.1.

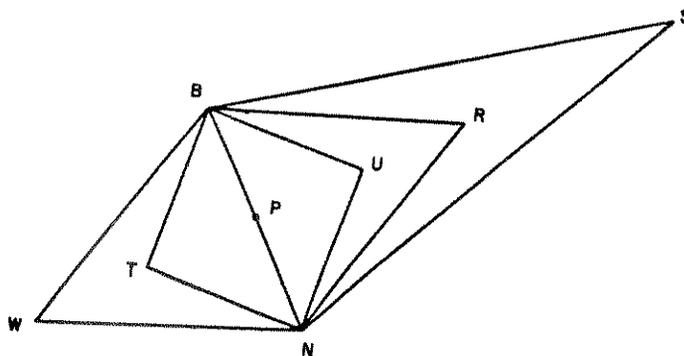


Figura A1.1 Movimentos do método simplex modificado.

Regras de Movimentação do MSM

Regra 1: Após iniciar o processo, o simplex é movimentado depois de cada observação das respostas classificando-as em melhor (B), menos desejada (W) e resultados intermediários (N) (implica que visualiza a possibilidade de haver mais que dois fatores na otimização), conforme o objetivo da otimização.

Regra 2 : O simplex é movimentado para um simplex adjacente que é determinado ignorando a resposta menos desejável e substituindo o vértice correspondente por um novo vértice. Se os vértices de um simplex k -dimensional são representados por coordenadas vetoriais $P_1, P_2, \dots, P_k, P_{k+1}$, a eliminação da resposta indesejável P_j resulta na hiperface formada por $P_1, P_2, \dots, P_{j-1}, P_{j+1}, \dots, P_k, P_{k+1}$ com o centróide definido por :

$$P_c = 1/k (P_1 + P_2 + \dots + P_{j-1} + P_{j+1} + \dots + P_k + P_{k+1})$$

O novo simplex é definido por esta face e um novo vértice P.

$$P = P_c + \beta (P_c - P_j)$$

O coeficiente β define o movimento do simplex e de acordo com a Figura A4.1, o novo vértice seria:

$$P = \left[\frac{B + N}{2} \right] + \beta \left[\left[\frac{B + N}{2} \right] - W \right]$$

para definir o novo valor de cada fator no processo de otimização.

Regra 3 : O primeiro movimento no processo é sempre com o valor do coeficiente $\beta = 1$, o qual resulta no vértice R, chamado de REFLEXÃO. A observação da resposta no vértice R pode resultar em quatro possibilidades:

1- Se R for melhor do que B indica que o simplex está caminhando na direção correta, devendo-se efetuar um experimento em S, que é um movimento do simplex inicial com EXPANSÃO, isto é, $\beta = 2$. Se a resposta em S for melhor que as anteriores, o novo simplex será NBS.

2- Se a resposta em R for pior do que em W, significa que o simplex está com tamanho inadequado e uma CONTRAÇÃO COM MUDANÇA DE DIREÇÃO do simplex, T, se faz necessária. Faz-se uma observação no ponto T, isto é $\beta = -1/2$. Se T for melhor do que W, o novo simplex será TNB.

3- Se R for pior do que N, mas melhor do que W, significa que o tamanho do simplex está demasiadamente grande, mas na direção correta. Faz-se uma observação em U, isto é, $\beta = 1/2$. Se U for intermediário a B e N, o novo simplex será BNU ou seja, fez-se uma CONTRAÇÃO.

4-Se R for intermediário a B e N, estas operações não são recomendáveis e o novo simplex será BNR, aplicando-se novamente a Regra 3.

Regra 4 : Quando os recursos dos itens 1,2 e 3 da Regra 3 se mostrarem falhos, uma redução do simplex é recomendada^{69,70}, também chamada de CONTRAÇÃO MACIÇA. Isto é, conserva-se o vértice B do simplex e faz novas observações para determinar os outros vértices, N' e W' (Figura A1.2) e o novo simplex será BN'W'.

$$N' = \frac{B + N}{2} \quad \text{e} \quad W' = \frac{B + W}{2}$$

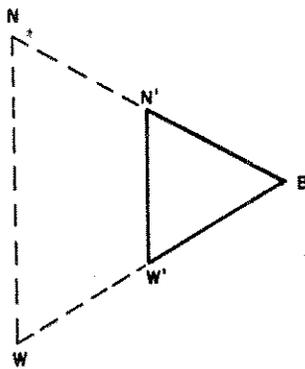


Figura A1.2 Contração maciça de um simplex.

A idéia, embora efetiva, sofre duas desvantagens distintas. Primeira, ela requer a avaliação de k vértices do simplex reduzido para que o processo possa continuar. Segunda, o tamanho do simplex cada vez que ocorre uma contração maciça é reduzido, isto pode resultar na convergência prematura na presença de erro experimental.

Regra 5 : Se um vértice for retido em $k + 1$ simplex, antes de se aplicar a Regra 3, efetuar uma nova observação do vértice persistente. Se o vértice em teste for realmente próximo do ótimo, é provável que a avaliação repetida da resposta seja consistentemente alta e o vértice em teste será mantido. Se a resposta no vértice em teste for alta por causa de erro de observação, é improvável que com a nova avaliação isso aconteça e portanto, o vértice em teste será eventualmente eliminado.

Regra 6 : Se o novo vértice localizar-se fora dos limites das variáveis, não fazer observações experimentais nestes valores, mas ao invés disso atribuir para ele a resposta mais indesejável.

O método simplex não requer o uso de testes estatísticos de significância por duas razões : a) se as diferenças nas respostas forem grandes quando comparadas com o erro experimental, o simplex deve mover-se na direção correta, b) se as diferenças forem pequenas o bastante para serem afetadas pelo erro experimental, o simplex poderia mover na direção errada. Mas, um movimento na direção errada acarretaria numa resposta indesejável, que rapidamente faria com que houvesse uma correção na direção tomada através da Regra 3, e o simplex, embora momentaneamente fora do curso, seguiria novamente em direção ao ótimo.

Movimento de um Simplex

Exemplo: Hipotético, maximizar resposta.

vértice	variável, X	variável, Y	resposta	
5	0,397	0,203	0,0072	(W)
6	0,343	0,342	0,0332	(B)
7	0,364	0,207	0,0099	(D)

$$\text{EXPANSÃO} \quad \text{--->} \quad S = P + 2 (P - W)$$

$$P = \left[\frac{0,343 + 0,364}{2} ; \frac{0,342 + 0,207}{2} \right] = (0,354 ; 0,275)$$

$$P - W = [0,354 - 0,397 ; 0,275 - 0,203] = (-0,043 ; 0,072)$$

$$S = (0,354 ; 0,275) + 2 (-0,043 ; 0,072)$$

$$S = (0,268 ; 0,419)$$

Os valores 0,268 e 0,419 correspondem aos valores experimentais das variáveis X e Y, respectivamente, que devem ser utilizados para a efetivação do movimento Expansão para o simplex constituído pelos vértices 5,6 e 7.

