UNICAMP

1150065821
IQ
T/UNICAMP F872d

Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas
Grupo de Instrumentação e Automação

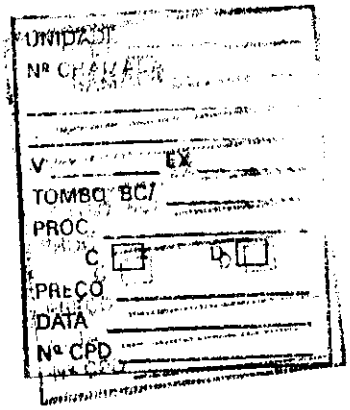
Desenvolvimento de um Sensor Químico de Fibras Ópticas para a Determinação Simultânea de Metais Pesados Empregando Métodos de Calibração Multivariada

Tese de Doutorado – Área de Química Analítica

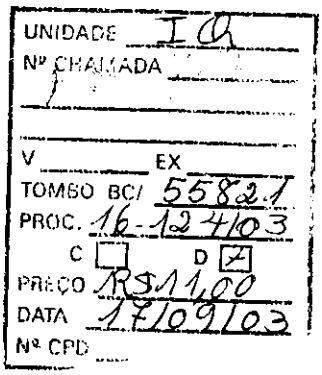
Aluno: Fernando Rodrigo Frederico
Orientador: Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr.

Campinas, 22 de maio de 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL


UNIDADE
Nº CHAMADA
V EX
TOMBO BC/
PROC.
C D
PREÇO
DATA
Nº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA UNICAMP


UNIDADE IQ
Nº CHAMADA
V EX
TOMBO BC/ 55821
PROC. 16-124/03
C D
PREÇO R$11,00
DATA 17/09/03
Nº CPD

CM00189085-7
bib id 300902

Frederico, Fernando Rodrigo

F872d Desenvolvimento de um sensor químico de fibras ópticas para a determinação simultânea de metais pesados empregando métodos de calibração multivariada / Fernando Rodrigo Frederico. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Ivo Milton Raimundo Junior

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Optodo. 2. Quimiometria. 3. Reflectância. 4. Metais pesados. I. Raimundo Junior, Ivo Milton. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e pela saúde concedida.

- Aos meus pais Ana e Leonildo pelo carinho, dedicação e apoio.

- Á direção do Instituto de Química da Unicamp pelas condições fornecidas para a realização desta Tese.

- Ao CNPQ pelo auxílio financeiro concedido.

- Ao Prof. Ivo pela dedicada orientação, paciência e constante estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho.

- À todos os professores, que ao longo dos anos contribuíram para a minha formação profissional, em especial aos Prof. Jarbas, Célio e Mário pela valorosa contribuição na realização desta Tese.

- Aos colegas do laboratório Alexandre (Xaolin), Pilar, Fernando, Márcia, Claudete, Ismael, Eliane, Fernanda, Celeste, Carlos Fidelis Ligia, Sérgio, Fabiano, Alexandre, Emerson, Fernanda Almeida, Edna, Cristina, Patrícia, Cláudia, Márcia Bisinoti, Andrea, Gislaine, Gilberto, Gilmar, pela ajuda e pelos bons momentos vividos.

- Ao pessoal da CPG, em especial à Solange, Bel, André, Rodrigo e Celi, pela competência na organização deste programa de pós-graduação.

- À todos os funcionários do Instituto de Química, em especial ao Mário.

- E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional.

RESUMO

Título: Desenvolvimento de um sensor químico de fibras ópticas para a determinação simultânea de metais pesados empregando métodos de calibração multivariada

Autor: Fernando Rodrigo Frederico

Orientador: Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Jr.

Este trabalho descreve o desenvolvimento um sensor químico de fibras ópticas (optodo) para a determinação de metais pesados, usando o reagente químico 4-(2-piridilazo)resorcinol, (PAR) imobilizado na resina Amberlite XAD-4, que foi fixado na extremidade de um feixe bifurcado de fibras ópticas. O optodo desenvolvido foi utilizado na determinação simultânea de dois metais (Ni(II)/Cd(II)) e de três metais (Ni(II)/Cd(II)/Mn(II)), na faixa de concentração de 0,5 a 3,5 mg/L, escolhida em função da saturação da fase sensora. Foram empregados os métodos de calibração multivariada PCR (regressão por componentes principais) e PLS (regressão por mínimos quadrados parciais), usando as variantes PLS1, que utiliza um componente da mistura para cada modelo e PLS2, que usa um único modelo para todos os componentes. Na construção e validação dos modelos de calibração multivariada foram utilizados diferentes métodos de pré-tratamento dos dados espectrais, que consistiram em centrar os dados espectrais na média, suavizá-los com um filtro de média móvel e obter os espectros de primeira derivada após os dados originais serem centrados na média. Os melhores resultados na determinação simultânea de Ni(II)/Cd(II) foram obtidos empregando-se o método PLS1 com os dados centrados na média, que forneceu valores de RMSEP de 0,27 mg/L para Ni(II) e 0,21 mg/L para Cd(II). No caso da determinação simultânea de Ni(II)/Cd(II)/Mn(II) os melhores resultados foram obtidos empregando-se o método PLS1 com dados centrados na média, obtendo-se valores de RMSEP de 0,19 mg/L para Ni(II), 0,29 mg/L para Cd(II) e 0,43 mg/L para Mn(II).

ABSTRACT

Title: Development of an optical chemical sensor for simultaneous determination of heavy metals employing multivariate calibration methods

Author: Fernando Rodrigo Frederico

Supervisor: Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr.

This work describes the development of an optical fibre chemical sensor (optode) for determination of heavy metals, by employing the 4-(2-piridylazo(resorcinol)) reagent, PAR, immobilised on Amberlite XAD-4 resin, which was fixed at the common end of a bifurcated optical fibre bundle. The optode was employed for simultaneous determination of two (Ni(II)/Cd(II)) and three (Ni(II)/Cd(II)/Mn(II)) metal ions, in the concentration range from 0.5 to 3.5 mgL^{-1}, which was chosen based on the saturation capability of the sensing phase. Multivariate calibration methods, such as Principal Component Regression (PCR) and Partial Least Square (PLS), including PLS1 (that employs a model for each component) and PLS2 (that employs a single model for all components), were employed to perform the simultaneous determinations. Different procedures for pre-processing of spectral data, such as mean centring, smoothing by sliding average and first derivative were employed. The best result for the simultaneous determination of Ni(II) and Cd(II) were obtained when the PLS1 method, with the data centred on the mean, was employed, providing RMSEP (root mean square error of prediction) values of 0.27 and 0.21 mgL^{-1} for Ni(II) and Cd(II), respectively. In the simultaneous determination of Ni(II)/Cd(II)/Mn(II), the model based on PLS1, after centring the data on the mean, showed the best prediction capability, providing RMSEP values of 0.19, 0.29 and 0.43 mgL^{-1} for Ni(II), Cd(II) and Mn(II), respectively.

CURRICULUM VITAE

Fernando Rodrigo Frederico

Formação Acadêmica

Pós-Graduação: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Química
Doutorado em Química Analítica
Período: 1998-2003

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Química
Mestrado em Química Analítica
Período: 1995-1997

Graduação: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Química
Bacharelado em Química Tecnológica
Período: 1990-1994

Secundário: Escola Estadual Vítor Meirelles
Campinas-SP
Período: 1985-1987

Atividades de Pesquisa

Projeto de Doutorado:

"Desenvolvimento de um sensor químico de fibras ópticas para a determinação simultânea de metais pesados empregando métodos de calibração multivariada.", desenvolvido no Departamento de Química Analítica. Bolsista do CNPQ/DF.

Projeto de Mestrado:

"Estudos com ditizona imobilizada, com vistas ao desenvolvimento de sensores químicos de fibras ópticas para a determinação de metais pesados". Desenvolvido no Departamento de Química Analítica. Bolsista do CNPQ/DF.

Produção Científica, Tecnológica

Trabalhos resumidos em eventos

Frederico, Fernando Rodrigo; Raimundo, Ivo M. Jr.; Visani, Valéria; Araújo, Mário C. U.; Use of Partial Least Square and Principal Component Regression for Simultaneous Determination of Nickel and Cadmium in Water. VI Europt(r)ode, 2002, Manchester, UK.

Frederico, Fernando Rodrigo; Raimundo, Ivo M. Jr.; Rohwedder, Jarbas, J. R.; Araújo, Mário C. U.; Desenvolvimento de um optodo interfaceado a um microcomputador para a determinação de metais pesados. 22° Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 1999, Poços de Caldas.

Frederico, Fernando Rodrigo; Oliveira, Walace Alves de; Narayanaswamy, R., Estudos sobre a influência do pH na formação de ditizonatos metálicos imobilizados. IX Encontro Nacional de Química Analítica, 1997, São Carlos.

Frederico, Fernando Rodrigo; Oliveira, Walace Alves de; Narayanaswamy, R., Sensor óptico de fase de reação renovável para determinação de mercúrio. IX Encontro Nacional de Química Analítica, 1997, São Carlos.

APRESENTAÇÃO

A determinação quantitativa de metais pesados é de grande interesse em diversas áreas incluindo análises ambientais, controle de processos e análises clínicas. Várias técnicas analíticas, como espectrometria de absorção atômica, polarografia, espectrofotometria de absorção UV/visível, vêm sendo empregadas na determinação destes metais. Nos últimos anos, os sensores químicos de fibras ópticas (optodos) tem atraído substancial interesse devido a algumas vantagens que estes sensores apresentam, como simplicidade, baixo custo, flexibilidade e a possibilidade de se realizar monitoramento continuo e remoto.

Os optodos utilizados na determinação de metais pesados são baseados, na maioria dos casos, no uso de reagentes indicadores imobilizados em suportes sólidos (fase sensora), que sofrem uma mudança de coloração ou outra propriedade óptica na presença dos íons metálicos. Estas mudanças são monitoradas após a fixação destes reagentes imobilizados na extremidade de fibras ópticas.

O surgimento dos métodos de calibração multivariada tem provocado um crescente interesse no desenvolvimento de métodos de determinação simultânea de metais pesados empregando as técnicas analíticas tradicionais. Estes métodos de calibração multivariada permitem um estudo com várias espécies presentes simultaneamente, mesmo na existência de diferenças espectrais marcantes e na existência de alta correlação nos dados. Os métodos de calibração multivariada mais empregados em determinações simultâneas, por serem mais eficientes para lidar com ruídos experimentais e colinearidade, são PCR (regressão em componentes principais) e PLS (regressão por mínimos quadrados parciais) nas variantes PLS1, que utiliza um componente da mistura de cada vez e o PLS2, que utiliza todos os componentes simultaneamente.

Esta Tese visa verificar a possibilidade de se utilizar um optodo baseado no 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR, imobilizado sobre a resina XAD-4 na

determinação simultânea de metais pesados empregando métodos de calibração multivariada, como PCR e PLS. No caso do PLS usando as variantes PLS1 que constrói os modelos de calibração para cada componente da mistura separadamente e o PLS2 que constrói os modelos usando todos os componentes simultaneamente.

Os dois primeiros capítulos estão relacionados aos aspectos teóricos da Tese. No capítulo um faz-se um relato das principais características dos optodos descrevendo-se cada um dos seus componentes (fase sensora e fibra óptica). No capítulo dois mostra-se a utilização de vários métodos de calibração multivariada na determinação simultânea de metais pesados e faz-se uma breve descrição dos principais métodos de calibração multivariada (PCR, PLS1 e PLS2).

No capítulo três descreve-se a instrumentação utilizada na operação do optodo. Esta instrumentação é composta, basicamente, por uma lâmpada de filamento de tungstênio, chopper mecânico, monocromador, tubo fotomultiplicador, amplificador Lock-in e microcomputador. Ainda neste capítulo, relata-se o interfaceamento do amplificador lock-in ao microcomputador, que tem como objetivo realizar o controle e a aquisição dos dados. Este interfaceamento é realizado utilizando-se duas interfaces: uma paralela PCL-711S para a aquisição dos dados e uma serial RS 232C para controle do amplificador lock-in. O programa de controle e a aquisição dos dados foi escrito em Microsoft Visual Basic 3.0.

Descreve-se no capítulo quatro as etapas desenvolvidas na construção do optodo baseado na imobilização do PAR em resinas não iônicas, que são posteriormente fixadas na extremidade de um feixe bifurcado de fibras ópticas. No desenvolvimento deste optodo foram testados e avaliados os dois modos de operação de um optodo, ou seja, em batelada e em fluxo. Após a obtenção de curvas analíticas para vários íons de metais pesados realizou-se um estudo sobre a lixiviação do PAR, uma vez que o tempo de vida de um optodo depende da estabilidade do reagente indicador imobilizado no suporte sólido.

No capítulo cinco descreve-se a utilização do optodo de PAR imobilizado na resina XAD-4 operado em fluxo, usando a cela de fluxo em forma de "T", na determinação simultânea de metais pesados presentes em misturas binárias e ternárias, usando diferentes métodos de calibração multivariada (PCR, PLS1 e PLS2). Os modelos de calibração são construídos a partir dos espectros de reflectância difusa de um conjunto de misturas com concentração conhecida, chamado de conjunto de calibração. Após a construção dos modelos realiza-se a validação dos mesmos comparando-se os valores de concentração previstos pelos modelos de calibração com os valores verdadeiros de um conjunto de misturas com concentração conhecida, mas que não participa da construção dos modelos. Verificou-se, também, a influência das diferentes forma de preprocessamento e pré-tratamento dos dados na obtenção dos modelos de calibração. Estes métodos têm por finalidade minimizar ruídos experimentais e informações espectrais superpostas de espécies de interesse. Os métodos utilizados consistiram em centrar os dados espectrais na média, suavizar os dados espectrais com a utilização de um filtro de média móvel após os dados originais serem centrados na média e obter os espectros de primeira derivada, novamente, após os dados originais serem centrados na média. Concluiu-se que os melhores resultados obtidos na determinação simultânea de dois metais pesados foram conseguidos utilizando-se o método PLS1 com os dados centrados na média. Na determinação simultânea de três metais os melhores resultados foram obtidos utilizando-se os métodos PLS1 com os dados centrados na média.

Relata-se no capítulo seis a realização dos objetivos desta Tese com a construção do optodo de PAR/XAD-4 para a determinação de metais pesados. Verificou-se, ainda, que o referido optodo pode ser utilizado na determinação simultânea de dois metais (Ni(II) e Cd(II)) com erros próximos do limite da instrumentação e de três metais (Ni(II), Cd(II) e Mn(II) com erros maiores do que no caso de dois metais. Relata-se no capítulo seis algumas sugestões para trabalhos futuros que podem melhorar o desempenho do optodo descrito nesta Tese.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos o desenvolvimento de um sensor químico de fibras ópticas (optodo) baseado no reagente químico 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR, imobilizado em resinas não iônica (XAD-4/XAD-7) para a determinação de metais pesados. A montagem da instrumentação necessária para operar o optodo, além do interfaceamento do amplificador lock-in à um microcomputador para controle e aquisição dos dados espectrais. E por último, a utilização do optodo de PAR/XAD na determinação simultânea de metais pesados empregando os métodos de calibração multivariada, como PCR (regressão em componentes principais) e PLS (regressão por mínimos quadrados parciais), usando as variantes PLS1 e PLS2.