2- MÉTODO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial, como técnica de otimização, é classificado como método do tipo simultâneo e geralmente é utilizado para seleccionar as variáveis que realmente apresentam influências significativas na resposta⁶⁷. Também nos permite saber se uma variável apresenta um efeito positivo ou negativo na resposta quando a mesma passa de um nível (valor) para outro, e se as variáveis são

independentes ou apresentam interações. Além disso, o planejamento fatorial pode ser usado não só para localizar o ótimo como também pode obter a superfície de resposta para o sistema estudado.

O método do planejamento fatorial é mais eficaz quando utilizado para detectar diferenças causadas por dois ou mais fatores discretos. No entanto, se o fator for contínuo, os resultados são altamente dependentes da escolha dos níveis testados. O método pode explorar uma pequena região compressivamente de maneira a dar, no máximo, uma indicação da direção a mover para efetuar uma nova série de experimentos, ou explorar uma grande região superficialmente, de maneira que um ótimo, se encontrado necessitará de experimentos posteriores para melhor caracteriza-lo. Pode também explorar regiões que estejam muito afastadas de um ótimo de maneira a fornecer resultados de pouco interesse.

Para realizar um planejamento fatorial⁶⁷, escolhe-se um número de níveis (valores) para cada uma das variáveis (fatores) e efetua-se experimentos em todas as combinações possíveis deste níveis selecionados.

O planejamento fatorial pode ser representado de uma maneira geral por b^a , onde a é o número de variáveis estudadas e b é o número de níveis escolhidos. Pode-se ter, também, fatoriais com valores de b diferentes para cada variável (fatorial $2^1 \times 3^1 \times 5^1$, isto é, 2, 3 e 5 são níveis para as variáveis A, B e C, respectivamente).

Os fatoriais do tipo 2^a são os mais comuns. Estes planos, onde para cada variável são escolhidos apenas dois níveis, são importantes por que requerem relativamente poucos experimentos e embora sejam incapazes de explorar completamente uma grande região no

espaço das variáveis, podem indicar tendências para posteriores realizações de experimentos.

O planejamento fatorial apresentado por Box et alii⁶⁷ pode ilustrar a técnica e apresentamos a seguir o resumo deste estudo. A Tabela A1.1 mostra um planejamento fatorial 2^3 onde duas variáveis são quantitativas -temperatura e concentração- e uma variável e qualitativa -espécie de catalisador. A resposta é o rendimento de uma planta piloto.

Tabela A1.1 Planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis			Nível baixo	Nível alto
Temperatura(T), °C			160(-)	180(+)
Concentração(C), %			20(-)	40(+)
Catalisador(K)			A(-)	B(+)

Interações							Replicatas		
T	C	K	TxC	TxK	CxK	TxCxK	Primeira	Segunda	Média
-	-	-	+	+	+	-	59	61	60
+	-	-	-	-	+	+	74	70	72
-	+	-	-	+	-	+	50	58	54
+	+	-	+	-	-	-	69	67	68
-	-	+	+	-	-	+	50	54	52
+	-	+	-	+	-	+	81	85	83
-	+	+	-	-	+	-	46	44	45
+	+	+	+	+	+	+	79	81	80

Os efeitos, definidos como mudança ocorrida na resposta quando se move do nível baixo para o nível alto são classificados em duas categorias: efeito principal (isto é, efeito causado por cada

uma das variáveis) e efeitos de interação (isto é, efeito causado pela interação entre as variáveis - podem ser de segunda, terceira ou enéssima ordem conforme o número de fatores considerados).

Então, a média dos efeitos mede o efeito médio da variável sobre todas as condições de outras variáveis.

Efeito Principal = $Y^+ - Y^-$, onde

Y = média dos efeitos individuais da medida

(+) = nível alto e (-) = nível baixo

Efeito da temperatura, T:

Temperatura	Concentração	Catalisador
Y = 72 - 60 = 12	20	A
Y = 68 - 54 = 14	40	A
Y = 83 - 52 = 31	20	B
Y = 80 - 45 = <u>35</u>	40	B
		<u>92</u>

Efeito Principal da temperatura = $\frac{92}{4} = 23,0$

Efeito da interação Temperatura x Concentração, TxC:

Uma medida de interação é fornecida pela diferença entre a média do efeito da temperatura em relação ao nível alto (+) da concentração e a média do efeito da temperatura com o nível baixo (-) da concentração:

Concentração	Média do efeito temperatura
(+) 40	$\frac{(68 - 54) + (80 - 45)}{2} = 24,5$
(-) 20	$\frac{(72 - 60) + (83 - 52)}{2} = 21,5$

Diferença $\longrightarrow 24,5 - 21,5 = 3,0$

$$\text{Efeito de interação TxC} = \frac{\text{Diferença}}{2} = \frac{3,0}{2} = 1,5$$

Efeito Trifatorial, TxCxK :

A interação trifatorial pode ser definida como sendo a metade da diferença entre as interações da TxK para os dois níveis de concentração, C.

Interação TxK com nível de C alto (+):

$$\frac{(Y^8 - Y^7) - (Y^4 - Y^3)}{2} = \frac{(80 - 45) - (68 - 54)}{2} = 10,5$$

Interação TxK com nível de C baixo (-):

$$\frac{(Y^6 - Y^5) - (Y^2 - Y^1)}{2} = \frac{(83 - 52) - (72 - 60)}{2} = 9,5$$

Diferença = $10,5 - 9,5 = 1,0$

$$\text{Efeito de interação TxKxC} = \frac{\text{Diferença}}{2} = \frac{1,0}{2} = 0,5$$

Como é muito tedioso o cálculo dos efeitos seguindo as definições, uma alternativa mais rápida é a Tabela de Coeficientes em Contrastes (sinais + e - da Tabela A1.1). Todos os efeitos, principais e de interações podem ser calculados da mesma forma, como

mostrado no exemplo para o efeito principal da Temperatura, porém nas suas respectivas colunas de sinais.

Efeito da Temperatura; conforme sinais da primeira coluna da Tabela A2.1 e o divisor 4, que é igual a Y^+ ou Y^- , temos:

$$\frac{(-60 + 72 - 54 + 68 - 52 + 83 - 45 + 80)}{4} = \frac{+92}{4} = 23,0.$$

Cálculo do Desvio Padrão para os Efeitos:

Em geral, se g séries de experimentos são realizados e cada série i de experimentos rende n_i replicatas, então o grau de liberdade, ν_i , é dado por $\nu_i = n_i - 1$, e a estimativa combinada da variância é:

$$S = \frac{(\nu_1 S_1^2 + \nu_2 S_2^2 + \dots + \nu_g S_g^2)}{\nu}, \text{ onde}$$

$$\nu = \nu_1 + \nu_2 + \dots + \nu_g \text{ graus de liberdade.}$$

Como cada efeito principal e de interações são medidas estatísticas do tipo $(Y^+ - Y^-)$, a variância de cada efeito é dada por:

$$V(\text{efeito}) = V(Y^+ - Y^-), \text{ ou seja}$$

$$V(\text{efeito}) = \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right] \sigma^2, \text{ onde}$$

$$n_1 = n^{\circ} \text{ total de replicatas para o cálculo de } Y^+$$

$$n_2 = n^{\circ} \text{ total de replicatas para o cálculo de } Y^-.$$

Num planejamento fatorial onde o número de replicatas são constantes para todas as combinações de níveis, então $n_1 + n_2 = N$, número total de experimentos. Portanto, se um total de N experimentos são realizados num procedimento fatorial de dois níveis,

$$V(\text{efeito}) = \frac{4}{N} \sigma^2 \quad . \text{ Como } S^2 \text{ é uma estimativa de } \sigma^2, \text{ então}$$

$$V(\text{efeito}) = \frac{4}{N} S^2 \quad , \text{ logo}$$

$$\text{Desvio padrão(efeito)} = \left[\frac{4}{N} S^2 \right]^{1/2}$$

Os efeitos e o desvio padrão de efeito do fatorial exemplo são:

Temperatura	=	23,0 ± 1,4
Concentração	=	- 5,0 ± 1,4
Catalisador	=	1,5 ± 1,4
T x C	=	1,5 ± 1,4
T x K	=	10,0 ± 1,4
C x K	=	0,0 ± 1,4
T x C x K	=	0,5 ± 1,4

A interpretação do resultado pode ser facilitada com o auxílio da Figura A1.3.

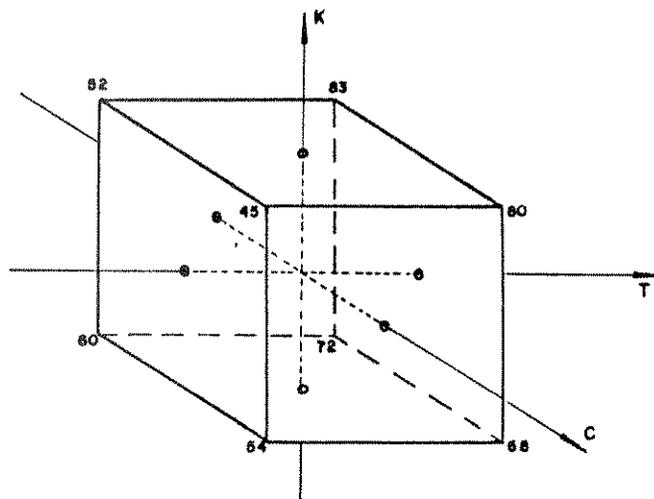


Figura A1.3 Representação do exemplo do fatorial 2^3

Interpretação do fatorial:

1-a concentração é independente da temperatura e do catalisador.

2-o efeito de aumentar a concentração é uma diminuição no rendimento de 5 unidades. Este efeito é constante para os níveis das outras variáveis testadas.

3-os efeitos de temperatura e catalisador não podem ser interpretados separadamente por razão do valor grande do efeito da interação entre eles.

É evidente que no método planejamento fatorial, o número de experimentos pode ser muito elevado, mesmo tratando-se de fatorial de dois níveis, pois isto depende do número de variáveis que serão avaliadas. Entretanto, como, de maneira geral, as interações de ordem

alta (terceira, quarta ou ordem superior) são pequenas e podem ser confundidas com o desvio padrão do efeito, é possível executar um planejamento fatorial sem que seja necessário a determinação de todos os parâmetros de interação. Neste caso, pode-se diminuir o número de experimentos e ainda determinar os efeitos mais importantes (principal e interações de segunda ordem). Este tipo de planejamento fatorial é chamado de Planejamento Fatorial Fracionado^{67,68}.

Os fatoriais fracionados mais aplicados são do tipo 2^{a-1} , e são chamados de "1/2 fatorial", mas fatoriais com outras frações também podem ser aplicados⁶⁷. Um fatorial fracionado 2^{4-1} (isto é, quatro variáveis estudadas a dois níveis cada uma) é exemplificado na Tabela A1.2.

Tabela A1.2 Exemplo de fatorial fracionado 2^{4-1} .

experimento	variáveis			
	A	B	C	D
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

1) faz-se o planejamento fatorial 2^3 completo ($4 - 1 = 3$) nas variáveis A, B e C.

2) os sinais das colunas A, B e C são multiplicados e encontra-se o sinal para a variável D.

Os efeitos e desvio padrão de efeito, neste tipo de fatorial são calculados da mesma forma que são calculados no planejamento fatorial completo^{67,72}. A vantagem que o planejamento fatorial fracionado apresenta sobre o planejamento fatorial completo é de permitir avaliar os efeitos principais e de interações de segunda ordem com um número menor de experimentos. Por outro lado, a desvantagem evidente é que para avaliar os efeitos de interação de ordem superior é necessário completar o fatorial com experimentos adicionais.

3- MÉTODO DE ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Este método consiste num grupo de técnicas usadas no estudo empírico de relações entre uma ou mais respostas medidas. É um método do tipo simultâneo.

O método de superfície de resposta é utilizado no estágio de otimização propriamente dita, isto é, o mesmo permite selecionar a combinação de níveis ótimos que faz com que a resposta obtida seja a melhor possível para a dada situação⁶⁷. O método é usado para obter uma estimativa do máximo ou mínimo e sua metodologia é baseada no planejamento fatorial.

EXEMPLO, relatado por Box et alli⁶⁷:

Determinar os valores de tempo (t) e temperatura (T) que produzem um rendimento químico máximo.

Através de planejamento fatorial prévio, verificou-se que há um máximo com tempo de 75 min, temperatura de 130°C e que $\sigma = 1,5$.

Planejamento de Primeira Ordem

Tomando o ponto inicial, $t = 75$ min e $T = 130^\circ$ C, como ponto central e variando o tempo de 70 para 80 min e a temperatura de 127,5 para 132,5°C, monta-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central e com suas variáveis escalonadas.