ÍNDICE

Lista de Tabelas xxiii

Lista de Figuras xxv

Capítulo 1

1- Introdução 01

1.1 – Sensores Químicos de Fibras Ópticas 04

1.1.1 – Fibras Ópticas 05

1.1.1.1 – Princípio de Funcionamento das Fibras Ópticas 06

1.1.1.2 – Abertura Numérica 08

1.1.1.3 – Atenuação 09

1.1.1.4 – Tipos de Fibras Ópticas 10

1.1.2 – Fase Sensora 11

1.1.2.1 – Imobilização do Reagente Químico 13

1.1.3 – Classificação dos Optodos 14

1.1.3.1 – Sensores Extrínsecos 14

1.1.3.2 – Sensores Intrínsecos 15

1.1.4 – Princípios Ópticos Usados nos Optodos 16

1.1.4.1 – Absorção 16

1.1.4.2 – Emissão 17

1.1.4.3 – Reflexão 18

1.1.5 – Instrumentação Usada nos Optodos 20

1.1.5.1 – Fonte de Luz 20

1.1.5.2 – Seletores de Comprimento de Onda 21

1.1.5.3 – Sistema de Detecção 21

Capítulo 2

2 – Métodos Empregados na Determinação Simultânea de Metais Pesados 23

2.1 – Métodos de Calibração Multivariada 30

2.1.1 – Análise por Componentes Principais 31

2.1.2 – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais..... 34
2.1.3 – Regressão por Componentes Principais..... 36

Capítulo 3

3 – Parte Experimental..... 38
3.1 – Reagentes e Soluções..... 38
3.2 – Procedimentos Analíticos..... 38
3.3 – Montagem da Instrumentação..... 39
3.3.1 – Interfaceamento do Amplificador Lock-in ao Microcomputador... 40
3.3.2– Calibração do Conversor A/D e do Monocromador..... 42
3.3.2.1 – Calibração do Conversor A/D..... 42
3.3.2.2 – Calibração do Monocromador..... 43
3.3.3 – Teste da Instrumentação..... 44

Capítulo 4

4 – Desenvolvimento de um Optodo para a Determinação de Metais Pesados 46
4.1 – Escolha do Reagente Complexante..... 46
4.1.1 – 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR..... 47
4.2 – Imobilização do Reagente Complexante..... 48
4.3 – Modos de Operação do Optodo..... 50
4.3.1 – Optodo Operado em Volume Fixo..... 51
4.3.1.1 – Avaliação do Procedimento de Imobilização do PAR..... 52
4.3.1.2 –Estudos sobre Imobilização do PAR na Resina XAD-4..... 55
4.3.1.3 – Determinação de Metais Pesados..... 58
4.3.1.4 – Curvas Analíticas de Ni(II), Cd(II) e Co(II)..... 60
4.3.2 – Optodo Operado em Fluxo Contínuo..... 64
4.3.2.1 – Determinação de Metais Pesados..... 65
4.3.3 – Optodo Operado em Fluxo com Cela em Forma de "T"..... 69
4.3.3.1 – Influência do Uso de Tampões Diferentes..... 72
4.3.3.2 – Estudo sobre a Lixiviação do PAR..... 75

4.3.3.3 – Determinação de Metais Pesados..... 77
4.3.3.4 – Curvas Analíticas para Ni(II),Cu(II),Mn(II) e Cd(II)..... 78

Capítulo 5

5 – Determinação Simultânea de Metais Pesados com o Optodo de PAR/XAD-4..... 81
5.1 – Determinação Simultânea de Ni(II) e Cd(II)..... 81
5.1.1 – Planejamento da Calibração..... 81
5.1.2 – Obtenção dos Espectros das Misturas de Calibração e Teste.... 83
5.1.3 – Construção dos Modelos de Calibração..... 84
5.1.3.1 – Organização dos Dados Espectrais..... 84
5.1.3.2 – Preprocessamento e Pré-Tratamento dos Dados..... 86
5.1.3.2.1 – Centrar os Dados na Média..... 86
5.1.3.2.2 – Escalanamento pela Variância..... 87
5.1.3.2.3 – Autoescalanamento..... 87
5.1.3.2.4 – Suavização e Remoção de Ruído Instrumental..... 87
5.1.3.2.5 – Espectros Primeira e Segunda Derivada..... 88
5.1.3.3 – Obtenção dos Modelos de Calibração..... 89
5.1.3.4 – Validação dos Modelos de Calibração..... 94
5.2 – Determinação Simultânea de Ni(II), Cd(II) e Mn(II)..... 99
5.2.1 – Validação dos Modelos de Calibração para Três Metais..... 102

Capítulo 6

6 – Conclusões e Perspectivas..... 106

Capítulo 7

7 – Referências Bibliográficas..... 108

LISTA DE TABELAS

1 – Curvas de calibração do A/D para as diferentes escalas do A/D..... 42

2 - Relação entre o comprimento de onda teórico e tempo de máxima reflectância para cada filtro óptico..... 44

3 - Curvas analíticas de Ni(II), Cd(II) e Co(II) 63

4 - Curvas analíticas de Ni(II), Cu(II), Mn(II) e Cd(II) 79

5 – Faixa de concentração de alguns optodos usados na determinação de metais pesados..... 79

6 - Valores das concentrações das misturas de calibração..... 82

7 - Valores das concentrações das Misturas Teste..... 82

8 - Números de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Ni(II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR..... 92

9 - Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Cd(II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR..... 92

10 - Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS1..... 95

11 - Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS2..... 95

12 - Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PCR..... 95

13 - Erros médios relativos nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste usando PLS1, PLS2 e PCR..... 98

14 - Composição das misturas de calibração..... 99

15 - Composição das misturas teste..... 100

16 - Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Ni(II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR..... 101

17 - Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Cd(II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR..... 101

18 - Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Mn(II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR..... 102

19 – Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS1..... 103

20 - Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS2..... 103

21 - Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PCR..... 103

22 – Erros médios relativos nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste usando os métodos PLS1, PLS2 e PCR..... 104

LISTAS DE FIGURAS

1 - Representação esquemática de funcionamento de um optodo extrínseco baseado em medidas de reflectância..... 05

2 - Representação esquemática da estrutura cilíndrica da fibra óptica..... 06

3 - Ilustração dos fenômenos de refração e reflexão da luz..... 07

4 - Representação da propagação da luz na fibra óptica..... 08

5 - Indicação do ângulo de aceitação e do cone de aceitação da fibra óptica..... 08

6 - Esquema de funcionamento de um sensor intrínseco..... 16

7 - Gráfico de dados num sistema bidimensional com as duas primeiras componentes..... 32

8 – Representação gráfica de um componente principal no caso de duas variáveis, sendo (A) os pesos e (B) os escores..... 33

9 – Representação geométrica do PLS com uma variável latente modelando os dados X e Y, sendo que (A) mostra a obtenção das componentes principais da matriz Y, (B) a obtenção das componentes da matriz X e (C) a relação entre os componentes de X e Y..... 35

10 - Instrumentação usada neste trabalho..... 40

11 - Espectros de reflectância dos filtros ópticos..... 43

12 - Espectros de reflectância difusa de uma folha de papel branco usando a instrumentação mostrada na figura 10 usando o feixe bifurcado de fibras ópticas sem a fase sensora 45

13 - Formas da dissociação ácido-base do PAR..... 47

14 - Estrutura dos complexos Metal-PAR na razão-molar (1:1)..... 48

15 - Estrutura da resina XAD-7..... 49

16 - Estrutura da resina XAD-4..... 49

17 - Curvas de respostas típicas do optodo operado em volume fixo de analito..... 50

18 - Curvas de respostas típicas do optodo operado em fluxo continuo de analito..... 51

19 - Optodo com PAR imobilizado na resina XAD-4 ou XAD-7..... 52

20 - Espectro de reflectância difusa do PAR/XAD-7 em pH 9,0 obtidos em intervalos de 3 minutos 54

21 - Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-4 em pH 9,0 obtidos em intervalos de 3 minutos 55

22- Espectros de reflectância do PAR/XAD-4 em pH 9,0 usando diferentes tempos de imobilização..... 56

23 - Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-4 imobilizado utilizando diferentes concentrações da solução de PAR em metanol (1%; 0,5%; 0,25%) e o espectro de reflectância do XAD-4..... 57

24 - Espectros de reflectância difusa PAR/XAD-4 em pH 9,0 obtidos após sucessivos procedimentos de regeneração 60

25 - Espectros de reflectância dos Complexos Ni-PAR/XAD-4 em pH 9,0 61

26 - Curvas analíticas de Ni(II), Cd(II) e Co(II)..... 62

27 - Valor da reflectância do PAR/XAD-4 após dez regenerações sucessivas..... 64

28 – Representação da cela de fluxo..... 65

29 - Curvas de saturação da fase sensora usando a solução de Ni(II)10 mg/L..... 67

30 - Representação esquemática do sistema FIA..... 69

31 - Cela de fluxo em forma de "T"..... 70

32 - Valores de reflectância difusa do PAR no tampão pH 9,0 após oito regenerações sucessivas..... 71

33 - Valores de reflectância difusa do Metal-PAR/XAD-4 no tampão borato..... 73

34 - Valores de reflectância difusa do Metal-PAR/XAD-4 no tampão amônia-cloreto de amônio..... 73

35 - Valores de reflectância difusa do Metal-PAR/XAD-4 no tampão universal..... 74

36 - Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 após diferentes números de regenerações..... 76

37 - Valores de reflectância difusa do PAR/XAD-4 (λ = 550 nm) no tampão universal pH 9,0 em diferentes números de regenerações da fase sensora 77

38 - Curvas analíticas de Ni(II), Cu(II), Mn(II) e Cd(II)..... 78

39 - Representação matricial dos dados espectrais..... 86

40a - Gráfico de RMSEP x componentes principais do modelo PLS1 para Ni(II) 91

40b – Gráfico de RMSEP x componentes principais do modelo PLS1 para Cd(II) 92

41 - Comparação dos valores de concentração de Ni(II) previstos pelos modelos PLS1 (A), PLS2 (B) e PCR (C) com os valores verdadeiros do conjunto teste..... 96

42 – Comparação dos valores de concentração de Cd(II) previstos pelos modelos PLS1 (A), PLS2 (B) e PCR (C) com os valores verdadeiros do conjunto teste..... 97

1 – INTRODUÇÃO

A determinação de metais pesados é freqüentemente realizada empregando-se técnicas de espectrometria atômica[1,2], tais como espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão ótica em plasma acoplado indutivamente (ICP OES)[3] e a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) pois são técnicas bastante sensíveis e seletivas, que proporcionam bons limites de detecção e ampla faixa linear[4]. Porém, estas técnicas têm como principais desvantagens o alto custo e o fato de requererem instalações especiais para o seu funcionamento. O limite de detecção destas técnicas pode ainda ser melhorado realizando-se procedimentos de pré-concentração empregando reagentes químicos complexantes imobilizados em resinas poliméricas[5]. Estes métodos de pré-concentração tem uma vantagem com relação aos tradicionais de extração líquido/líquido, uma vez que permitem a redução drástica na quantidade de solventes orgânicos empregada.

Outra técnica analítica muito utilizada na determinação de metais pesados é espectrofotometria de absorção no UV/visível. Suas principais características são a rapidez e a simplicidade no planejamento dos experimentos, possibilitando que seja empregada na determinação de um grande número de espécies analíticas, fazendo uso de um grande número de reagentes complexantes[6].

A combinação da espectrofotometria com métodos de pré-concentração baseados em reagentes imobilizados em suportes sólidos tem aumentado a sensibilidade e a seletividade das técnicas espectrofotométricas tradicionais devido às diferentes razões de reação/retenção dos íons estudados sobre o suporte sólido contendo o reagente. Esta técnica analítica tem sido chamada de espectrofotometria em fase sólida[7] (EFS), que associada aos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) permite baixar limites de detecção

e utilizar quantidades menores de reagentes e amostras devido a facilidade de mecanização/automação destes sistemas[8]. A principal desvantagem da EFS é o espalhamento da radiação na cela que contém a fase sólida, pois aumenta significativamente os desvios padrão das medidas, assim como a perda de radiação. Entretanto, essa limitação vem sendo superada pelo emprego de lentes para a dispersão da radiação incidente ou pelo posicionamento da cela próximo à entrada do sistema de detecção.

A determinação de metais pesados também pode ser realizada com o auxílio de sensores químicos, que são dispositivos que geram um sinal óptico, elétrico ou térmico como conseqüência de sua interação com a espécie de interesse. Dentre os vários tipos de sensores químicos existentes, os mais empregados nas determinações de metais são os eletroquímicos e os de fibras ópticas.

Dentro da classe dos sensores eletroquímicos, podem ser citados os sensores potenciométricos[9-15]. Estes sensores, quando usados em determinações de metais, contém uma fase sensora que é geralmente uma membrana íon-seletiva que incorpora um reagente seletivo à espécie de interesse. Este sensores são chamados de eletrodos íon-seletivo (EIS) e apresentam algumas vantagens importantes como precisão, baixo custo, possibilidade de determinação seletiva de várias espécies. Estes eletrodos tem o princípio de funcionamento baseado na equação de Nernst, a qual fornece a relação fundamental envolvendo a diferença de potencial entre os eletrodos indicador e de referência e a atividade da espécie responsável pela resposta.

Outra classe de sensores químicos que têm sido empregados na determinação quantitativa de metais pesados são os sensores químicos de fibras ópticas[16-22], também chamados de optodos ou optrodos. Estes sensores químicos não requerem um sensor de referência em contraste com os sensores potenciométricos, onde a diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência é medida. Outra vantagem importante deste tipo de sensor químico é a possibilidade de realizar monitoramento *in situ* remotamente, devido a propriedade

que as fibras ópticas possuem de transmitir a luz a longas distâncias sem grandes atenuações. Os sensores químicos de fibras ópticas são, por sua natureza, isolados eletricamente, sendo este fato importante para sensores de uso medicinais *in vivo* e em áreas onde reagentes inflamáveis e explosivos estão presentes.

Os sensores químicos de fibras ópticas apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, a interferência da luz ambiente, que pode ser solucionada empregando-se uma fonte de luz modulada. O tempo de resposta pode ser elevado devido transferência de massa entre a fase sensora e a solução.

A maioria dos sensores químicos de fibras ópticas desenvolvidos para a determinação de íons de metais pesados são baseados em reagentes complexantes imobilizados em suportes sólidos e posteriormente fixados na extremidade de fibras ópticas[23-32]. Estes reagentes imobilizados sofrem alteração em sua coloração ou propriedade óptica na presença do íon do metal pesado. Oehme et al.[33]., recentemente, publicaram um artigo de revisão onde enumeram vários sensores químicos de fibras ópticas desenvolvidos para diversos metais pesados empregando diferentes reagentes complexantes e diferentes métodos de imobilização.

A maior dificuldade no desenvolvimento deste tipo de sensor químico é obter um suporte adequado para realizar a imobilização do reagente, pois o suporte tem que produzir uma ligação com o reagente complexante que não impeça a reação do reagente com o analito e que dificulte a lixiviação do reagente. A intensidade da lixiviação está relacionada ao método e ao processo de imobilização do reagente no suporte sólido, sendo que quanto maior for a força da ligação do reagente com o suporte menor será a lixiviação deste reagente durante a utilização do sensor. A lixiviação é um fator muito importante na avaliação do optodo, pois estabelece o tempo de vida útil do sensor.

1.1- Sensores Químicos de Fibras Ópticas (Optodos)

Os sensores químicos de fibras ópticas combinam os tradicionais métodos ópticos de análise química com fibras ópticas de alta qualidade, desenvolvidas para a indústria de comunicação. Estes sensores tem atraído muito o interesse de pesquisadores, sendo muito utilizados em várias áreas incluindo aplicações biomédicas[34-38], industriais[39-44], monitoramento ambiental[45-46], metais[47-51], ânions[52-55], gases[56-61], pH[62-64].

O componente principal deste tipo de sensor é a chamada de fase sensora ou fase reagente. Esta fase sensora é formada por um reagente químico, que sofre uma mudança em sua coloração ou propriedade óptica na presença da espécie química de interesse, sendo imobilizado no próprio corpo da fibra óptica ou em um suporte sólido, que é posteriormente fixado na extremidade da fibra óptica.

A concepção de funcionamento dos optodos está baseada na interação da luz com as espécies químicas, pois quando a luz colide com estas espécies, uma variedade de interações pode ocorrer entre os fótons da radiação eletromagnética e os átomos e moléculas. Estas interações envolvem troca de energia que podem se dirigir para absorção, emissão e reflexão da luz. A quantificação desta energia transferida promove informações acerca da composição do sistema e tem sido explorada nos optodos.

Na Figura 1 é mostrado o caminho percorrido pela luz antes e após incidir na fase sensora, onde pode ser notado que a luz emitida por um fonte adequada é conduzida pela fibra óptica até a fase sensora. Na fase sensora, a radiação eletromagnética interage com as espécies químicas e por causa disto sofre uma modificação em sua propriedade. Esta luz modificada é, então, coletada pela mesma ou por uma outra fibra óptica e conduzida para o sistema de detecção.

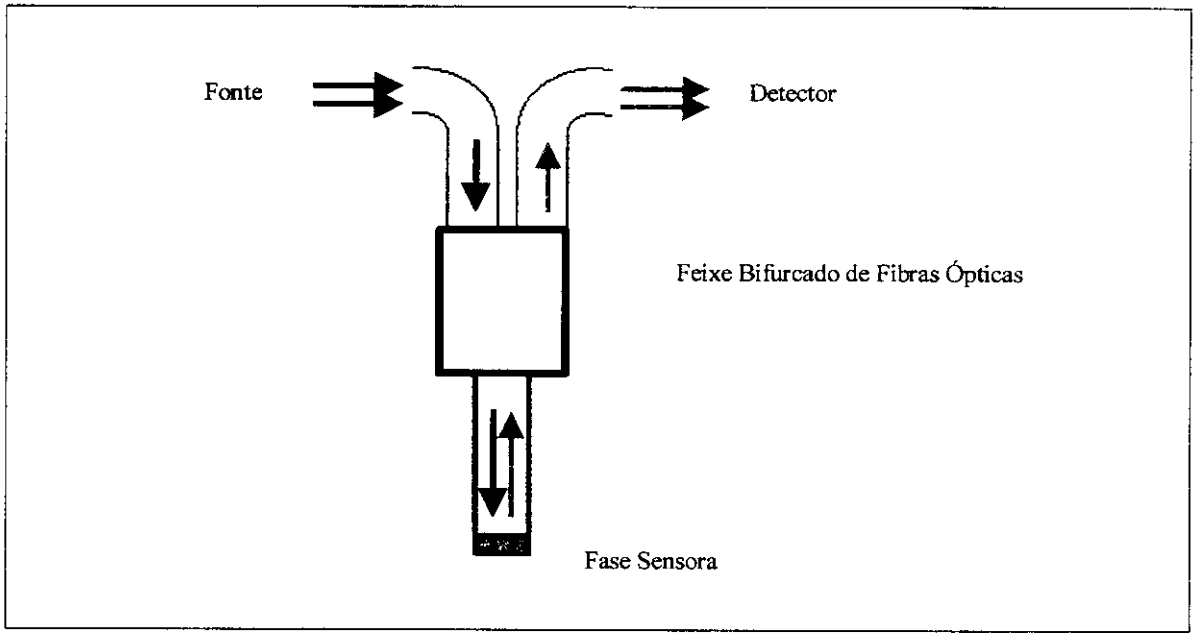


Figura 1: Representação esquemática de funcionamento de um optodo extrínseco baseado em medidas de reflectância

1.1.1 - Fibras Ópticas

A fibra óptica[65-69] é composta por materiais dielétricos, ou seja, materiais que não conduzem eletricidade, como a sílica e plástico, por exemplo. Estes materiais são dispostos segundo uma longa estrutura cilíndrica, transparente, flexível, de dimensões microscópicas comparáveis às de um fio de cabelo humano.

Na Figura 2, é mostrada a estrutura cilíndrica de uma fibra óptica e observa-se que a estrutura cilíndrica é composta por uma região central, chamada de núcleo, constituída por um material dielétrico com índice de refração, η_1. Esta região central é envolta por uma camada, chamada de casca, constituída por um material dielétrico com índice de refração, η_2, que é ligeiramente inferior ao do material usado no núcleo. Este fato é condição necessária para que a luz possa se propagar pela fibra óptica.

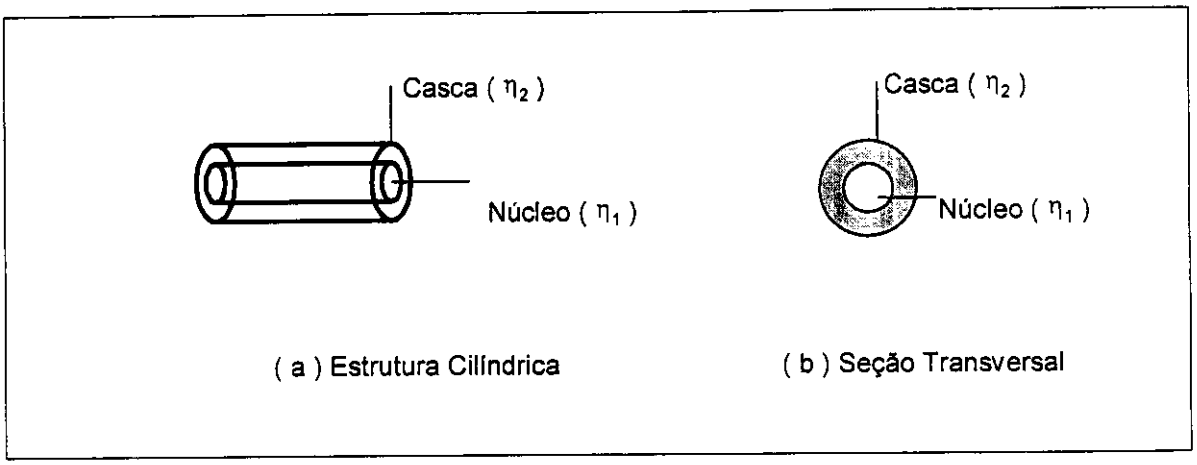


Figura 2: Representação esquemática da estrutura cilíndrica da fibra óptica.

As fibras ópticas são, usualmente, comercializadas na forma de cabos, que podem conter várias fibras. O número de fibras ópticas varia dependendo da aplicação a que é destinada a fibra óptica. Estes agrupamentos de fibras ópticas formam feixes que são, geralmente, protegidos por duas capas: uma capa interna de silicone e uma mais externa de policarbonato. A camada de silicone tem a função de proteger a fibra óptica dos efeitos decorrentes do coeficiente de expansão térmica do policarbonato, cuja função é fornecer proteção mecânica à fibra óptica.

As características mecânicas das fibras ópticas, que são avaliadas em termos de resistência e flexibilidade, dependem do material utilizado e da qualidade dos processos de fabricação.

1.1.1.1 – Princípio de Funcionamento das Fibras Ópticas

O princípio físico de funcionamento das fibras ópticas é baseado no fenômeno de reflexão interna total, que pode ser explicado da seguinte forma: quando um raio de luz passa de um meio com índice de refração (η_1) para um meio com índice de refração (η_2), o raio se afasta da normal, ou seja, sofre

refração como pode ser visto na Figura 3a. À medida em que o ângulo de incidência θ_1 aumenta, o ângulo do raio refratado θ_r se aproxima de 90°. O ângulo de incidência que produz um ângulo de θ_r igual a 90° é de denominado de ângulo crítico, θ_c, mostrado na Figura 3b. Todos o raios de luz incidentes com um ângulo maior que o ângulo crítico serão refletidos de volta para o meio η_1. Considerando um fibra óptica, onde o núcleo (η_1) está recoberto totalmente pela casca (η_2), os raios sofrerão sucessivas reflexões entre os dois meios dando origem ao fenômeno de propagação da luz através do núcleo fibra óptica. O ângulo crítico pode ser deduzido a partir da lei de Snell, mostrada na equação (I).

$$n_1 \text{sen}\theta_c = n_2 \text{sen}\theta_r \qquad (I)$$

pode-se notar que o θ_c depende apenas do índice de refração dos meios de propagação, já que o sen 90° = 1,0 e a equação (I) passa a ser escrito conforme a equação (II).

$$\text{sen}\,\theta_c = n_2/n_1 \qquad (II)$$

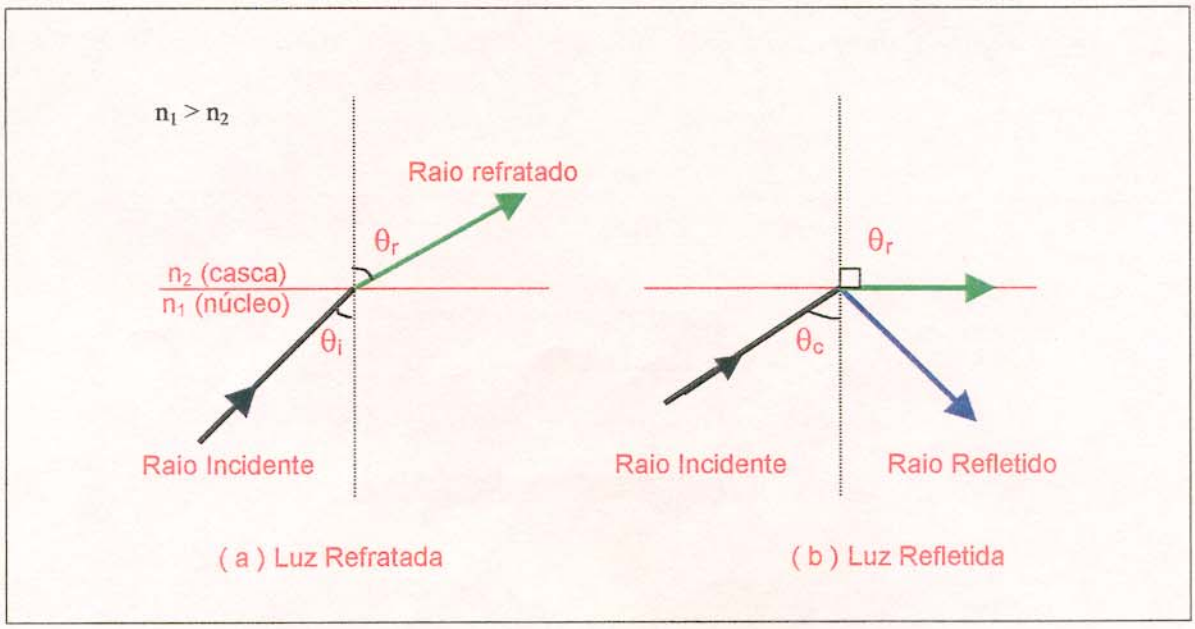


Figura 3: Ilustração dos fenômenos de refração e reflexão da luz.

A luz propaga-se pela fibra óptica por meio de reflexões totais sucessivas na interface núcleo/casca como pode ser visto na Figura 4.

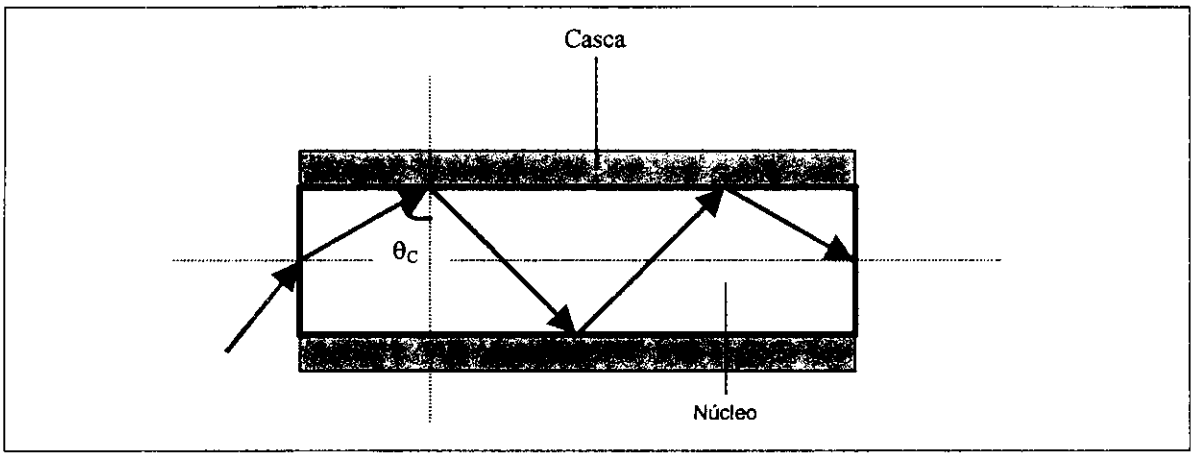


Figura 4: Representação da propagação da luz na fibra óptica.

1.1.1.2 – Abertura Numérica

A abertura número (AN) é um importante parâmetro das fibras ópticas e é utilizado para avaliar a capacidade de captação e transmissão de um raio de luz. A Figura 5 mostra o ângulo de aceitação, θ_a, e o cone de aceitação de uma fibra óptica.

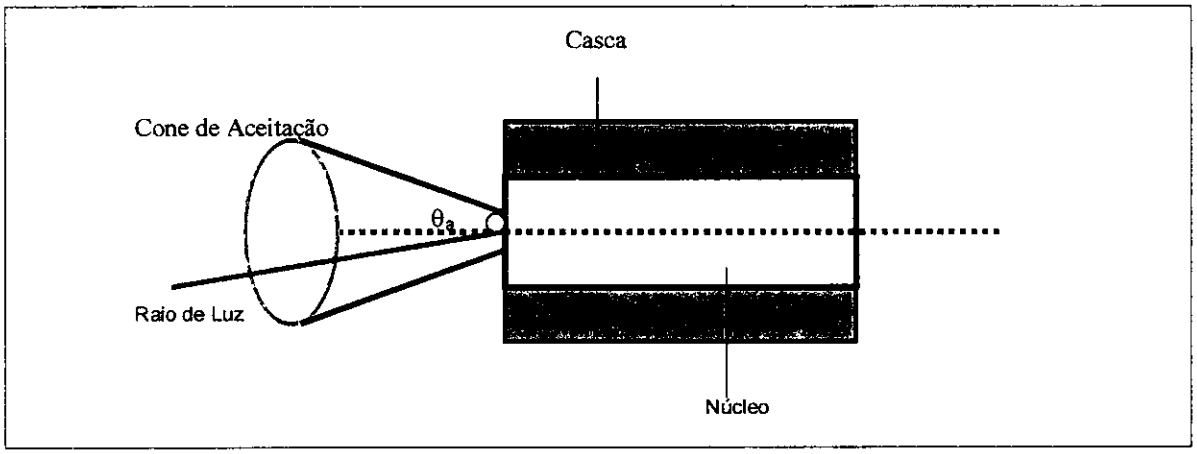


Figura 5: Indicação do ângulo de aceitação e do cone de aceitação da fibra óptica.

Para que um raio de luz possa ser transmitido pela fibra óptica é necessário que atinja o eixo central da fibra óptica com um ângulo menor que o ângulo de aceitação, portanto dentro do cone de aceitação mostrado na Figura 5. Desta forma, este raio atende as condições necessárias para se processar o fenômeno de reflexão interna total e, consequentemente, haver a propagação do raio de luz pela fibra óptica.

A abertura numérica de uma fibra óptica depende do ângulo de aceitação,θ_a, e do índice de refração do meio onde a fibra óptica se encontra, conforme equação (III).

$$\mathbf{sen\ \theta_a = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2}/n_0} \qquad (III)$$

Combinando-se a equação (III) com a definição da abertura numérica, dada pela equação (IV), e sabendo-se que o índice de refração do ar, que é o meio mais comum de se colocar a fibra óptica, pode-se determinar a abertura numérica de uma fibra óptica sabendo-se apenas o índice de refração da casca e do núcleo da fibra óptica, conforme pode-se visualizar pela equação (V).

$$\mathbf{A.\ N.= = n_0 sen\theta_a} \qquad (IV)$$

$$\mathbf{A.N. = n_1^2 - n_2^2} \qquad (V)$$

1.1.1.3 - Atenuação

A atenuação (A) indica a perda de potência óptica do raio de luz durante sua transmissão pela fibra óptica. A atenuação é expressa, usualmente, em unidades de decibéis (dB) por quilômetro ou metro. Quanto menor for o valor da atenuação melhor será a qualidade da fibra óptica. O valor da atenuação é dependente do comprimento de onda da luz transmitida, conforme pode ser visto na equação (VI). Esta equação define a atenuação em função da potência óptica de entrada (Pe) e de saída (Ps) da luz e L é o comprimento da fibra óptica.

$$A = (10/L)\log(Ps/Pe) \qquad (VI)$$

A atenuação é resultado da dispersão dos raios de luz transmitidos pela fibra óptica e depende do material empregado na fabricação das fibras ópticas. As principais causas de atenuações são: absorção e espalhamento de luz, deformações mecânicas, conhecidas como microcurvaturas ou macrocurvaturas, que ocorrem ao longo da fibra óptica devido a aplicação de esforços sobre a mesma durante a sua confecção ou sua instalação.

1.1.1.4 – Tipos de Fibras Ópticas

As fibras ópticas podem ser classificadas por três critérios: material utilizado na sua fabricação, modo de propagação da luz e perfil dos índices de refração.

Pelo critério de material utilizado na fabricação, as fibras ópticas podem ser classificadas como: de plástico, de vidro e com núcleo líquido. As fibras de plástico são compostas por núcleo e a casca de plástico, sendo fabricadas com plásticos transparentes, como polimetilmetacrilato e poliestireno, por exemplo. Este tipo de fibra óptica é caracterizada por sua grande flexibilidade mecânica e baixo custo e apresentam dimensões relativamente grandes com diâmetros do núcleo variando de 100 a 1000 μm e casca com diâmetro não maior que 10% do núcleo, sendo as mais utilizadas na construção dos sensores químicos de fibras ópticas, apesar de terem como desvantagem altas perdas de transmissão na faixa da radiação visível, limitando consideravelmente a distância de transmissão da luz.

As fibra ópticas de vidro são constituídas por núcleo e casca de vidro, que são fabricadas com materiais ultrapuros podendo ser adicionadas impurezas para ser atingido o índice de refração desejado ou com núcleo de vidro

e casca de plástico. Estas fibras ópticas apresentam um bom desempenho na transmissão de luz, porém menor se comparado com as fibras totalmente de vidro.

A fibras com núcleo líquido têm a vantagem de possuírem um alto desempenho na transmissão da luz se comparadas com os outros tipos de fibras, porém têm a desvantagem de apresentarem baixa tolerância às variações de temperatura e de apresentarem grande fragilidade.

Com relação aos perfis dos índices de refração as fibras ópticas são classificadas em índice degrau e índice gradual. As fibras ópticas tipo índice degrau foram pioneiras em termos de aplicações práticas. Este tipo de fibra óptica caracteriza-se, essencialmente, por variação abrupta do índice de refração do núcleo com relação à casca. As fibras ópticas do tipo índice gradual são de fabricação mais complexa, caracterizam-se pela sua maior capacidade de transmissão da luz em relação às fibras com índice degrau. Estas fibras apresentam uma variação gradual de índice de refração do núcleo com relação à casca. O núcleo destas fibras ópticas não é homogêneo e apresenta uma sucessão de finas camadas superpostas, cuja composição, em geral de sílica dopada, muda gradualmente à medida que a camada se afasta do eixo central da fibra óptica.

Quanto ao modo de propagação da luz as fibras ópticas podem ser classificadas em monomodo e multimodo. As fibras momomodo são aquelas que apresentam um único modo de propagação da luz e são constituídas por um núcleo com diâmetro muito pequeno, tipicamente entre 5 e 50 μm e casca com diâmentro grande para proteção mecânica ao núcleo da fibra. As fibras multimodo são aquelas que possuem vários modos de propagação e apresentam núcleos com dimensões maiores que as monomodo.

1.1.2- Fase Sensora

Algumas espécies químicas de interesse analítico não absorvem ou emitem luz na região do visível (400 a 700 nm) e, por estas razões, não podem

ser medidas diretamente por métodos ópticos. Contudo, estas espécies podem ser medidas indiretamente por meio de um sistema de transdução química. Nos optodos este sistema de transdução é composto por um reagente químico, que absorve ou emite luz na região do visível, imobilizado no corpo da fibra óptica ou em suporte sólido, que é posteriormente fixado na extremidade da fibra óptica[33]. O princípio do sistema de transdução é simples, o analito ao interagir com a fase sensora promove uma modificação na intensidade ou na coloração da luz absorvida ou emitida pela fase sensora e esta modificação é proporcional à concentração do analito.

Os reagentes utilizados na construção da fase sensora de um optodo são, geralmente, os mesmos reagentes utilizados em determinações espectrofotométricas, com exceção daqueles que apresentam baixa fotoestabilidade; baixa absortividade molar e bandas de absorção em comprimentos de ondas desfavoráveis.