Escalação das variáveis : $X = \frac{X_1 - \bar{X}}{\frac{\Delta X}{2}}$, então

$$X_1 = \frac{\text{Tempo} - 75}{5} \quad \text{e} \quad X_2 = \frac{\text{Temperatura} - 130,0}{2,5}$$

Tabela A1.3 Resultados do planejamento fatorial 2^2 com três replicatas no ponto central.

experimento	variáveis		variáveis escalonadas		resposta
	t(min)	T(°C)	X_1	X_2	rend., g
1	70	127,5	-1	-1	54,3
2	80	127,5	+1	-1	60,3
3	70	132,5	-1	+1	64,6
4	80	132,5	+1	+1	68,0
5	75	130,0	0	0	60,3
6	75	130,0	0	0	63,3
7	75	130,0	0	0	62,3

O planejamento empregado é um fatorial com triplicatas no ponto central (Tabela A1.3). Ele é chamado de Plano de Primeira Ordem

porque permite o ajuste de um modelo polinomial de primeiro grau do tipo,

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon .$$

Foi escolhido porque, nesta etapa de investigação, normalmente acredita-se estar a uma distância afastada do máximo. O plano escolhido: a) permite o modelo planar ser suficientemente ajustado, b) permite a realização de exames para determinar se o modelo esta tendo uma adequada representação e c) fornece alguma estimativa do erro experimental.

Os valores dos coeficientes do polinômio do primeiro grau pode ser estimado pelos mínimos quadrados, e :

β_0 é a média de todas as sete observações, isto é,
 $\beta_0 = 62,01$.

O coeficiente β_1 é a mudança que ocorre na resposta quando X_1 é mudado de uma unidade. O efeito principal linear num planejamento fatorial com variáveis escalonadas é a mudança na resposta quando X_1 é variado de -1 para +1, isto é, por duas unidades. Então, β_1 é a metade do efeito principal linear, ou seja, $\beta_1 = 2,35$. Similarmente, $\beta_2 = 4,50$. Então,

$$Y = 62,01 + 2,35 X_1 + 4,50 X_2 ,$$

$(\pm 0,57) \quad (\pm 0,75) \quad (\pm 0,75)$

onde o desvio padrão mostrado abaixo de cada coeficiente da equação é calculado supondo $\sigma = 1,5$, e é dado por:

$$S = \left[\frac{p \sigma^2}{n} \right] \frac{1}{2}, \text{ onde } \begin{cases} p = \text{número de parâmetros} \\ n = \text{número de ensaios} \end{cases}$$

$$\begin{aligned} \text{Para : } \beta_0 & \Rightarrow p = 1 \quad \text{e} \quad n = 7 \\ \beta_1 & \Rightarrow p = 1 \quad \text{e} \quad n = 4 \\ \beta_2 & \Rightarrow p = 1 \quad \text{e} \quad n = 4 \end{aligned}$$

Embora a tentativa de cálculo pelos mínimos quadrados assuma como adequado o modelo planar de primeira ordem, o planejamento escolhido permite fazer verificação de tal suposição.

O modelo planar supõe que os efeitos das variáveis são aditivos. Interações entre as variáveis poderiam ser medidas pelo coeficiente β_{12} do produto cruzado do termo $X_1 X_2$ adicionado no modelo. Este coeficiente é estimado por:

$$\beta_{12} = 1/4 [(1)(54,3) + (-1)(60,3) + (-1)(64,6) + (1)(68,0)] = -0,65.$$

O desvio padrão desta estimativa é 0,75, o mesmo que para β_1 e β_2 (foi usado $\sigma = 1,5$ como antes), portanto a interação $X_1 X_2$ é desprezível.

Uma outra verificação da planaridade local é suprida pela

comparação Y_F , média dos quatro pontos do fatorial 2^2 , com Y_C , média das medidas no centro do plano. Admitindo que o plano esteja situado sobre uma superfície curva da forma de "píres", o valor $Y_F - Y_C$ é uma medida da curvatura da superfície. Pode-se, também, mostrar que se β_{11} e β_{22} são coeficientes dos termos X_1^2 e X_2^2 , respectivamente, esta medida da curvatura pode ser uma estimativa de $\beta_{11} + \beta_{22}$. Então a estimativa da curvatura total é:

$$\beta_{11} + \beta_{22} = Y_F - Y_C = \left[\frac{54,3+60,3+64,6+68,0}{4} \right] - \left[\frac{60,3+62,3+64,3}{3} \right] = -0,50$$

Usando $\sigma = \pm 1,5$, temos que o desvio padrão desta estimativa é $\pm 1,15$. Portanto, não há razão para questionar a adequação do modelo planar neste exemplo, visto que:

$$\begin{aligned} \beta_{12} &= -0,65 \pm 0,75 \\ \beta_{11} + \beta_{22} &= -0,50 \pm 1,15. \end{aligned}$$

Aceitando-se, então, a equação de contorno para aquela região da superfície, temos:

$$62,01 - Y + 2,35 X_1 + 4,50 X_2 = 0.$$

Fazendo $Y = 56, 60, 64$ e 68 , respectivamente, temos uma série de equações espaçadas paralelamente como linhas de contornos retos (Figura A1.4).

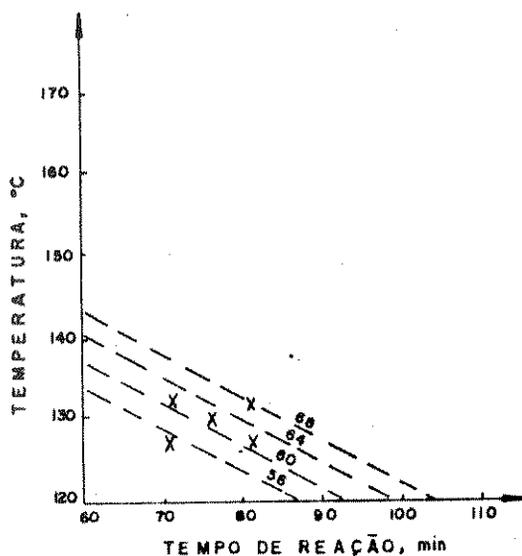


Figura A1.4 Linhas de contorno para a superfície de resposta.

$$62,01 - Y + 2,35 X_1 + 4,50 X_2 = 0$$

(X) pontos do planejamento fatorial

Caminho da Ascensão Máxima

É uma linha perpendicular às linhas de contorno da superfície de respostas partindo do ponto central do planejamento fatorial. O caminho da ascensão máxima pode ser obtido através do gráfico (Figura A1.5) ou calculando os valores dos pontos como segue.

Começando no centro da região experimental, o caminho seguido é o movimento simultâneo de $\beta_2 = + 4,50$ unidades em X_2 para cada $\beta_1 = + 2,35$ unidades movidas em X_1 , ou equivalentemente, $4,50/2,35 = 1,91$ unidades em X_2 para cada unidade em X_1 .

No exemplo, uma conveniente série de pontos sobre o caminho de ascensão máxima foi escolhido e realizado experimentos nas

condições definidas por este caminho (Tabela A1.4).