Os optodos construídos com reagentes cromogênicos baseiam-se, na sua maioria, em reações reversíveis entre o reagente (R) e a analito (A), com a formação do correspondente complexo colorido (RA), conforme equação (VII).

$$R + A \rightleftharpoons RA \qquad (VII)$$

A princípio estas reações são reversíveis e isto é altamente desejável para monitoramento contínuo. Na prática, contudo, as reações são irreversíveis isto porque a constante de estabilidade dos complexos formados está freqüentemente fora da faixa de interesse. A faixa que os optodos funcionam reversivelmente é (log $K_s \pm 1$). Outro problema em termos de reversibilidade é a lentidão da reação inversa, pois muitos complexantes ligam-se rapidamente com o analito, porém liberam este analito de forma muito lenta. As fases sensores irreversíveis podem, na maioria dos casos, serem regeneradas com a utilização de algum reagente, como por exemplo, ácidos diluídos (pH ~ 1-2). Esta operação consiste em mergulhar ou passar pela fase sensora este reagente para romper a

ligação do analito com o reagente imobilizado e, assim, permitir a utilização da fase sensora em uma nova determinação.

1.1.2.1- Imobilização do Reagente Químico

O reagente químico usado na construção de uma fase sensora pode ser imobilizado no próprio corpo da fibra óptica ou em um suporte sólido. A grande maioria dos optodos desenvolvidos para a determinação de metais pesados utiliza reagentes químicos imobilizados em suportes sólidos, que são, posteriormente, fixados na extremidade de fibras ópticas devido a maior facilidade de preparo deste tipo de fase sensora e por facilitar a troca da fase sensora em aplicações que exijam essa operação.

A escolha do suporte sólido adequado é uma das etapas mais difíceis do processo de imobilização de um reagente químico, pois o suporte tem que promover uma imobilização eficiente do reagente evitando o seu desprendimento com facilidade, porém ele não pode impedir sua reação com o analito para haver a formação do complexo (RA). Vários tipos de suportes[70-91] podem ser usados na imobilização de reagentes, incluindo materiais poliméricos hidrofóbicos, vidros porosos e derivados de celulose.

Existem vários métodos para promover a imobilização do reagente no suporte sólido[92-93]. Estes métodos podem ser físicos, como o encapsulamento, a adsorção física e a atração eletrostática, ou métodos químicos, como a ligação covalente.

No encapsulamento, as moléculas do reagente são presas dentro dos poros da estrutura de um polímero, como por exemplo a poliacrilamida, ou de um filme polimérico , como por exemplo o PVC. Este método tem como vantagem o fato de que as moléculas do reagente não precisam interagir física ou quimicamente com o suporte e, deste modo, o reagente fica ocluso no suporte, permitindo que os grupos complexantes do reagente permaneçam livres para interagir com o analito.

Na atração eletrostática o reagente é depositado na superfície de um suporte sólido e este processo envolve a formação de pares iônicos entre o reagente carregado e os centros iônicos de um suporte sólido, que é, usualmente, uma resina de troca iônica.

A adsorção física é um processo de imobilização do reagente na superfície do suporte sólido como no caso da atração eletrostática. Entretanto, neste caso, as moléculas do reagente ligam-se à superfície do suporte por meio de ligações mais fracas como as forças de Van der Walls. O método de adsorção física é, provavelmente, o mais simples e um dos mais rápidos, pois todo o processo, na maioria das aplicações, pode ser completado dentro de uma hora, à temperatura ambiente. Contudo, a natureza física da imobilização faz com que o reagente se ligue fracamente à superfície do suporte e com isso ele pode ser mais facilmente removido num processo chamado de lixiviação.

A imobilização por método químico é baseado na formação de ligações covalentes entre as moléculas do reagente e uma forma ativada ou funcionalizada de um suporte sólido polimérico. Existem vários materiais poliméricos adequados para este tipo de imobilização e os mais utilizados são os derivados de celulose. Em princípio, este é o método mais eficiente, ou seja, é o método que apresenta a maior dificuldade de desprendimento do reagente químico, porém, na maioria das vezes este método exige várias etapas de preparação.

1.1.3 - Classificação dos Optodos

1.1.3.1 - Sensores Extrínsecos

Neste tipo de sensor, que é o mais comum, a fase sensora é construída imobilizando-se o reagente em um suporte sólido, que é posteriormente fixado na extremidade da fibra óptica. Neste caso, a fibra óptica serve

simplesmente para conduzir a luz da fonte até a fase sensora e desta para o sistema de detecção. Não há a necessidade de haver um contato direto entre o reagente imobilizado e a fibra óptica. Esta característica é importante em aplicações que necessitam de uma troca freqüente da fase sensora.

Os sensores extrínsecos podem ser construídos utilizando basicamente três diferentes tipos de arranjo. No primeiro tipo de arranjo temos uma única fibra óptica, que é responsável pela condução da luz da fonte até a fase sensora e desta para o sistema de detecção, sendo que a separação da luz é feita com o auxílio de um divisor de feixe. No segundo tipo de arranjo utiliza-se um feixe bifurcado de fibras ópticas, cuja extremidade comum contém as fibras ópticas dos dois braços distribuídas de forma aleatória para permitir que cada parte do feixe bifurcado cubra toda a fase sensora e não haja regiões preferenciais. Este tipo de arranjo permite que a luz conduzida da fonte até a fase sensora e a conduzida da fase sensora até o sistema de detecção viajem ao longo de fibras ópticas diferentes. No terceiro tipo de arranjo usa-se dois cabos de fibras ópticas independentes, um para conduzir a luz da fonte até a fase sensora e outro para conduzir a luz da fase sensora ao sistema de detecção. Na construção deste tipo de arranjo é necessária que se leve em consideração os seguintes fatores: a distância entre a fase sensora e os cabos de fibras ópticas, ângulo formado pelos cabos de fibras ópticas e a abertura numérica da fibra óptica. Estes fatores são importantes, pois eles vão determinar a sobreposição dos cones de aceitação dos dois cabos de fibra ópticas e, assim, permitir a transmissão da luz pela fibra óptica após sua interação com a fase sensora.

1.1.3.2 - Sensores Intrínsecos

Nos sensores intrínsecos a fase sensora é construída imobilizando-se o reagente no próprio corpo da fibra óptica, retirando-se a casca. O princípio usado neste tipo de sensor é que o reagente imobilizado na casca da fibra óptica provoca um modificação na propriedade de transmissão da luz e esta alteração é proporcional à concentração do analito. Portanto, neste tipo de sensor as fibras

ópticas funcionam como elemento ativo do sensor, pois o reagente químico imobilizado na fibra óptica ao interagir com a espécie de interesse analítico, afeta as características da luz transmitida. Outra característica deste tipo de sensor é a necessidade de haver um contato direto da fibra óptica com a amostra. Este fato pode ser observado na Figura 6, que mostra o esquema de funcionamento de um sensor intrínseco.

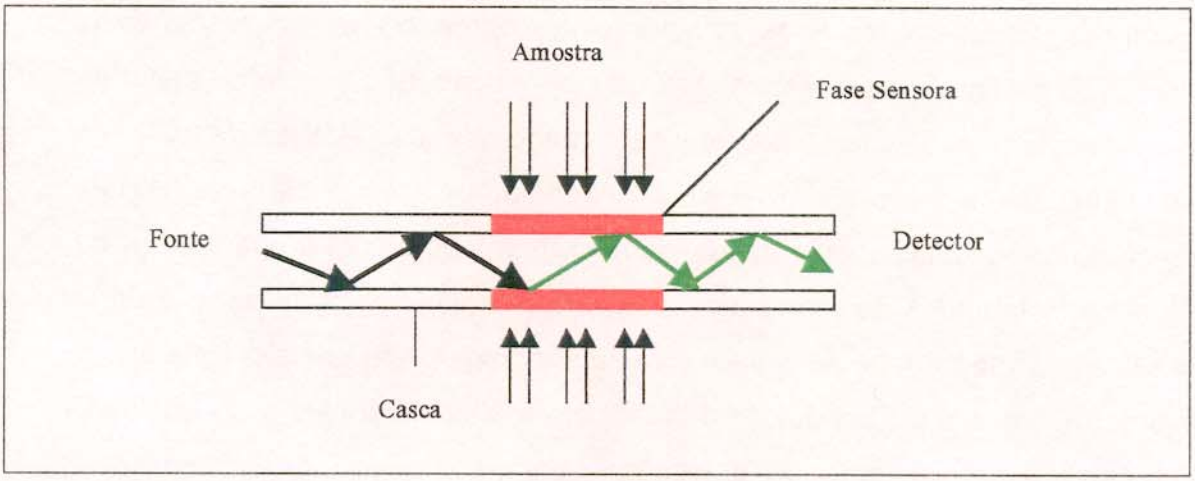


Figura 6: Esquema de funcionamento de um sensor intrínseco.

1.1.4- Princípios Ópticos Usados nos Optodos

Os optodos são baseados na interação da luz com a fase sensora. Para que esta interação seja monitorada, utiliza-se algumas técnicas ópticas, como absorção[94-96], emissão[97-100] e reflexão[101-104].

1.1.4.1- Absorção

Quando um raio de luz atravessa uma amostra ocorre absorção de energia. A energia absorvida provoca uma diminuição da intensidade da radiação incidente que passa pela amostra. O decréscimo na intensidade da radiação é determinada pelo número de espécies absorventes presentes na trajetória da luz, ou seja, pela concentração, C, das espécies absorventes conforme pode ser observado pela equação de Lambert-Beer (VIII).

$$A = \text{Log } I_o/I = \epsilon.b.C \qquad (VIII)$$

Onde A - é a absorbância

I_o - intensidade do raio incidente

I - a intensidade do raio emergente

b – caminho óptico

ϵ – coeficiente de absortividade molar, característico da espécie analisada a um dado comprimento de onda

C – concentração da espécie

1.1.4.2– Emissão

Um raio de luz com comprimento de onda característico para uma espécie (λ_e) é absorvido pelos átomos ou moléculas desta espécie originando a promoção de elétrons de seus níveis de energia fundamentais para níveis de maior energia, chamados de estado excitado. O tempo de vida destas espécies excitadas é pequeno e quando estas espécies retornam ao seus estados fundamentais, liberam energia com um comprimento de onda também característico (λ_{em}). A intensidade da luz emitida está relacionada com a concentração da espécie presente na amostra conforme a equação de Parker (IX).

$$I_{(\lambda em)} = \kappa(\lambda)\, I_{(\lambda ex)}\, \phi_{(\lambda ex)}\, \varepsilon_{(\lambda ex)}\, L\, C \qquad (IX)$$

Onde $I_{(\lambda ex)}$ – intensidade da radiação de excitação

$\phi_{(\lambda ex)}$ – eficiência quântica no comprimento de onda de excitação

$\kappa(\lambda)$ – representa as variações da instrumentação que influenciam nas intensidade emitidas

$E_{(\lambda ex)}$ – coeficiente de absorção molar no comprimento de onda de excitação

L – comprimento do caminho óptico efetivo

Esta equação, quando as condições instrumentais são mantidas constantes, pode ser simplificada como descrito na equação (X).

$$I(\lambda_{em}) = K.C \qquad (X)$$

Onde $K = \kappa(\lambda)I_{(\lambda ex)}\phi_{(\lambda ex)}E_{(\lambda ex)}L$

1.1.4.3– Reflexão

A reflexão é a devolução da radiação eletromagnética por uma superfície, sem a modificação da freqüência dos componentes monocromáticos dos quais a radiação é composta. Existem dois tipos de reflexão, a regular ou especular e a difusa.

A reflexão especular ocorre a partir de superfícies polidas, cujas irregularidades são pequenas comparadas ao comprimento de onda da luz refletida. Neste tipo de reflexão, a ângulo entre o raio refletido e a perpendicular à superfície é igual ao ângulo entre o raio incidente e a perpendicular.

Por sua vez, a reflexão difusa ocorre em superfícies opacas ou rugosas, cujas irregularidades são grandes comparadas ao comprimento de onda da luz incidente, ou em sistemas contendo pequenas partículas refletoras, onde cada partícula poderá agir como um refletor regular em separado, porém como a superfícies das partículas estão em diferentes planos, estas refletem a luz sob diversos ângulos, sendo este um fenômeno de espalhamento múltiplo.

A reflexão difusa ocorre a partir da penetração de uma porção da radiação incidente dentro do interior da amostra, seguindo-se absorção parcial e espalhamento múltiplo nas vizinhanças das partículas individuais das quais a amostra é formada.

A porção da radiação que retorna à superfície por espalhamento múltiplo, emerge como reflexão difusa. A natureza dessa radiação depende da natureza do feixe incidente tanto quanto das propriedades ópticas das partículas do meio em consideração.

Vários modelos teóricos têm sido propostos para relacionar a reflectância difusa com a concentração do analito, dentre os quais pode ser destacado o de Kubelka-Munk[105-107]. O modelo de Kubelka-Munk é algumas vezes chamado de a Lei de Lambert-Beer da espectrocoscopia de reflectância. A função de Kubelka-Munk, F(R), é dada pela equação (XI):

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{\epsilon.C}{S} \qquad (XI)$$

Onde R – reflectância difusa

C – concentração

ϵ – coeficiente de absortividade

S – coeficiente de espalhamento

Existem muitos modelos empíricos utilizados para o tratamento da reflectância difusa, devido à dificuldade experimental de relacionar as medidas feitas pelo optodo com um padrão de reflectância absoluta. Os principais procedimentos empíricos consistem em se calcular a reflectância normalizada ou a reflectância relativa.

A reflectância normalizada, R_N, é definida pela equação (XII):

$$R_N = \frac{R_i - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \qquad (XII)$$

Onde R_i é a reflectância da i-ésima medida, $R_{máx}$ é o valor máximo de reflectância encontrado em um conjunto de medidas e R_{min} é o valor mínimo de reflectância encontrado no mesmo conjunto de medidas.

A reflectância relativa é o sinal analítico obtido como a diferença (em unidades arbitrárias) entre a reflectância produzida pela espécie que se quer determinar e aquela do composto antes da reação. A reflectância relativa também se refere à diferença entre a reflectância produzida pela espécie que se quer determinar e aquela devido ao suporte isoladamente.

1.1.5 - Instrumentação Usada nos Optodos

A instrumentação requerida para operar um sensor químico de fibras ópticas é constituída de componentes elétricos e ópticos. Isto compreende basicamente uma fonte de luz, seletor de comprimento de onda, um sistema de detecção e uma unidade de processamento de sinal.

1.1.5.1- Fonte de Luz

As fontes de luz geralmente empregadas são lâmpadas incandescentes de tungstênio, tungstênio-halogênio, quartzo-halogênio e lâmpadas de xenônio. Estas fontes emitem um amplo espectro de radiação óptica e são usadas como fontes de luz visível e ultravioleta. Elas requerem um fornecimento estável de alta potência elétrica. Podem também ser usados como fontes de luz, os LEDs (diodos emissores de luz) e LDs (laser diodos) que oferecem várias vantagens sobre as fontes convencionais como baixo consumo, alta estabilidade, pequeno tamanho. Eles, também, eliminam a necessidade de monocromadores (seletores de comprimento de onda). Vários tipos de LDs e LEDs estão disponíveis oferecendo uma faixa de comprimentos de onda que vai do ultravioleta a regiões do infravermelho próximo. Os LDs requerem uma fonte elétrica mais estável que os LEDs, além de serem mais caros. Uma vantagem dos LDs é sua capacidade de produzir um raio de luz intenso e coerente (banda espectral menor que 5 nm). LEDs são dispositivos semicondutores baratos que produzem radiação não coerente com uma banda espectral de 20-80 nm.

1.1.5.2 - Seletores de Comprimento de Onda

O isolamento do comprimento de onda pode ser efetuado por filtros ópticos ou monocromadores. Os filtros ópticos selecionam uma faixa espectral e caracterizam-se pelo comprimento de onda de máxima transmitância e pela largura da banda espectral. Existem dois tipos de filtros ópticos, de absorção e de interferência. Os filtros de absorção são construídos com vidros que incorporam substâncias absorventes, caracterizam-se por possuírem menor transmitância e maior largura de banda espectral em comparação com os filtros de interferência, que são construídos com camadas de material dielétrico transparente (MgF_2, CaF_2) e filme metálico. Este tipo de filtro óptico seleciona estreitas bandas espectrais no ultravioleta, visível e infravermelho.

Os monocromadores são instrumentos que convertem a radiação policromática de uma fonte de luz em uma radiação monocromática. O monocromador é formado por um elemento de dispersão (uma grade de difração), junto com duas fendas estreitas que servem como abertura de entrada e saída da radiação. A fenda de entrada define um feixe estreito de radiação que incide no elemento de dispersão. A fenda de saída deve ser colocada a uma distância do elemento dispersante que deixe passar uma banda estreita de comprimento de onda. Quanto mais estreita for a fenda de saída e quanto mais distante estiver localizada do elemento dispersante melhor será a resolução do comprimento de onda.

1.1.5.3 - Sistema de Detecção

O sistema de fotodetecção é essencialmente um dispositivo de contagem de fótons, onde o sinal óptico é convertido em um sinal elétrico, que pode ser facilmente amplificado por meios eletrônicos. Os parâmetros usados para avaliação dos fotodetectores são: responsividade, que é a razão entre o sinal de saída do detector sobre a potência óptica que lhe deu origem; potência

equivalente ao ruído (NEP), que é a potência óptica capaz de gerar um sinal de saída equivalente ao ruído; tempo de reposta; faixa dinâmica e resposta espectral.

Os detectores mais utilizados são os tubos fotomultiplicadores (PMT) e os fotodiodos O tubo fotomultiplicador é bastante usado em medidas da reflectância difusa. O PMT é um dispositivo versátil que possui uma sensibilidade extremamente alta com resposta rápida. Um PMT típico consiste de um catodo fotoemissivo seguido por eletrodos de focalização, um multiplicador de elétrons e um coletor de elétrons (ânodo) em tubo à vácuo. Quando a luz entra no fotocatodo, fotoelétrons são emitidos para o vácuo. Esses fotoeletrons são direcionados pela voltagem de eletrodos focalizantes na direção dos multiplicadores de elétrons (dinodos) onde os elétrons são multiplicados pelo processo de emissão secundária. Os elétrons multiplicados são coletados pelo ânodo como sinal de saída. Devido a cascata da multiplicação de emissão secundária, os PMTs possuem sensibilidades extremamente alta.

2 – MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METAIS PESADOS

Uma das técnicas analíticas mais utilizadas na análise multicomponente é a espectrofotometria de absorção UV/Visível. As análises multicomponentes usando a espectrofotometria UV/visível são baseadas, geralmente, no uso de reagentes específicos para cada componente da mistura ou realizando etapas de separação prévia destes componentes. Estas etapas de separação são, em geral, trabalhosas, demoradas e consomem grandes quantidades de reagentes aumentando o custo das análises[108].

Nos últimos anos tem-se notado um crescente interesse no desenvolvimento de métodos que realizem a determinação simultânea dos componentes de uma mistura evitando assim a dificuldade de se encontrar reagentes específicos para cada componente ou de se realizar as exaustivas tarefas de separação prévia dos componentes da mistura, proporcionando, assim, determinações simultâneas em tempos mais curtos e com custos mais baixos.

Nas determinações espectrofotométricas simultâneas as concentrações dos componentes de interesse numa amostra são determinadas através da resolução de um sistema de equações simultâneas obtidas pela lei de Beer em tantos comprimentos de onda quantos forem os analitos. Este procedimento só é valido se as absorbâncias forem aditivas e que não haja reação entre os diferentes componentes presentes na mistura. Hauser et al.[109] realizavam a determinação simultânea de vários íons metálicos em misturas binárias utilizando um fotômetro multiLED, através da resolução simultânea de duas equações obtidas em dois comprimentos de onda distintos, conseguindo resultados com uma boa precisão e com erro 2% na maioria das misturas binárias. Yong et al.[110], desenvolveram um método espectrofotométrico simultâneo para a determinação de urânio, tório e lantânio pela medida de absorbância de seus complexos com arsenazo III em três diferentes comprimentos de onda, obtendo,

assim, um sistema de três equações que são resolvidas simultaneamente fornecendo resultados satisfatórios. Os métodos de determinações espectrofotométricas simultâneas baseados na resolução de equações obtidas com base na lei de Beer apresentam limitações quando há uma grande sobreposição dos espectros dos componentes da mistura ou quando tem-se um grande número de componentes, pois nestes os sistemas de equações simultâneas tornam-se bastante complexos e os resultados obtidos já não são tão precisos.

Um dos fatores que vieram a impulsionar a determinação simultânea de analitos foi a popularização do uso de microcomputadores nos laboratórios químicos devido aos crescentes avanços obtidos no desenvolvimento hardware e software, que promoveram avanços significativos nas análises instrumentais, pois permitiram o interfaceamento dos instrumentos analíticos aos microcomputadores produzindo uma enorme quantidade de informações e permitindo o monitoramento de um grande número de variáveis em uma única amostra.

Estes avanços permitiram o desenvolvimento de métodos alternativos para as determinações espectrofotométricas simultâneas, cujos sistemas apresentavam alta sobreposição espectral dos componentes da mistura, que é a utilização da espectrofotometria derivativa[111-112]. A espectrofotometria derivativa tem mostrado uma maior versatilidade em relação a espectrofometria clássica não só para um aumento da seletividade, mas também, em muitos casos, para um aumento na sensibilidade. Isto ocorre porque os espectros derivativos evidenciam a estrutura fina e permitem isolar bandas que são indistintas nos espectros diretos. As bandas dos espectros derivativos são mais estreitas e é possível isolar aquelas que nos espectros diretos aparecem parcialmente sobrepostas formando uma única banda larga, o que torna esses espectros muito úteis para fins de identificação dos constituintes de misturas complexas. Toral et al.[113] utilizavam espectros de segunda derivada para desenvolver um método altamente sensível e seletivo para a determinação simultânea de cobre e ferro. Com este método, os autores conseguiram trabalhar em uma faixa de

concentração de 8-120 μg/L e 8-125 μg/mL e limites de detecção de 2,9 μg/L e 2,8 μg/L para ferro e cobre, respectivamente. Um outro exemplo da eficiência da espectrofotometria derivativa é apresentado por Sedaira[114], que desenvolveu um método para realizar a determinação simultânea de manganês e zinco conseguindo determinar manganês numa faixa de concentração de 0,28 a 5,6 mg/L na presença de uma concentração de zinco da faixa de 0,28 - 5,6 mg/L.

O interfaceamento dos instrumentos analíticos aos microcomputadores permite a medida de um grande número de variáveis em uma única amostra. Um exemplo, são as intensidades de absorção em vários comprimentos de onda que podem ser registradas em um espectro. Essa grande quantidade de informação é muito importante no desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea, porém exigem o desenvolvimento de novas ferramentas matemáticas para tratar esta grande quantidade de informação e permitir a extração de informações relevantes.

Com base nos fatores acima citados Gomez et al.[115] desenvolveram um método para a determinação de vários íons metálicos em misturas binárias, ternárias e quaternárias baseados na aplicação de um programa de regressão linear múltipla para espectros de absorção dos complexos destes vários íons com o reagente cromogênico PAR. O programa utilizado foi o MULTIC, o qual é baseado num algoritmo de regressão linear múltipla que ajusta o espectro das misturas e dos padrões dos diferentes componentes. Com este método, os autores conseguiram limites de detecção de 0,02 μg/mL para a maioria dos metais. Em outro trabalho Gomez et al.[116] desenvolveram um método para a determinação simultânea de cálcio e magnésio baseados na aplicação de um programa de regressão linear múltipla obtendo boas faixas de linearidade, 0,10-4,0 μg/mL para Ca e 0,15-2,5 μg/mL para Mg.

Porém, o que realmente impulsionou o desenvolvimento de métodos de determinações simultâneas foi o surgimento da quimiometria, que é uma área da química especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada empregando métodos matemáticos e estatístico. A quimiometria pode

ser empregada em métodos de otimização, planejamento experimental, reconhecimento de padrões e de calibração, entre outras aplicações.

Os métodos de calibração multivariada mais empregados na determinação simultânea de metais[117-121] são a regressão linear múltipla (RLM), a regressão em componentes principais (PCR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). O método PLS tem duas variantes PLS1 e PLS2, que apresentam uma diferença no algoritmo usado na construção dos modelos. O PLS2 utiliza simultaneamente os valores de concentração de todos os componentes da mistura para a elaboração dos modelos de calibração, enquanto o PLS1 elabora os modelos de calibração empregando os valores de concentração de um componente de cada vez, obtendo-se assim modelos distintos para cada componente da mistura.

Rodriguez et al.[122] desenvolveram um método para a determinação espectrofométrica de ferro, cobalto, níquel e cobre baseado na resolução dos espectros de misturas quaternárias usando os métodos de calibração multivariada PCR, PLS1 e PLS2, obtendo resultados similares para os três métodos e demostrando a utilidade do procedimento na determinação simultânea destes metais sem a necessidade de se realizar pré-tratamento tediosos. Um outro exemplo da utilidade destes métodos de calibração multivariada na determinação simultânea de metais, cujos espectros dos complexos dos vários metais apresentam grande sobreposição espectral, é o trabalho realizado por Arrabal et al.[123], que utilizaram o PCR na determinação simultânea de ferro e manganês baseados na resolução dos espectros dos complexos formados com as misturas destes metais. Rezaei et al.[124] desenvolveram um método de determinação espectrofotométrica simultânea de cobalto e níquel utilizando redes neurais artificiais para analisar os espectros das misturas destes metais. Este método permitiu analisar os metais com limites de detecção de 0,005 e 0,006 mg/L para cobalto e níquel, respectivamente.

Em alguns casos, a utilização dos dados originais não é suficiente para a obtenção de bons resultados de calibração usando os métodos de

calibração multivariada, havendo a necessidade de se realizar um preprocessamento dos dados originais[125], que consistem em centrar os dados na média, fazer um escalanamento dos dados pela variância, realizar um autoescalanamento dos dados e/ou realizar um pré-tratamento dos dados originais, como suavizar ruídos instrumentais e obter a primeira e a segunda derivada dos espectros originais. Estes preprocessamentos e pré-tratamentos têm por finalidade minimizar ruídos experimentais, informações superpostas de espécies de interesse, dados expressos em grandezas diferentes, que dificultam a extração de informações relevantes dando origem a modelos de calibração com baixa capacidade de previsão. Sedaira[114] realizou a determinação simultânea de manganês e zinco usando espectros de primeira e segunda derivada, demostrando que em alguns casos este tipo de pré-tratamento permite aumentar a sensibilidade e a seletividade dos métodos espectrofométricos com dados originais.

Uma outra maneira de melhorar os resultados obtidos na determinação simultânea empregando métodos de calibração multivariada é realização de uma seleção de variáveis[126-131], pois em algumas situações o número de variáveis independentes pode agir de forma depreciativa à análise de dados, pois há situações onde muitas destas variáveis contribuem com pouca ou nenhuma informação para o modelo matemático. Na utilização da calibração multivariada surgiu a necessidade de selecionar o melhor conjunto de variáveis que apresente melhores sensibilidade e linearidade para os analitos de interesse ou até mesmo eliminando características potenciais dos interferentes bem como não linearidade. Vários critérios têm sido empregados para a seleção dos comprimentos de onda ótimos. Tem-se utilizado na seleção destes comprimentos de onda alguns programas computacionais como algoritmos genéticos e APS[129] (algorítmo das projeções sucessivas) ou alguns critérios empíricos baseados na razão dos espectros dos componentes das misturas. Saldanha et al.[132] desenvolveu uma metodologia para determinação simultânea de cobalto, cobre, manganês, níquel e zinco baseado na resolução dos espectros das misturas dos complexos formados com o PAR, utilizando os métodos de

calibração multivariada PLS e PCR, selecionando uma faixa espectral de 255-320 nm através de um critério baseado nas derivadas das diferenças entre os espectros individuais, que foi comparativamente favorável com o algoritmo genético.

Para aumentar a sensibilidade dos métodos de determinação espectrofotométrica simultânea de metais alguns autores têm realizado estas determinações utilizando a espectrofotometria em fase sólida, que combinam determinações espectrofotométricas com um método de pré-concentração de íons. Teixeira et al.[7] desenvolveram um método de calibração multivariada PLS2 para a determinação simultânea de ferro, níquel e zinco em misturas ternárias utilizando a espectrofotometria em fase sólida acoplada à análise em fluxo, utilizando como fase sólida o reagente 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) imobilizado em sílica funcionalizada C18. Misturas contendo 0,040 a 0,20 mg/L, de cada espécie, foram resolvidas satisfatoriamente. Castillo et al.[2] apresentaram um método para monitoramento simultâneo de metais pesados usando a espectrofotometria em fase sólida, realizando a determinação de cobre, chumbo e cádmio em níveis de concentração abaixo de μg/L e desvio padrão relativo de 10%.

A associação de medidas espectrofotométricas, métodos cinéticos e métodos de calibração multivariada tem crescido por permitir a análise de amostras mais complexas com limites de detecção menores[133-134]. Fernandez et al.[135] utilizaram um sistema de injeção em fluxo acoplado a um espectrofotômetro com arranjo de diodos para a determinação cinética simultânea de cobre, zinco, cobalto, níquel e ferro a níveis traços.

Os métodos de calibração multivariada permitem a utilização de várias técnicas analíticas na determinação simultânea de metais pesados. Uma das técnicas que tem apresentado grande crescimento neste tipo de determinação são as técnicas eletroquímicas[136-141], que são métodos potencialmente mais baratos e mais rápidos para uma determinação quando comparados às outras técnicas instrumentais, como por exemplo a espectrometria de absorção atômica.

Dependendo do tipo de método a ser utilizada, as técnicas eletroanalíticas podem ser muito específicas e extremamente sensíveis. Munoz et al.[142] desenvolveram um sistema de fluxo contínuo aplicado à determinação simultânea de zinco, cádmio, chumbo, cobre, níquel, cobalto e cromo utilizando um sistema de três eletrodos. Com este método conseguiu-se limites de detecção da ordem 10^{-9} mol/L.

As técnicas eletroquímicas para a determinação simultânea de metais pesados têm-se utilizado muito dos microeletrodos por causa de suas características únicas, como alto transporte de massa e baixa queda ohmica e da fabricação de arranjos de microeletrodos com muita precisão em sua geometria. O uso de microeletrodos na determinação de traços metálicos tem demostrado claramente a obtenção de sensibilidades altas, por volta de 100 ng/L, além de permitir a especiação multielementar. Estas técnicas têm a capacidade de serem utilizadas em monitoramentos on-line ou in situ. Silva et al.[143] desenvolveram um sensor baseado em um arranjo de microeletrodos de mercúrio para utilizarem na determinação simultânea de ultratraços de chumbo, cádmio e zinco. A calibração obtida com estes métodos demonstrou boa linearidade para os três metais na faixa de concentração de 100 ng/L a 1 mg/L. Demonstrou-se, ainda, que com um aumento do tempo de pré-concentração de 5 para 20 minutos o limite de detecção passa de 100 para 20 ng/L.

Tem se observado nos últimos anos a utilização dos sensores químicos de fibras ópticas para a determinação simultânea de metais pesados, tendo como vantagem em relação aos eletrodos o fato de não haver a necessidade de um contato direto do reagente complexante com a fibra óptica e nem a necessidade de um eletrodo de referência. Ertas et al.[144] realizaram a determinação simultânea de cádmio e zinco usando um optodo com uma membrana líquida de Nafion com celofane, obtendo após a imersão do optodo por 20 minutos, limites de detecção de 4,5 μg/L e 0,6 μg/L para Cd e Zn, respectivamente. Esta determinação foi efetuada resolvendo-se duas equações simultâneas obtidas em dois comprimentos de onda distintos. A desvantagem

deste método é que o sistema químico não é reversível, contudo, o custo é muito baixo permitindo o descarte da fase sensora. Chan et al.[145] combinaram optodo com rede neural para a determinação simultânea de potássio e sódio. Nesta determinação, os autores utilizaram duas membranas de íon-seletivo, uma para potássio e outra para sódio, para a obtenção de espectros das misturas destes dois íons e utilizaram rede neural artificial para realizar a determinação simultânea dos dois metais, pois os espectros não apresentavam uma função linear com a concentração. Raimundo et al.[146] realizaram a determinação de zinco, cádmio e mercúrio empregando o reagente Br-PADP imobilizado na resina XAD-4 e utilizaram redes neurais artificiais para resolver misturas binárias e ternárias destes metais.

2.1 – Métodos de Calibração Multivariada

A calibração é um procedimento utilizado para se estabelecer uma relação matemática entre uma propriedade de interesse a partir dos resultados registrados por instrumentos analíticos[147].

Na utilização de um procedimento de calibração multivariada deve-se organizar os dados experimentais obtidos para cada amostra em uma matriz **X** e os dados da propriedade de interesse em uma matriz **Y**.

O processo de calibração envolve duas etapas: modelagem e validação. Na modelagem estabelece-se a relação matemática entre as respostas instrumentais, contidas numa matriz **X**, e a propriedade de interesse, contida numa matriz **Y**. Na validação, otimiza-se a relação no sentido de um melhor descrição do analito de interesse.

Os métodos de calibração multivariada[148-157] mais utilizados em determinações simultâneas e empregados neste trabalho são regressão em componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com as variantes PLS1 e PLS2. Estes métodos foram utilizados por serem

consideravelmente mais eficientes para lidar com ruídos instrumentais e colinearidade. Outra propriedade importante destes métodos é a robutez, ou seja, os parâmetros do modelo praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração. Estes métodos de calibração são baseados na compressão dos dados originais e tem como ponto de partida a análise por componentes principais (PCA).

2.1.1 – Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais é uma técnica estatística multivariada que tem como principal objetivo reduzir a dimensão dos dados originais e formar novas variáveis que não são correlacionadas. Esta redução é feita através da combinação linear das variáveis originais que descrevem a maior variância dos dados. Estas novas variáveis são chamadas de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou autovetores e constituem um novo sistema de eixos ortogonais entre si. Por esta razão, são completamente não correlacionados, sendo que cada componente é gerado a partir da combinação linear das variáveis originais.

As combinações lineares das variáveis originais que geram cada componente principal podem ser representadas pela equação XIII.

$$PC_i = a_{i1}v_1 + a_{i2}v_2 + ... + a_{im}v_m \qquad (XIII)$$

Onde v_j são as variáveis originais e a_{ij} são os coeficientes que medem a importância de cada variável na componente principal e m é o número de variáveis originais.

Estes coeficientes são chamados de pesos (*loadings*) e são o cosseno do ângulo entre o eixo da componente principal e o eixo da variável original, e, portanto, seu valor estará sempre entre 1 e –1 . Quanto mais próximo de ± 1, maior a influência que esta determinada variável tem na descrição desta componente principal.

A projeção de cada amostra neste novo sistema de eixos fornece os escores e, portanto, cada amostra terá então um valor de escore para cada uma das novas componentes principais.