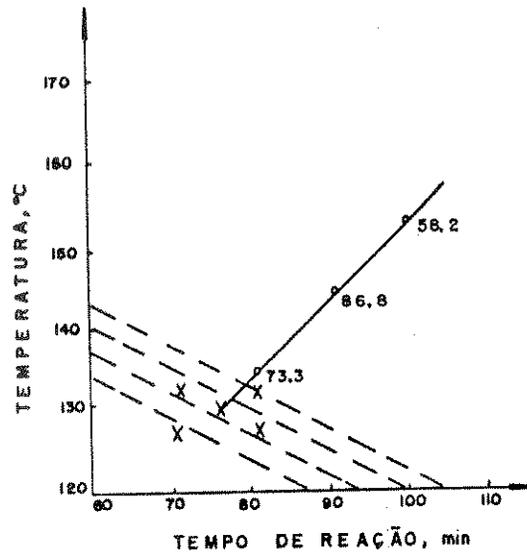


Figura A1.5 Linhas de contorno para a superfície de resposta.

$$62,01 - Y + 2,35 X_1 + 4,50 X_2 = 0$$

(X) pontos do planejamento fatorial

Tabela A1.4 Caminho da ascensão máxima.

experimento	variáveis		variáveis escalonadas		resposta
	t(min)	T(°C)	X ₁	X ₂	rend.,g
0	75	130,0	0	0	62,3*
1	80	134,8	1	1,91	73,3
2	90	144,4	3	5,74	86,8
3	100	153,9	5	9,57	58,2

* Média dos resultados do ponto central.

O experimento 3 deu rendimento de 58,2 que é menor que o experimento 2, indicando que o movimento de 2 para 3 foi grande demais, logo, a região compreendida entre 90-100 min e 144-154 °C deve ser melhor explorada. Pode-se continuar pelo caminho da ascensão máxima ou então obter uma nova equação de superfície para representar esta nova região.

Segundo Planejamento de Primeira Ordem

Um novo planejamento fatorial 2^2 com ponto central situado próximo ao experimento 2 (Tabela A1.4) é efetuado (isto é, tempo de 90 min e temperatura de 145 °C). Este planejamento explorou a região: tempo, 80 - 100 min e temperatura, 140 a 150 °C, e os resultados se encontram na Tabela A1.5.

Tabela A1.5 Segundo planejamento fatorial 2^2 com duas replicatas no ponto central.

experimento	variáveis		variáveis escalonadas		reposta
	t(min)	T(°C)	X_1	X_2	rend.,g
1	80	140,0	-1	-1	78,8
2	100	140,0	+1	-1	84,5
3	80	150,0	-1	+1	91,2
4	100	150,0	+1	+1	77,4
5	90	145,0	0	0	89,7
6	90	145,0	0	0	86,8

Aplicando novamente o modelo polinomial de primeiro grau temos a equação de superfície de respostas:

$$Y = 84,73 - 2,03 X_1 + 1,33 X_2$$

$$(\pm 0,61) \quad (\pm 0,75) \quad (\pm 0,75)$$

Avaliando-se o valor do termo de interação e a curvatura da superfície temos:

$$\beta_{12} = -4,88 \pm 0,75$$

$$\beta_{11} + \beta_{22} = -5,28 \pm 1,15.$$

Estes valores mostram que na presente região a equação polinomial de primeiro grau é inadequada para representar a função de resposta local.

Planejamento de Segunda Ordem

Como a aproximação polinomial de primeiro grau mostrou ser inadequada na nova região experimental, uma aproximação polinomial de segundo grau é agora considerada:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \epsilon.$$

Para estimar eficientemente todos os seis coeficientes neste modelo e para fornecer uma análise apropriada e determinação de erro, o segundo fatorial (Tabela A1.5) foi ampliado com um planejamento tipo "estrela", constituído de quatro pontos axiais e duas novas replicatas para o ponto central (Tabela A1.6).

Tabela A1.6 Planejamento fatorial complementar tipo estrela.

experimento	variáveis		variáveis escalonadas		resposta
	t(min)	T(°C)	X ₁	X ₂	rend.,g
7	76	145,0	-√2	0	83,3
8	104	145,0	+√2	0	81,2
9	90	138,0	0	-√2	81,2
10	90	152,0	0	+√2	79,5
11	90	145,0	0	0	87,0
12	90	145,0	0	0	86,0

Reunindo os pontos experimentais das Tabelas A1.5 e A1.6, podemos ter uma visão das regiões das variáveis que foram exploradas, como representado na Figura A1.6.

O ajuste da equação do segundo grau pelos mínimos quadrados para os resultados do planejamento fatorial composto (experimentos de 1 a 12, Tabelas A1.5 e A1.6) fornecem a seguinte equação:

$$Y = 81,36 - 1,39 X_1 + 0,37 X_2 - 2,15 X_1^2 - 3,12 X_2^2 - 4,88 X_1 X_2.$$

Recomenda-se o uso de programa computacional de regressão linear múltipla⁷⁴ para obtenção dos coeficientes destas equações, o que diminui a probabilidade de erros na manipulação dos números. Ainda, com respeito a equação do segundo grau para a superfície de resposta temos que a verificação da validade do modelo nos fornece:

$$\beta_{111} - \beta_{122} = 1,28 \pm 1,06$$

$$\beta_{222} - \beta_{122} = -1,93 \pm 1,06.$$

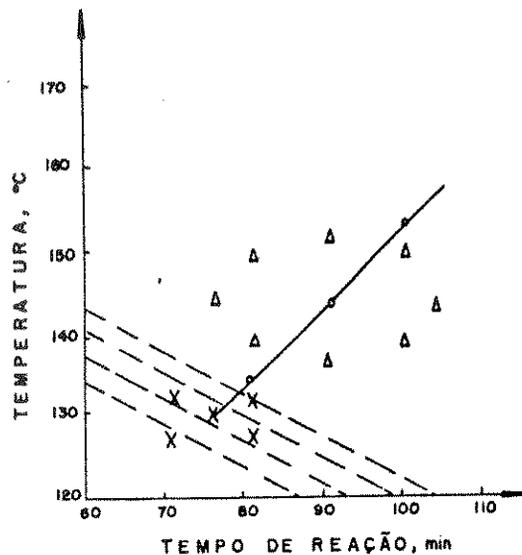


Figura A1.6 Representação do planejamento fatorial composto.

(X) pontos da primeira região explorada.

(°) caminho da inclinação máxima.

Nota-se que o modelo polinomial do segundo grau é ligeiramente inadequado, portanto:

- 1) aceita-se o modelo,
- 2) desloca-se o sistema para mais perto do máximo ou
- 3) busca-se um modelo com polinômio do terceiro grau.

Aceitando-se o modelo, observa-se a superfície de resposta representada pelas linhas de contorno da Figura A1.7.

Neste exemplo do método de superfície de resposta, admitindo, portanto, que os efeitos de terceira ordem são insignificantes, pela maximização analítica da equação polinomial do segundo grau, que representa a superfície de respostas, chega-se aos

valores de X_1 e X_2 que maximizam Y . Obtem-se, portanto, os valores de tempo de reação e temperatura que tornam o rendimento máximo.