A Figura 7 exemplifica um sistema bidimensional com os eixos das variáveis originais 1 e 2 e das componentes principais CP1 e CP2. A CP1 é aquela situada na direção de maior variância dos dados, a segunda componente principal é ortogonal à primeira e em uma direção que lhe permita descrever a maior variância nos dados e destes modo são obtidas as demais componentes principais.

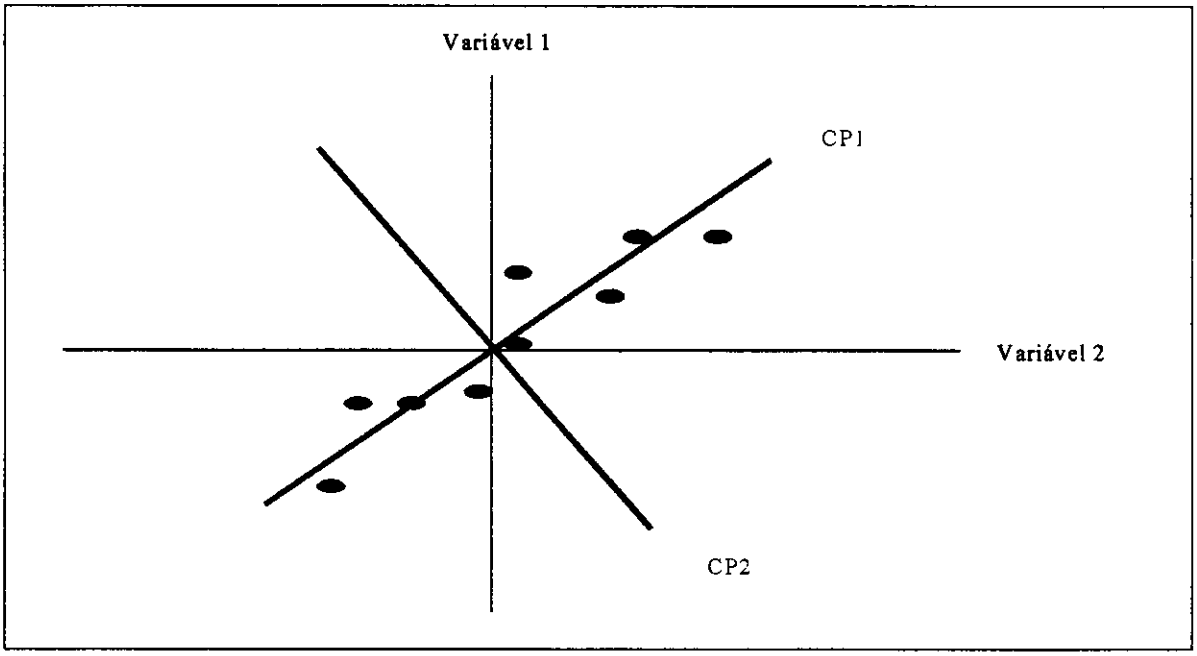


Figura 7: Gráfico de dados num sistema bidimensional com as duas primeiras componentes.

A análise de componentes principais pode ser feita com base em autovalores e autovetores de uma matriz de variância-covariância ou através de diversos algoritmos aplicados diretamente na matriz de dados. Estes algoritmos decompõem a matriz de dados **X** em uma soma de matrizes que correspondem aos produtos dos vetores escores ($\mathbf{t}_n$) e pesos ($\mathbf{p}_n$), conforme pode ser visto pela

equações (XIV) e (XV), sendo que n corresponde ao número de componentes principais necessárias para descrever o sistema. Os escores e pesos são calculados aos pares por um processo iterativo.

$$\mathbf{X} = t_1p_1 + t_2p_2 + ... + t_np_n \qquad (XIV) \qquad \text{ou}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t \qquad (XV)$$

Onde **P** é a matriz dos pesos e T a matriz dos escores.

A Figura 8 ilustra a análise de componentes principais para o caso de duas variáveis x_1 e x_2.

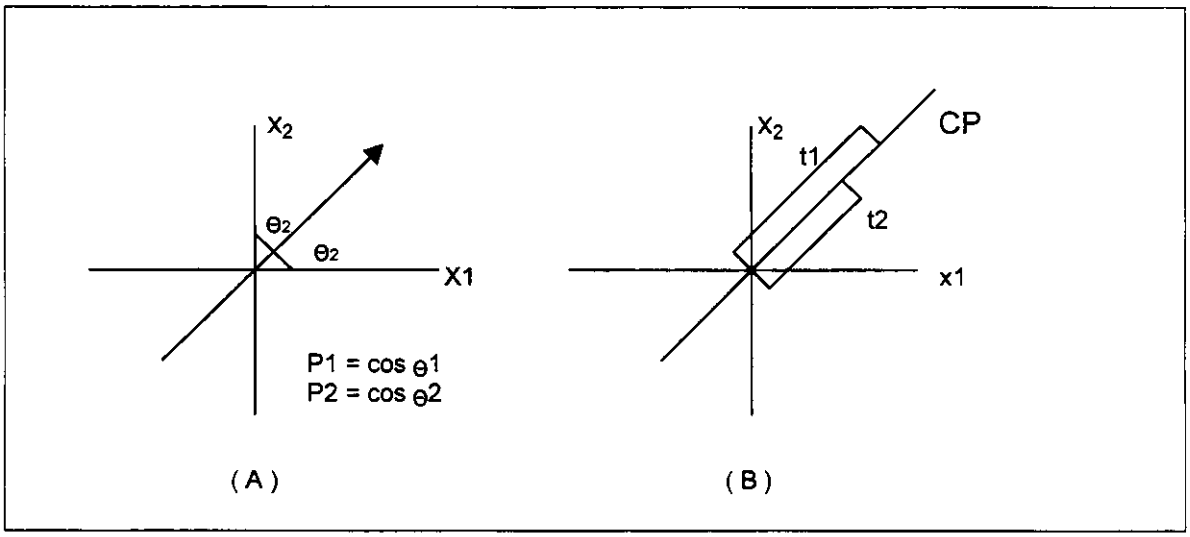


Figura 8: Representação gráfica de um componente principal no caso de duas variáveis, sendo (A) os pesos e (B) os escores.

Nota-se que a componente principal é a reta r que aponta na direção de maior variabilidade das amostras, que os escores t_1 e t_2 são as projeções das amostras na direção da componente principal e os pesos p_1 e p_2 são os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável.

2.1.2– Regressão por Mínimo Quadrados Parciais

O método de regressão por mínimos quadrados parciais apresenta duas variantes PLS1 e PLS2. O PLS2 consiste em decompor as matrizes de dados **X** (variáveis independentes) e **Y** (variáveis dependentes) em uma soma de produtos de dois vetores (os escores e os pesos). Diversos algoritmos podem ser empregados nestes cálculos e a representação matricial destas decomposições podem ser expressas pelas equações (XVI) e (XVII)

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^t + \mathbf{E} \qquad (\text{XVI})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^t + \mathbf{F} \qquad (\text{XVII})$$

Onde os elementos das matrizes **T** e **U** são os escores e os elementos **P** e **Q** são os pesos das matrizes **X** e **Y**, respectivamente. As matrizes **E** e **F** correspondem aos erros.

Os escores obtidos a partir das matrizes **X** e **Y** permitem a manutenção das informações estatísticas úteis com a vantagem de não haver correlação entre as variáveis Após obter-se as relações externas das componentes principais de **X** e **Y** estabelece-se uma relação entre o bloco das variáveis independentes e o das variáveis dependentes relacionando-se os escores, **t**, com os escores, **u**, para cada componente principal. Esta relação é obtida por um modelo linear como por ser visualizado pela equação (XVIII).

$$\mathbf{u} = \mathbf{b}_n\mathbf{t}_n \qquad (\text{XVIII})$$

Onde n = 1,2, ..., n para n componentes principais

No caso do PLS1, a regressão, para a obtenção do modelo de calibração, é realizada relacionando-se os escores, **T**, obtidos a partir da matriz **X**

com o vetor **y**, já que o modelo de calibração é construído com cada componente da mistura separadamente.

A Figura 9 representa o modelo de calibração baseado no PLS2, mostrando no gráfico (A) a obtenção dos escores, **u**, da matriz **Y**, no gráfico (B) a obtenção dos escores, **t**, da matriz **X** e no (C) a relação entre os escores **u** x **t**.

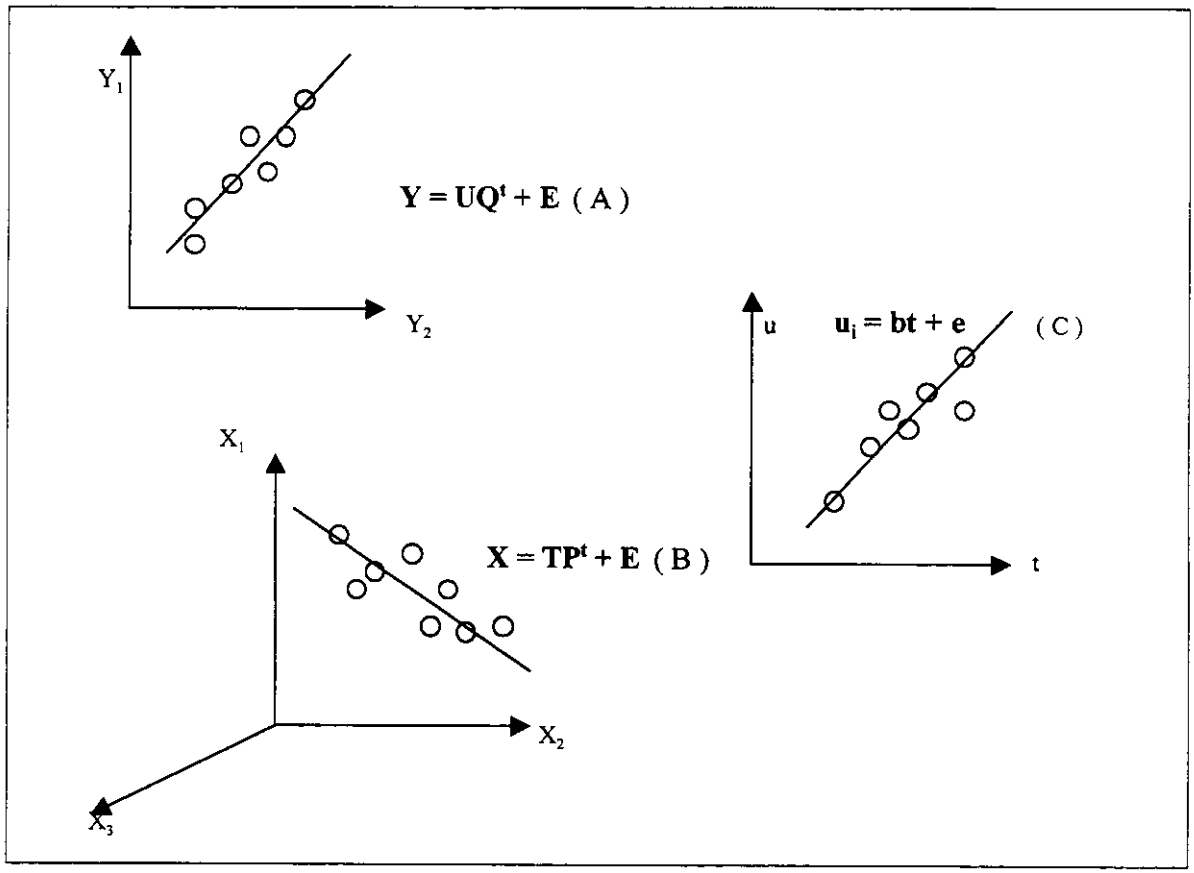


Figura 9: Representação geométrica do PLS com uma variável latente modelando os dados **X** e **Y**, sendo que (A) mostra a obtenção dos componentes principais da matriz **Y**, (B) a obtenção das componentes da matriz **X** e (C) a relação entre os componentes de **X** e **Y**.

Como as componentes principais de **X** e **Y** são calculadas independentemente pode ocorrer da relação entre os escores dos dois blocos não ser necessariamente a melhor. Para minimizar este problema torna-se necessário

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

manipular a informação desses dois blocos simultaneamente. No caso do PLS é feita uma leve rotação das componentes principais. Como os escores são as projeções dos pontos nestes eixos, consequentemente, seus valores são mudados de maneira a permitir que a melhor relação linear entre os escores de X e Y seja construída.

2.1.3 – Regressão por Componentes Principais (PCR)

O método de regressão por componentes principais ao invés de decompor as matrizes **X** (variáveis independentes) e **Y** (variáveis dependentes), ele decompõe apenas a matriz **X**.

Neste caso, a matriz pode ser representada pelos seus escores **T** e com isso as variáveis **X** são trocadas por novas variáveis que não são correlacionadas e estão em menor número. A equação (XIX) representa a decomposição da matriz **X** .

$$\mathbf{T = X P^t} \qquad (XIX)$$

Onde **T** é a matriz dos escores e **X** é a matriz das variáveis independentes.

Em seguida, relaciona-se a matriz de escores, **T**, com a matriz das variáveis dependentes conforme equação (XX).

$$\mathbf{Y = T.b + E} \qquad (XX)$$

Um aspecto característico do método de calibração PCR é a construção de componentes principais utilizando somente as informações contidas na respostas instrumentais sem levar em consideração as informações provenientes das concentrações. Este fato pode constituir em uma fragilidade do método de calibração no caso, por exemplo, em que o analito tem um sinal muito

fraco e portanto não influência fortemente nas primeiras componentes principais, fazendo com um número maior delas seja necessário para a construção do modelo de calibração. O método de calibração PLS, descrito no item 2.1.2, contorna esta dificuldade característica do método PCR usando informações das concentrações na obtenção dos componentes principais.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3-1 – Reagentes e Soluções

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com reagentes químicos de grau analítico.

Soluções estoque (1000 mg/L) dos íons metálicos Cd(II), Ni(II), Mn(II), Cu(II) e Zn(II) foram preparadas pela dissolução, em água deionizada, de quantidades adequadas dos sais de nitrato destes metais.

A solução tampão universal (pH = 9,0) foi preparada misturando-se 345 mL de uma solução de ácido bórico 0,2 mol/L / ácido cítrico 0,05 mol/L (preparada em água deionizada) e 655 mL de uma solução fosfato de sódio tribásico 0,1 mol/L em água deionizada.

Na preparação das soluções padrão dos íons metálicos, usadas na obtenção das curvas de analíticas dos metais e nas misturas de calibração e validação, partiu-se das soluções estoque dos metais (1000 mg/L), obtendo-se uma solução padrão de 100 mg/L e a partir desta foram obtidas as demais soluções por diluições adequadas, utilizando-se a solução tampão universal pH 9,0.

A solução de PAR 0,5% em metanol (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,05 mg do PAR em 10 ml de metanol.

3.2 – Procedimentos Analíticos

O procedimento de imobilização do PAR na resina XAD-4 iniciou-se pela seleção das partículas de XAD-4 com diâmetro entre 77 a 150 μm,

seguindo-se a lavagem da resina, seqüencialmente, com metanol, ácido clorídrico 0,1 mol/L e água deionizada. Em seguida a resina foi filtrada, usando um funil e papel de filtro, e seca na estufa a 80° C por 3 horas. A imobilização foi realizada colocando 0,08 g da resina em contato do 5 mL de uma solução de PAR em metanol 0,5% (m/v). Esta mistura foi mantida sob agitação constante por 2 horas e, em seguida, realizou-se a filtração da solução sobrenadante, com o auxílio de um funil e papel de filtro, separando-se os grânulos alaranjados da resina contendo o PAR imobilizado. Após a filtração da solução sobrenandante, lavou-se os grânulos da resina várias vezes com água deionizada para remover traços do regente fracamente adsorvidos na resina. Após a lavagem, os grânulos foram transferidos para um frasco de vidro escuro com água deionizada e guardados a temperatura ambiente.

3.3 – Montagem da Instrumentação

A instrumentação utilizada neste trabalho é mostrada na Figura 10. Pode ser notado que a instrumentação necessária para operação do optodo é composta por uma fonte de luz que opera com uma lâmpada de filamento de tungstênio (A) (12V, 50W, Optron), chopper mecânico (B) (Benthan) que opera com controlador de frequência, optodo (C) (feixe de fibras ópticas e fase sensora), monocromador (D) (McPherson GM 100) que está associado ao tubo fotomultiplicador (E) (Hamamatsu 931A) alimentado por fonte estabilizada de tensão (F) (Ealing 27-5537), pré-amplificador de corrente (G) (EG&G PAR 181), amplificador lock-in (H) (EG&G PAR 5105) que se encontra sincronizado ao chopper óptico e um microcomputador Pentium (166 Mhz, 32 Mbytes RAM) que é utilizado para controlar o sistema e adquirir os dados através de sua conexão ao amplificador lock-in.

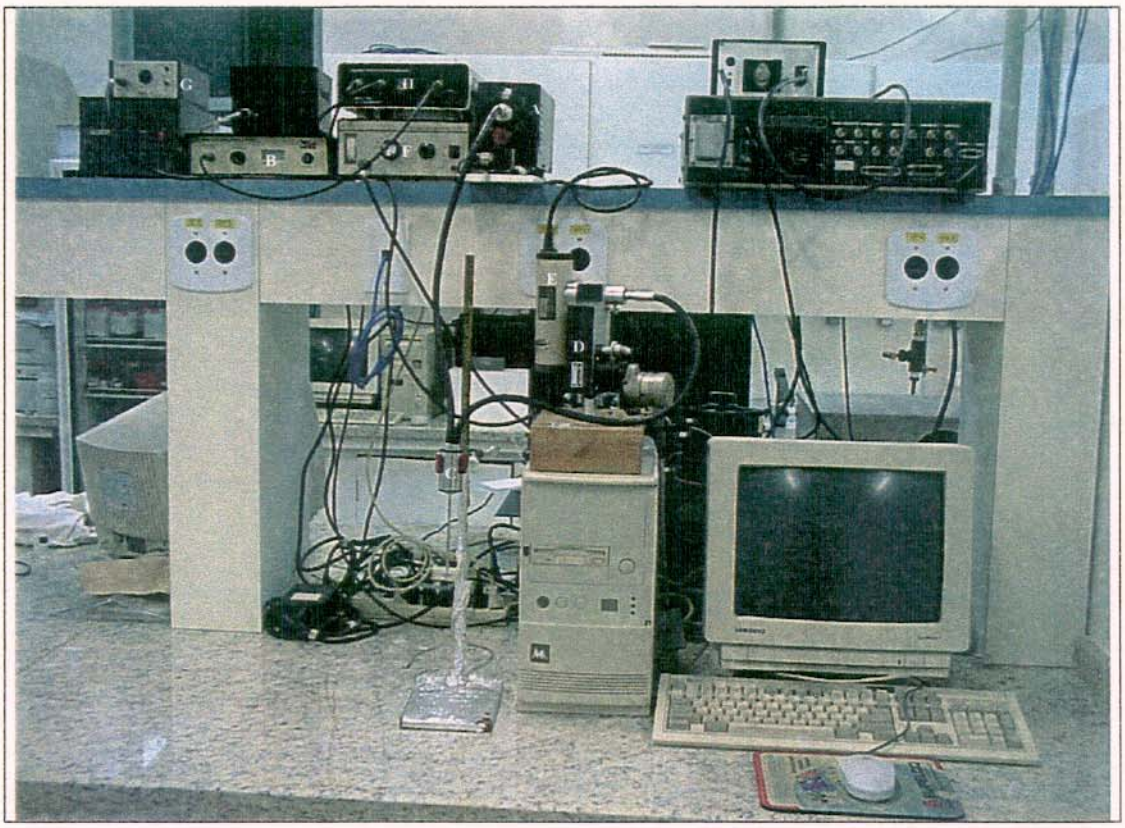


Figura 10: Instrumentação usada neste trabalho

3.3.1 – Interfaceamento do Amplificador Lock-in ao Microcomputador

Realizou-se o interfaceamento do amplificador lock-in ao microcomputador empregando duas interfaces, sendo uma delas a interface paralela PCL-711S (Advantech Corp), para a aquisição dos dados e a outra uma serial RS 232C, para controlar o amplificador. A interface PCL-711S foi adaptada às necessidades deste trabalho e este processo envolveu o ajuste dos cabos

pertencentes à interface de forma apropriada permitindo a realização de sua conexão com o amplificador lock-in e com o microcomputador. A interface PCL-711S possui um conversor analógico/digital que converte o sinal analógico obtido pelo amplificador lock-in em sinal digital para que ele possa ser processado pelo microcomputador.

O controle da interface PCL-711S usada na aquisição dos dados foi realizado por meio de um programa computacional escrito utilizando-se o programa comercial Microsoft Visual Basic 3.0. O programa desenvolvido permite ao usuário estabelecer alguns parâmetros iniciais, como o número de leituras que o conversor A/D deve realizar, a média de medidas para cada leitura e o intervalo de tempo entre as leituras, dentre outras. O valor de cada leitura é transferido para um gráfico contido no próprio programa e arquivado, inicialmente, na memória do computador e posteriormente transferido para o disco utilizando formatação ASCII, de forma a permitir a sua leitura direta pelo programa Microcal Origin 4.0, onde os dados foram, então, tratados de acordo com as necessidades.

A interface RS 232C foi controlada por meio do programa computacional escrito em Microsoft Visual Basic 3.0. Este programa permite ao usuário controlar o ajuste de sensibilidade, constante de tempo, filtros e frequência, por intermédio de comandos específicos descritos no manual do amplificador.

Os dados produzidos pelo lock-in foram digitalizados com o auxílio de um conversor A/D de 12 bits contido na interface PCL-711S. Estes dados eram obtidos em unidades de A/D e, então, convertidos para valores em mV. Esta conversão foi realizada por meio de uma calibração do conversor A/D em relação a intensidade do sinal enviado pelo lock-in. O procedimento e os resultados obtidos com esta calibração são relatados no item 3.3.2.1. Os resultados desta calibração para cada um dos cincos ganhos de operação existentes no conversor A/D foram usados para elaboração de equações relacionando unidades de A/D com valores em mV. Estas equações foram incorporadas ao programa que controla a aquisição de dados do amplificador lock-in.

3.3.2– Calibração do Conversor A/D e do Monocromador

Após a montagem da instrumentação realizou-se o interfaceamento do amplificador lock-in ao microcomputador. Em seguida foi realizada a calibração do conversor A/D afim de se obter uma relação entre o valor lido pelo conversor A/D e o fornecido pelo amplificador lock-in. Foi, também, realizada a calibração do monocromador com o objetivo de se obter os valores reais do comprimento de onda.

3.3.2.1 - Calibração do Conversor A/D

Na obtenção da relação entre o sinal produzido pelo conversor A/D e o sinal enviado pelo lock-in utilizou-se uma fonte de tensão variável ligada à entrada do conversor A/D e a um multímetro digital. Com este procedimento foi possível obter uma relação entre o valor da tensão de entrada, expresso em mV, e o valor de unidades de A/D fornecido pelo conversor. Este último valor era mostrado na tela do microcomputador através do programa utilizado para adquirir os dados. Foram obtidas relações tensão X unidades de A/D para as cinco escalas de ganho do conversor A/D (5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 mV). Nestas cinco escalas foram aplicados valores de tensão positiva e negativa. As equações que relacionam a tensão aplicada com unidades de A/D fornecidas pelo conversor A/D são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 : Curvas de calibração do A/D para as diferentes escalas do A/D

Escala do A/D (mV)	Equações da Curva de Calibração (Tensão x valor do A/D lido)	Coeficiente de Correlação
5000	V = - 4810 + 2,36 A/D	1
2500	V = - 2406 + 1,18 A/D	1
1250	V = - 1203 + 0,59 A/D	0,9999
625	V = - 594,6 + 0,29 A/D	1
312,5	V = - 294,3 + 0,15 A/D	0,9999

3.3.2.2 - Calibração do Monocromador

A calibração do monocromador foi realizada utilizando-se a instrumentação mostrada na Figura 10, acrescentando-se os filtros ópticos de vários comprimentos de onda (450, 500, 550 e 600 nm) que foram colocados à frente da fonte de luz e removendo-se a fase sensora que fica presa na extremidade comum do feixe bifurcado de fibras ópticas. Esta calibração foi realizada utilizando-se os espectros de reflectância de uma folha de papel branca, colocada à frente da extremidade comum do feixe bifurcado, usando cada um dos filtros ópticos citados acima. Estes espectros de reflectância são mostrados na Figura 11.

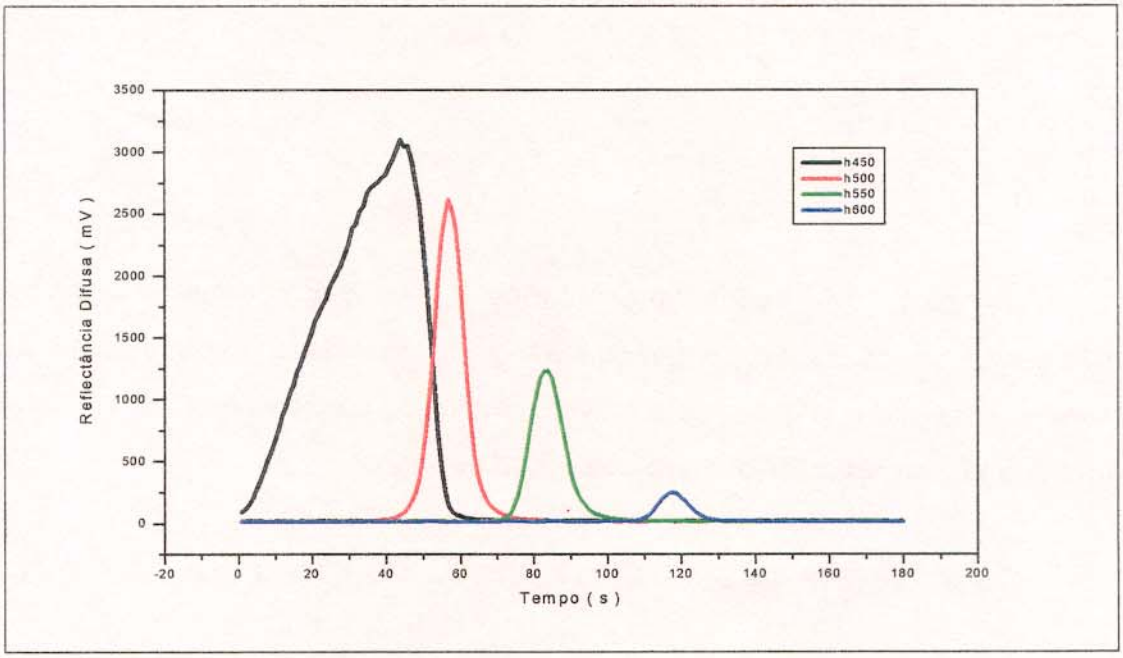


Figura 11: Espectros de reflectância dos filtros ópticos (- 450 nm, - 500 nm, - 550 nm, - 600 nm)

O monocromador é movimentado por um motor de passos que leva 180s para percorrer a faixa espectral de 400 a 700 nm. A calibração do monocromador consiste em relacionar o tempo que o motor de passos leva para

atingir o valor de máxima reflectância no espectro de cada filtro óptico com o valor do seu respectivo comprimento de onda teórico de máxima reflectância.

A Tabela 2 mostra os valores do comprimento de onda teórico de máxima reflectância e o tempo gasto pelo motor de passos para atingir o valor de máxima reflectância para cada filtro óptico.

Tabela 2: Relação entre o comprimento de onda teórico e tempo de máxima reflectância filtro óptico.

Filtro Óptico	λ (nm) Teórico	Tempo de máxima reflectância
600	605	117
550	558	84
500	500	57
450	454	44

A partir dos dados apresentados na Tabela 2 construiu-se uma equação polinomial de 2° grau, equação (XXI), que relaciona o comprimento de onda teórico com o tempo gasto para mover o motor de passos do monocromador no ponto de máxima reflectância para cada filtro óptico.

$$\lambda = 277{,}5 + 4{,}824t - 0{,}01735t^2 \qquad (XXI)$$

Esta equação polinomial de segundo grau tem um coeficiente de correlação igual a 0,998.

3.3.3 - Teste da Instrumentação

Este teste consistiu em analisar a repetibilidade dos espectros emitidos pela fonte de luz num intervalo de 6 horas. Para a obtenção destes

espectros foi utilizada a instrumentação descrita no item 3.3, utilizando-se o feixe bifurcado de fibras ópticas sobre uma folha de papel branco e registrando os espectros na faixa de 400 a 700 nm.

O conjunto de seis espectros de reflectância difusa obtidos em intervalos de uma hora, após a fonte permanecer ligada por 4 horas, podem ser vistos na Figura 12. Observou-se uma pequena flutuação do sinal ocorrida no primeiro e no terceiro espectro e os demais apresentam uma boa repetibilidade. A estimativa de desvio padrão, obtida no comprimento de onda de máxima reflectância (505 nm), foi de 7,3% indicando que a fonte utilizada apresentava boa estabilidade em um intervalo de 6 horas.

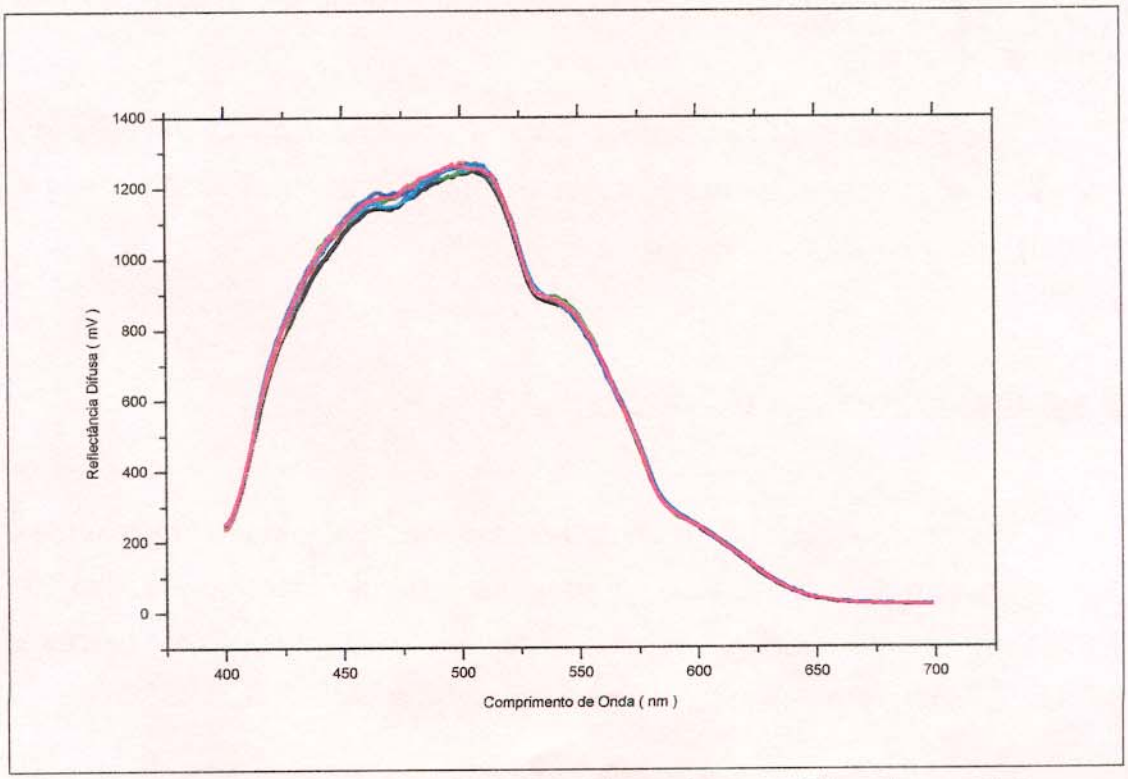


Figura 12 : Espectros de reflectância difusa de uma folha de papel branco usando instrumentação mostrada na figura 10 usando o feixe bifurcado de fibras ópticas sem a fase sensora

4 – DESENVOLVIMENTO DE UM OPTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS

Os optodos são sistemas que podem ser empregados na determinação quantitativa de metais pesados. Estes sistemas são baseados, em sua grande maioria, no uso de reagentes complexantes imobilizados em suportes sólidos, que são posteriormente fixados na extremidades de fibras ópticas. A quantificação dos metais pesados é baseada no monitoramento da mudança de coloração ou da propriedade óptica do reagente complexante ao interagir com os íons de metais pesados.

A construção de um optodo para a determinação quantitativa de metais pesados envolve a escolha do reagente complexante, do suporte sólido e do método de imobilização do reagente neste suporte.

4.1 – Escolha do Reagente Complexante

A literatura cita um grande número de reagentes complexantes utilizados na construção de optodos usados na determinação quantitativa de metais pesados[28-33, 71-75]. Estes reagentes são em sua maioria os mesmos utilizados em deteminações espectrofotométricas de íons metálicos.

Neste trabalho, utiliza-se o 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR[158], por ser um reagente que forma complexos intensamente coloridos com a maioria dos metais pesados e por apresentar algumas características[33] importantes como boa fotoestabilidade, elevada absortividade molar ($\sim 10^4$) e banda de absorção na região de interesse (visível – 400 a 700 nm). Outros fatores levados em consideração na escolha do PAR são o seu caráter não seletivo que permite a sua utilização em determinações simultânea de vários íons metálicos e a vários

trabalhos que mostram a viabilidade de se efetuar a imobilização do PAR em vários suportes sólidos[83,84,91].

4.1.1 - 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR

O PAR é facilmente solubilizado em água e as etapas de dissociação ácido-base mais comuns são mostradas na Figura 13. Nota-se por esta Figura que existem uma forma catiônica protonada (a), uma forma eletricamente neutra (b) e duas forma aniônicas (c) e (d).