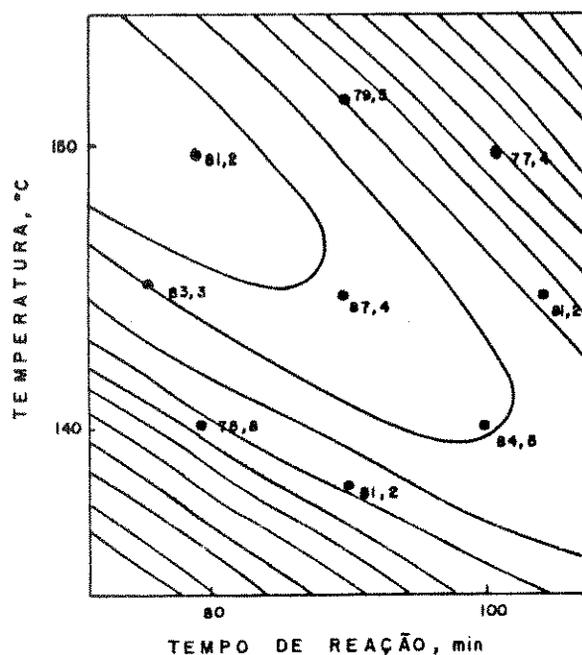


Figura A1.7 Linhas de contorno da superfície de resposta.

$$Y = 81,36 - 1,39 X_1 + 0,37 X_2^2 - 2,15 X_1^2 - 3,12 X_2 - 4,88 X_1 X_2$$

APÊNDICE 2

SOLUÇÕES DOS INTERFERENTES

Solução $1.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de Fe(III) foi preparada pela dissolução de 0,8635 g de $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck) e elevação do volume, com solução de HCl 0,5 M, a 100 ml.

Solução $1.350 \mu\text{g ml}^{-1}$ de Ti(IV) foi preparada pela fusão de 1,1045 g de TiO_2 (Merck) com 10,0031 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$, dissolução da massa branca resultante e elevação do volume, com solução de H_2SO_4 6 %, a 500 ml.

Solução $5.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de W(VI) foi preparada pela dissolução de 0,8971 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fisher) em água e completando o volume a 100 ml.

Solução $1.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de V(V) foi preparada pela dissolução de 0,2296 g de NH_4VO_3 (Carlo Erba) em água e completando o volume a 100 ml.

Solução $1.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de Cr(VI) foi preparada pela dissolução de 0,2829 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Carlo Erba) em água e completando o volume a 100 ml.

Solução $5.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de P foi preparada pela dissolução de 1,8860 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em água e completando o volume a 100 ml.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EVANS, H.J.. "Role of Molybdenum in Plant Nutrition". *Soil Sci. Amer. Proc.*. 1956, 81(13): 199-208.
2. BURGMAYER, S.J.N. e STIEFEL, E.J.. "Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems - The Chemical Uniqueness of Molybdenum". *J. Chem. Ed.*. 1985, 62: 943-953.
3. PEYVE, Y.V.. "Biochemistry of Molybdenum". *Sov. Soil Sci.*. 1969, 1: 34-47.
4. PURVIS, E.R. e PETERSON, N.K.. "Methods of Soil and Plant Analysis for Molybdenum". *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*. 1956, 81: 223-228.
5. GLORIA, N.A.. "Sobre uma Modificação na Determinação de Molibdênio em Plantas". *An. Esc. Sup. Luiz de Queiroz*. 1962, 20: 3-13.
6. SSEKAALO, H.. "A Rapid and Accurate Method for the Determination of Molybdenum in Plant Materials with Toluene-3,4-dithiol". *Analyst*. 1971, 96: 346-348.
7. BATAGLIA, O.C.. "A Determinação de Molibdênio por Espectrofotometria de Absorção Atômica". Tese de Doutorado. ESALQ/USP, Piracicaba. 1972.
8. HADJIIOANNOU, T.P.. "Microdetermination of Molybdenum by an Automatic Reaction Rate Method". *Anal. Chim. Acta*. 1966, 35: 360-364.
9. FUGE, R.. "An Automated Method for the Determination of Molybdenum in Geological and Biological Samples". *Analyst*. 1970, 95: 171-176.

10. QUIN, B.F. e WOODS, P.H.. "Automated Catalytic Method for the Routine Determination of Molybdenum in Plant Materials". *Analyst*. 1979, 104: 552-559.
11. NOYES, A.A. . "Beitrag zur Kenntnis der Gesetze der Geschwindigkeit von Polymolekularen Reaktionen". *Z. Phys. Chem.*. 1965, 18: 118-132.
12. LIEBHAFSKY, H.A. e MOHAMMAD, A.. "The Kinetics of the Reduction, in Acid Solution, of Hydrogen Peroxide by Iodide Ion". *J. Am. Chem. Soc.*. 1933, 55: 3977-3986.
13. YATSIMIRSKII, K.B.. Kinetic Methods of Analysis , Pergamon Press, Londres, 1966.
14. YATSIMIRSKII, K.B. e AFANASEVA, L.P. . "Kinetic Methods of Quantitative Analysis. Determination of Small Amounts of Molybdenum". *J. Anal. Chem. (USSR)*. 1956, 11: 327-330.
15. EIVAZI, F.; SIMS, J.L. e CRUTCHFIELD, J. . "Determination of Molybdenum in Plant Materials using a Rapid, Automated Method". *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*. 1982, 13: 135-150.
16. BRADFIELD, E.G. e STICKLAND, J.F. . "The Determination of Molybdenum in Plants by an Automated Catalytic Method". *Analyst*. 1975, 100: 1-6.
17. ZHAO-LUN, F. e SHU-KUN, X. . "Determination of Molybdenum at $\mu\text{g l}^{-1}$ Levels by Catalytic Spectrophotometric Flow Injection Analysis". *Anal. Chim. Acta*. 1983, 145: 143-150.
18. PESSEDA, L.C.P.; JACINTHO, A.D. e ZAGATTO, E.A.G.. "Catalytic Determination of Molybdenum in Plants by Flow-Injection Spectrophotometry with Ion-Exchange Separation". *Anal. Chim. Acta*. 1988, 214: 239-245.

19. FOREMAN, J.K. e STOCKWELL, P.B.. Automatic Chemical Analysis, John Wiley & Sons Inc., Londres, 1975.
20. BOX, G.E.P.. "The Exploration and Exploitation of Response Surface: Some General Considerations and Examples". *Biometrics*. 1954, 10: 16-60.
21. PASQUINI, C. e de OLIVEIRA, W.A.. "Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium (VI), Ammonia, and Phosphorus". *Anal. Chem.*. 1985, 57: 2575-2579.
22. PRIMAVESI, A.. "Manejo do Solo: A Agricultura em Regiões Tropicais", Nobel, São Paulo, 1984.
23. JORGE, J.A.. Solo, Manejo e Adubação : Compêndio de Edafologia", Nobel, São Paulo, 1983.
24. GUPTA, U.C. e LIPSETT, J.. "Molybdenum in Soils, Plant and Animals". *Adv. Agron.*. 1981, 34: 73-115.
25. MENGEL, K. e KIRBY, E.A.. Principles of Plant Nutrition", International Potash Institute, Berna, 1978.
26. LOPES, A.S.. "Uso Eficiente de Fertilizantes com Micronutrientes" IN: Simpósio Sobre Fertilizantes na Agricultura Brasileira, Brasília, 1984. Anais ... Brasília, EMBRAPA-DEP. Documento, 14. 1984.
27. DAVIES, E.B.. "Factors Affecting Molybdenum Availability in Soils". *Soil Sci.*. 1956, 81: 209-221.
28. SINGH, M. e KUMAR, V. . "Sulfur, Phosphorus, and Molybdenum Interactions on the Concentration and Uptake of Molybdenum in Soybean Plants (*Glycine max*)". *Soil Sci.*. 1979, 127: 307-312.
29. VIDOR, C. e PERES, J.R.R.. "Nutrição das Plantas com Molibdênio e

- Cobalto. IN: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo. XVII., Anais ... Enxofre e Micronutrientes na Agricultura Brasileira. ed. por BORKERT, C.M. e LANTMANN, A.F., Londrina, EMBRAPA-CNPSO/IAPAR/SBCS, 1988.
30. GUPTA, V.C.. "Effect and Interaction of Molybdenum and Limestone on Growth and Molybdenum Content of Cauliflower, Alfalfa, and Bromegrass in Acid Soils". *J. Soil Sci. Soc. Am.*, 1969, 33: 929-932.
31. PERES, J.R.R.; NERY, M e FRANCO, A.A. . "Constatação de Deficiência de Molibdênio em vários Solos do Estado do Rio de Janeiro, Através de Teste Microbiológico". IN: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, XV. Campinas, 1975. Anais ... Campinas, CBCS, 1975.
32. TIFFIN, L.O.. "Translocation of Molybdenum in Plants". IN: MORTVEDT, J.J.; GIOEDANO, P.M. e LINDSAY, W.L.. Micronutrients in Agriculture, Soil Science Society of America Inc., Madison, 1972.
33. LANTMANN, A.F.; SFREDO, G.J.; BORKERT, C.M. e OLIVEIRA, M.C.N.. "Resposta da Soja a Molibdênio em Diferentes Níveis de pH do Solo". *R. bras. Ci. Solo.* 1989, 13(1): 45-49.
34. BATAGLIA, O.C. et alli. Métodos de Análise Química de Plantas. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 1983. Boletim Técnico, 78.
35. GLORIA, N.A.. "O Método Colorimétrico do Ditiol na Determinação de Molibdênio". Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba. 1964.
36. SSEKAALO, H.. "Some Observations on the Choice of a Solvent in the Spectrophotometric Determination of Molybdenum by Toluene-3,4-dithiol". *Lab. Pract.*, 1970, 19: 603-604.

37. QUIN, B.F. e BROOKS, R.R.. "The Rapid Colorimetric Determination of Molybdenum with Dithiol in Biological, Geochemical and Steel Samples". *Anal. Chim. Acta.* 1975, 74: 75-84.
38. CHAN, K.M. e RYLEY, J.P.. "The Determination of Molybdenum in Natural Waters, Silicates and Biological Materials". *Anal. Chim. Acta.* 1966, 36: 220-229.
39. LUKE, C.L.. "Spectrophotometric Determination of Molybdenum in Steel, Tantalum, Niobium or Tungsten". *Anal. Chim. Acta.* 1966, 34: 302-307.
40. SCAIFE, J.F.. "Colorimetric Microestimation of Molybdenum as Thiocyanate Complex". *Anal. Chem.* 1956, 28: 1636.
41. LOUNAMAA, N.. "The Absorptiometric Determination of Molybdenum as Molybdenum (V) Thiocyanate in Steel". *Anal. Chim. Acta.* 1965, 33: 21-35.
42. JOHNSON, C.M. e ARKLEY, T.H.. "Determination of Molybdenum in Plant Tissue". *Anal. Chem.* 1954, 26: 572-573.
43. KHAN, S.; CLOUTIER, R. e HIDIROGLOU, M.. "Atomic Absorption Spectroscopic Determination of Molybdenum in Plant Tissue and Blood Plasma". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1979, 12: 348-351. IN: PESSENDA, L.C.R.. "Determinação Espectrofotométrica Catalítica de Molibdênio em Digeridos Vegetais com Emprego de Resina de Troca Iônica em Sistema de Injeção em Fluxo". Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba. 1987.
44. HOENIG, M.; van ELSEN, Y. e van CAUTER, R.. "Factors Influencing the Determination of Molybdenum in Plant Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Anal. Chem.* 1986, 58: 777-780.

45. NEUMAN, D.R. e MUNSHOVER, F.F. . "Rapid Determination of Molybdenum in Botanical Material by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Anal. Chim. Acta.* 1981, 123: 325-328.
46. LYONS, D.J. e ROOFAYEL, R.L.. "Determination of Molybdenum in Plant Material Using Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy". *Analyst.* 1982, 107: 331-335.
47. SPIERS, G.A.; DUDAS, M.J. e HODGINS, L.W.. "Conditions and Procedure for Multielement Analysis of Soils and Plant Tissue by ICP-AES". *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*. 1983, 14: 629-644.
48. MULLER, H.. "Catalymetric Methods of Analysis". *C.R.C. Anal. Crit. Rev.*. 1982, 13: 312-372.
49. YATSIMIRSKII, K.B.. "Kinetic Methods of Quantitative Analysis. The Theoretical Bases of Kinetic Methods of Quantitative Analysis". *J. Anal. Chem. (USSR)*. 1955, 10: 323-327.
50. SVEHLA, G. e ERDEY, L.. "The Use of Landolt Reactions in Quantitative Microanalysis. Theoretical Background of a New Analytical Principle". *Microchem. J.*. 1963, 7: 206-220.
51. SVEHLA, G. e ERDEY, L.. "The Use of Landolt Reactions in Quantitative Microanalysis. Determination of Traces of Molybdenum by the Hydrogen Peroxide-Iodide Reaction". *Microchem. J.*. 1963, 7: 221-232.
52. RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.. "Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis". *Anal. Chim. Acta.* 1975, 78: 145-157.
53. RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.. Flow Injection Analysis, John Wiley & Sons Inc., New York, 1981.
54. HORVAI, G. e PUNGOR, E.. "Theoretical Background of Flow Analysis".

- C.R.C. Crit. Rev. Anal. Chem.. 1987, 17: 231-264.
55. VALCARCEL, M. e LUQUE DE CASTRO, M.. Análisis por Inyección in Flujo, Imprenta São Paulo, Cordoba, 1984.
56. SKEGGS Jr., L.T. . "An Automatic Method for Colorimetric Analysis". *Am. J. Clin. Path.*.. 1957, 28: 311-322.
57. SNYDER, L.R.. "Continuous-Flow Analysis: Present and Future". *Anal. Chim. Acta.* 1980, 114: 3-18.
58. PASQUINI, C.. "Instrumentação e Metodologia para Análise em Fluxo Contínuo: Desenvolvimento de um Entalpímetro de Fluxo, de um Sistema Monossegmentado e Construção de um Circuito Retentor de Picos". Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas, 1984.
59. FERREIRA, M. . "Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas com Azometina-H, usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado". Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas. 1987.
60. de ANDRADE, J.C.; FERREIRA, M.; BACCAN, N. e BATAGLIA, O.C.. "Spectrophotometric Determination of Boron in Plants Using Monosegmented Continuous Flow Analysis". *Analyst.* 1988, 113: 289-293.
61. PESSENDA, L.C.R.. "Determinação Espectrofotométrica Catalítica de Molibdênio em Digeridos Vegetais com Emprego de Resina de Troca Iônica em Sistema de Injeção em Fluxo". Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba. 1987.
62. SMITH, R.H. e KILFORD, J.. "Kinetics of the Molybdate Catalysed Oxidation of Iodide by Hydrogen Peroxide. *Int. J. Chem. Kinetics.* 1976, 8: 1-10.
63. BERGAMIN F^o, H.; MEDEIROS, J. X.; REIS, B.F. e ZAGATTO, E.A.G.. "Solvent Extraction in Continuous Flow Injection Analysis". *Anal.*

- Chim. Acta.* 1978, 101: 9-16.
64. de ANDRADE, J.C. e LOBOSCHI, E.M.. "Simple Digital Counter for Use with Monosegmented Continuous Flow Analysis and Related Techniques" *Analyst.* 1988, 113: 295-296.
65. BACCAN, N.; de ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S. e BARONE, J.S.. Química Analítica Quantitativa Elementar, Edgard Blucher Ltda, São Paulo; UNICAMP, Campinas, 1985.
66. de ANDRADE, J.C.; ROCHA, J.C.; PASQUINI, C. e BACCAN, N.. "Effect of On-line Complex Formation Kinetics on the Flow Injection Analysis Signal: Spectrophotometric Determination of Chromium (VI)". *Analyst.* 1983, 108: 621-625.
67. BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. e HUNTER, J.S. . Statistics for Experimenters : An Introduction to Design , Data Analysis and Model Building, John Wiley & Sons, New York, 1978.
68. LEGRET, M. e DIVET, L.. "Utilisation des Plans d'Expériences Factoriels pour l'Optimisation du Dosage du Plomb par Atomisation Électrothermique". *Analisis.* 1988, 16: 97-106.
69. SPENDLEY, W.; HEXT, G.R. e HIMSWORTH, F.R. . "Sequential Application of Simplex Designs in Optimisation and Evolutionary Operation". *Technometrics.* 1962, 4: 441-461.
70. BURTON, K.W.C. e NICKLESS, G.. "Optimisation via Simplex. Part I. Background, Definitions and a Simple Application". *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 1987, 1: 135-149.
71. NELDER, J.A. e MEAD, R. . "A Simplex Method for Function Minimization". *Computer J.* 1965, 7: 308-313.
72. VERGILI Jr., R.. "Aplicação do Método Simplex de Otimização Experimental em Química Analítica". Tese de Mestrado. UNICAMP.

Campinas. 1988.

73. BRUNS, R.E. e SCARMINIO, I.E.. Manual de Usuário : Sistemas Quimiométricos para Microcomputadores, UNICAMP, Campinas.
74. DRAPER, N.R. e SMITH, H.. Applied Regression Analysis, John Wiley & Sons, New York, 1966.
75. "Nomenclature, Symbols, Units and Their Usage in Spectrochemical Analysis-II". Data Interpretation. *Spectrochim. Acta, Part B*. 1987, 33: 242-247.
76. BASSET, J.; JEFFERY, G.H. e MENDHAM, J.. VOGEL - Análise Inorgânica Quantitativa, Traduzido por ESPINOLA, A., Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1981.
77. CHAPMAN, H.D. . Diagnostic Criteria for Plant and Soils, University of California, Division of Agricultural Science, 1986.
78. de ANDRADE, J.C. ; ROCHA, J.C. e BACCAN, N.. "Sequential Spectrophotometric Determination of Chromium (III) and Chromium (VI) Using Flow Injection Analysis". *Analyst*. 1985, 100: 197-199.
79. GOLDSTEIN, G.; MANNING, D.L. e MENIS, O.. "Spectrophotometric Determination of Molybdenum as the Quercetin Complex in an Alpha-Benzoinoxime-Chloroform-Ethyl Alcohol Medium". *Anal. Chem.*. 1958, 30: 539-542.
80. MAECK, W.J.; KUSSY, M.E. e REIN, J.E. . "Radiochemical Determination of Molybdenum by Solvent Extraction". *Anal. Chem.*. 1961, 33: 237-238.
81. WISH, L.. "Quantitative Radiochemical Determination of Molybdenum - 99 by Solvent Extraction". *Anal. Chem.*. 1962, 34: 625-627.
82. STARY, J.. The Solvent Extraction of Metal Chelates, Pergamon Press, Londres, 1964.

83. DE, A.K.; KHOPKAR, S.M e CHALMERS, R.A.. Solvent Extraction of Metals, Van Nostrand Reinhold Company, Londres, 1970.
84. HOENES, H.J. e STONE, K.G. . "Analytical Chemistry of α -Benzoinoxime Complexes of Molybdenum, Tungsten and Vanadium". *Talanta*. 1960, 4: 250-263.
85. MARCZENKO, Z.. Spectrophotometric Determination of Elements, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1976.
86. PENG, P.Y. e SANDELL, E.B.. "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Tungsten and Molybdenum with Thiocyanate after α -Benzoinoxime Extraction". *Anal. Chim. Acta*. 1963, 29: 325-334.
87. CALETKA, R. e KRIVAN, V.. "Extraction of Molybdenum and Tungsten with various Reagents". *Fresenius Z. Anal. Chem.*. 1989, 332: 866-873.
88. GORSUCH, T.T. . The Destructions of Organic Matter, Pergamon Press, Oxford, 1970.
89. Bimonthly Report 91.1 - January/February 1991. International Plant-analytical Exchange (IPE), O/C Dr. V. Houba, P.O. Box 8005, 6700 EC Wageningen - The Netherlands.
90. LAITINEN, H.A. e HARRIS, W.A.. Chemical Analysis, Mc Gaw-Hill Kogakusha, Tokyo, 1975.