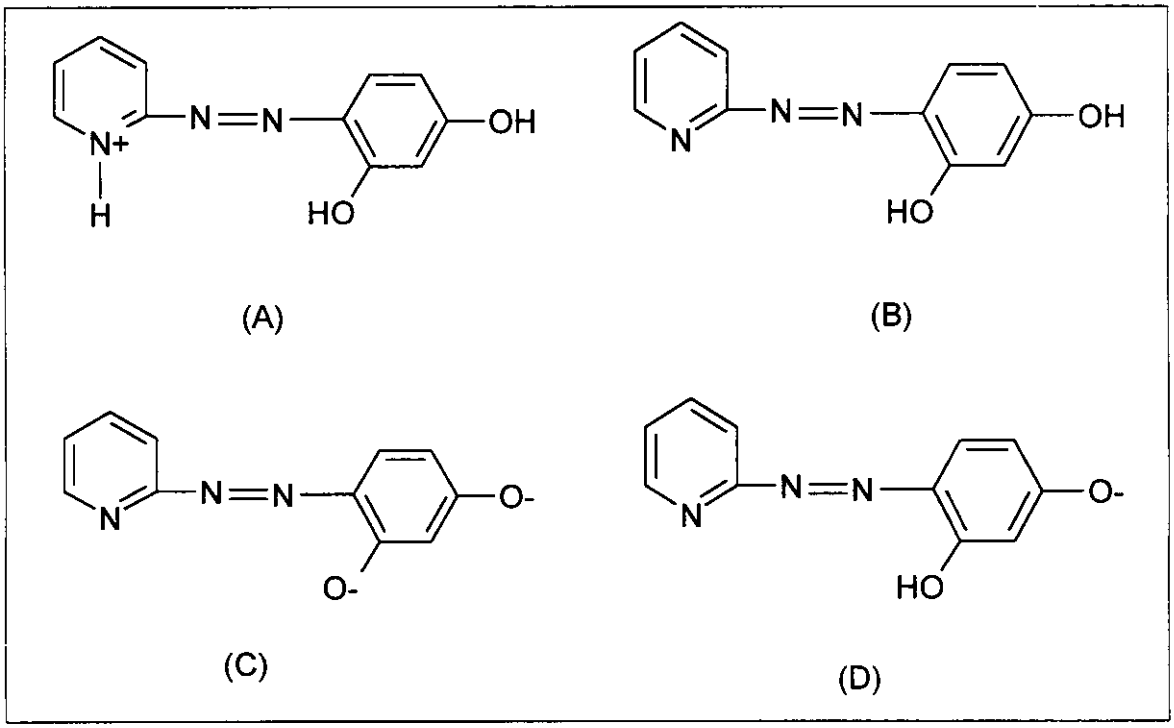


Figura 13 : Formas da dissociação ácido-base do PAR

Outras duas forma catiônicas, H_4L^{+2} e H_5L^{+3}, da dissociação ácido-base do PAR devem existir em soluções de ácido sulfúrico 50% e 90%, respectivamente.

O PAR forma complexos intensamente coloridos com íons metálicos solúveis em água e estes complexos podem ser extraídos com solventes orgânicos. O PAR pode formar complexos com íons metálicos na razão molar de 1:1 e 1:2. A Figura 14 ilustra a estrutura do complexo metal-PAR de razão molar 1:1.

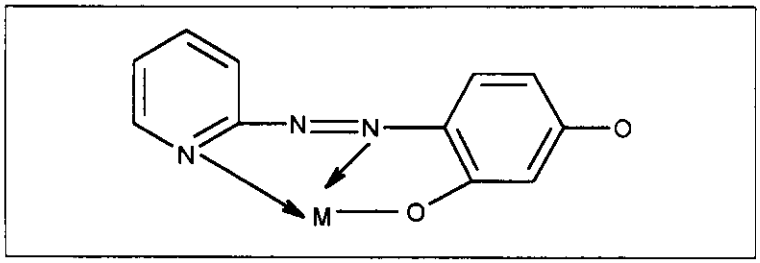


Figura 14: Estrutura dos complexos metal-PAR na razão molar (1:1).

Investigou-se a formação e a estereoquímica de alguns complexos metal-PAR em função do pH e mostrou-se que em soluções ácidas forma-se a espécie MHL^+ e em soluções alcalinas ML_2. Os espectros de absorção da espécie MHL^+ na região do visível apresentam dois máximos e o da espécie ML_2 um único máximo.

4.2 – Imobilização do Reagente Complexante

Uma grande variedade de materiais poliméricos podem ser usados na imobilização de reagentes complexantes. As resinas não iônicas XAD têm sido muito empregadas como adsorvente para muitos reagentes não iônicos devido as boas propriedades físicas como porosidade, distribuição uniforme do tamanho dos poros, alta área superficial, bem como estruturas não iônicas quimicamente homogêneas.

Para a imobilização do PAR usou-se as resinas não iônicas XAD-4 e XAD-7, empregando-se o método de adsorção física por ser um dos mais utilizados na construção de optodos devido a facilidade de preparo. A resina XAD-7 é um polímero moderadamente hidrofóbico baseado no polimetilmetacrilato e pode adsorver o reagente pela sua porção hidrofílica ou hidrofóbica. A Figura 15 ilustra a estrutura da resina XAD-7.

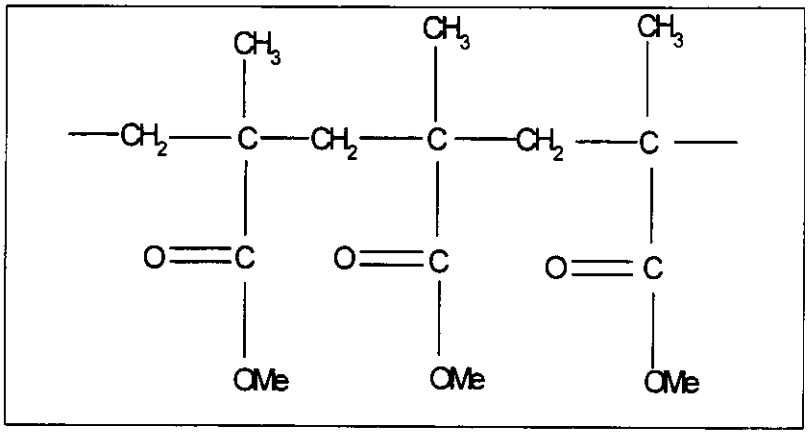


Figura 15: Estrutura da resina XAD-7

A resina XAD-4 é um copolímero hidrofóbico aromático de estireno e divinelbenzeno, cuja estrutura é visualizada na Figura 16. Esta resina é geralmente atacada pela parte hidrofóbica do reagente.

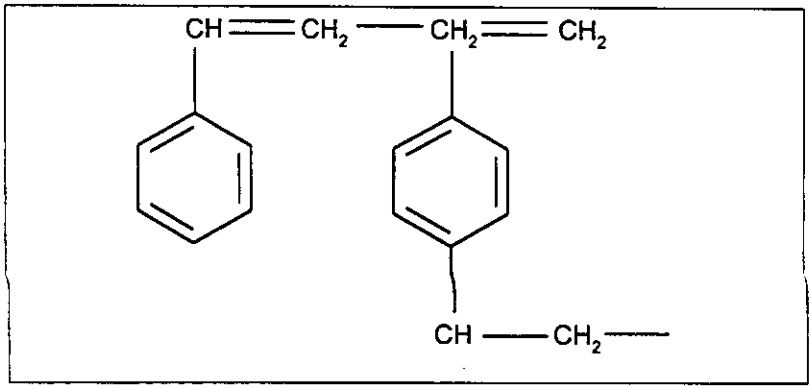


Figura 16: Estrutura da resina XAD-4

4.3 – Modos de Operação do Optodo

Os optodos baseados em reagentes complexantes imobilizados em suporte sólido podem ser operados de dois modos[33]. Em um destes modos, a fase sensora do optodo é exposta a um volume fixo de analito até que um aparente equilíbrio seja estabelecido Este equilíbrio depende da transferência de massa da fase aquosa para a fase sensora. A Figura 17 ilustra as respostas típicas do optodo operado em volume fixo de analito, em três concentrações diferentes (C1 > C2 > C3). Nota-se, por esta Figura, que o sinal analítico produzido pelo optodo, em cada uma das diferentes concentrações, vai aumentando até que seja atingido o equilíbrio e verifica-se, ainda, que quanto maior for a concentração do analito maior será o sinal analítico produzido pelo optodo no ponto de equilíbrio.

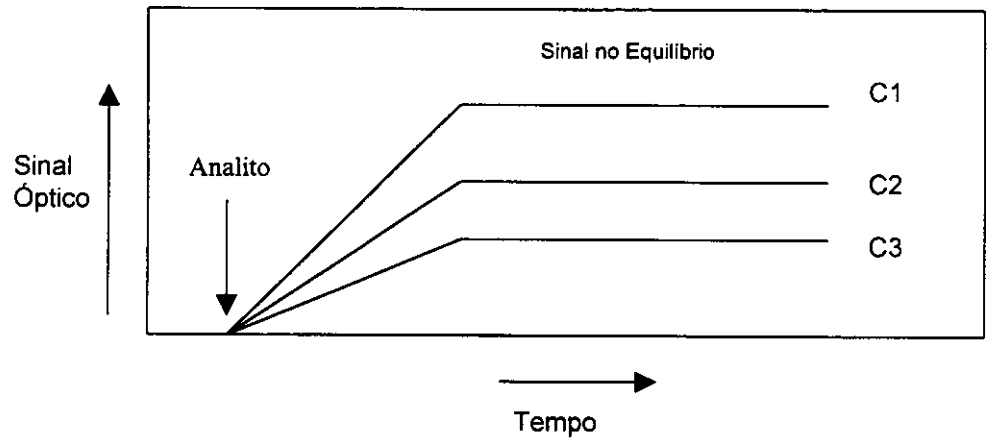


Figura 17: Curvas de respostas típicas do optodo operado em volume fixo de analito

Na outra forma de operação do optodo, a fase sensora é exposta a um fluxo continuo do analito. Neste caso, o analito é removido ao passar pela fase sensora até que todo o reagente presente na fase sensora se encontre complexado com o analito. A Figura 18 ilustra as respostas típicas para o optodo operado com um fluxo continuo de analito em três concentrações diferentes

(C1 > C2 > C3). Nota-se, por esta Figura, que o sinal analitico produzido pelo optodo vai aumentando até que a fase sensora se encontre saturada, ou seja, todo o reagente presente na fase sensora se encontra complexado com o analito e que a partir deste ponto o sinal permanece constante. Verifica-se, ainda, que quanto maior for a concentração do analito maior será a inclinação do sinal analitico e mais rapidamente será atingido o ponto de saturação da fase sensora. Na utilização de optodos empregando-se este último modo de operação deve-se escolher o tempo para se realizar as medidas de modo que não ocorra a saturação da fase sensora na faixa de concentração de analito escolhida na realização do trabalho.

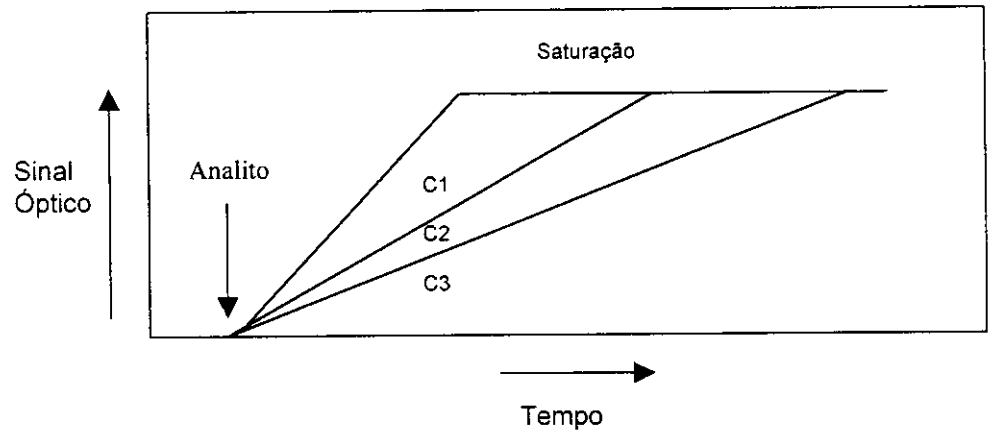


Figura 18: Curvas de respostas típicas do optodo operado em fluxo continuo de analito

4.3.1 – Optodo Operado em Volume Fixo

O optodo de PAR imobilizado construído para operação em volume fixo consistiu de um feixe bifurcado de fibras ópticas de borosilicato (Reichembach, São Paulo). A parte comum deste feixe bifurcado foi recoberta por um haste metálica de 16 cm e possui um feixe com diâmetro ativo de 6,0 mm. A parte bifurcada do feixe possui dois cabos, que medem 70 cm de comprimento e

possuem um feixe com um diâmetro ativo de 5,5 mm. Fixou-se na extremidade comum do feixe bifurcado uma tampa de teflon, com rosca. Uma tela de Nylon pressionada pela tampa mantinha os grânulos da resina (XAD-4 ou XAD-7 com o PAR imobilizado) fixos na extremidade do feixe bifurcado.

A Figura 19 ilustra o optodo de PAR imobilizado nas resinas XAD-7 e XAD-4 construído para a avaliação dos procedimentos de imobilização do PAR e de determinação de metais pesados.

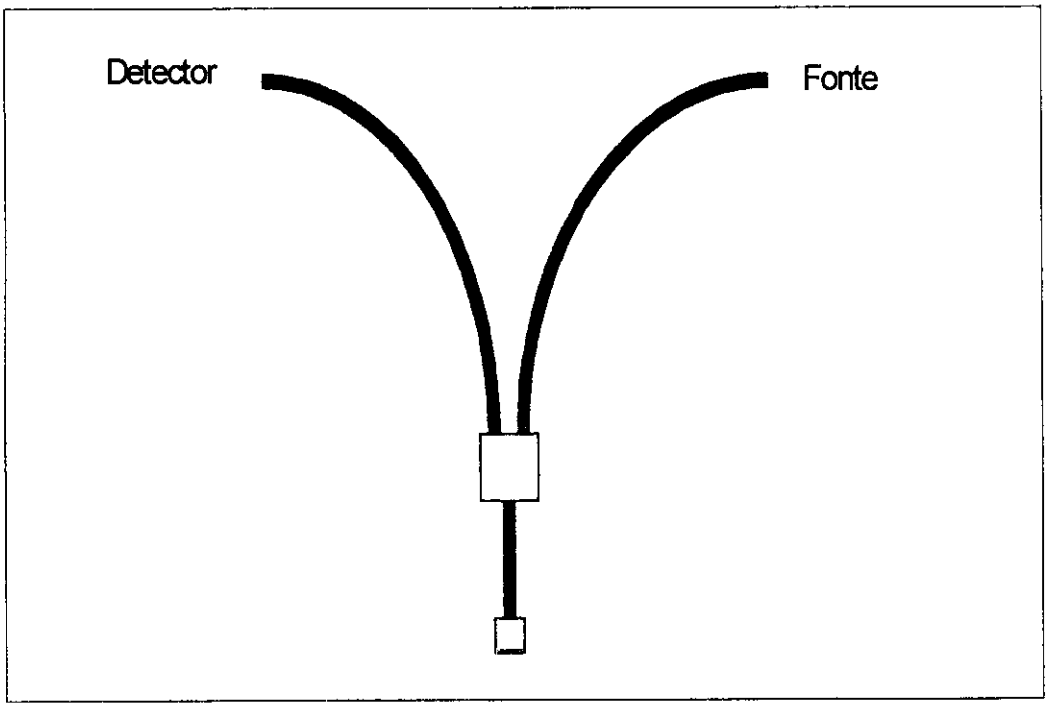


Figura 19: Optodo com PAR imobilizado na resina XAD-4 ou XAD-7.

4.3.1.1 – Avaliação do Procedimento de Imobilização do PAR

O procedimento de imobilização do PAR nas resinas XAD-7 e XAD-4 foi avaliado analisando-se os espectros de reflectância difusa (400 a 700 nm) destes sistemas. Os espectros foram obtidos após o optodo permanecer

mergulhado em um béquer contendo 20 mL de uma solução tampão universal. Utilizou-se, nesta avaliação, soluções tampão com diferentes valores variando de pH 2 a 11. Após o optodo permanecer mergulhado por 3 minutos em cada uma das diferentes soluções tampão usadas, registrou-se os espectros e repetiu-se a aquisição deste espectro em intervalos de 3 minutos. O volume de 20 mL foi o escolhido por ser o volume necessário para encobrir a fase sensora do optodo e por permitir a colocação de uma pequena barra metálica entre a fase sensora e o fundo do béquer para se processar a agitação da solução tampão, que foi realizada com o auxílio de um agitador magnético.

Como os espectros de reflectância do PAR/XAD-7 apresentaram grandes flutuações nos diferentes valores de pH, não foi possível definir um tempo de resposta para este optodo, pois não havia uma estabilização dos espectros de reflectância. Para uma melhor avaliação da resposta do optodo optou-se por fixar um valor de pH em que seriam obtidos os espectros. Adotou-se a utilização da solução tampão universal pH 9,0, por ser o valor de pH mais empregado em determinações espectrofotométricas de metais pesados usando o PAR como reagente complexante. Outro fator que contribuiu para a escolha deste valor de pH foi um estudo realizado por Saldanha et. al[108]. que demostraram a maior estabilidade dos complexos PAR-metal neste valor de pH.

A Figura 20 mostra os espectros de reflectância difusa (400 a 700 nm) do PAR/XAD-7 mergulhado no tampão universal pH 9,0 obtidos em intervalos de 3 minutos conforme relatado acima.

Nota-se pela Figura 20 a ocorrência de uma grande flutuação aleatória na intensidade dos espectros de reflectância do PAR/XAD-7, impossibilitando a definição de um tempo de resposta para o optodo já que não ocorria uma estabilização dos espectros de reflectância. Duas hipóteses foram levantadas para a ocorrência destas flutuações: formação de bolhas de ar na fase sensora durante a agitação da solução ou o entumescimento da resina XAD-7 por absorção de água devido ao seu caráter parcialmente hidrofílico. A hipótese mais provável é a segunda, pois o experimento foi repetido várias vezes obtendo-se

resultados similares aos mostrado na Figura 20. Outro fator que reforça esta segunda hipótese é o fato dos espectros do PAR/XAD-4, que foram obtidos na mesmas condições, não terem apresentado estas mesmas flutuações como será relatado a seguir.

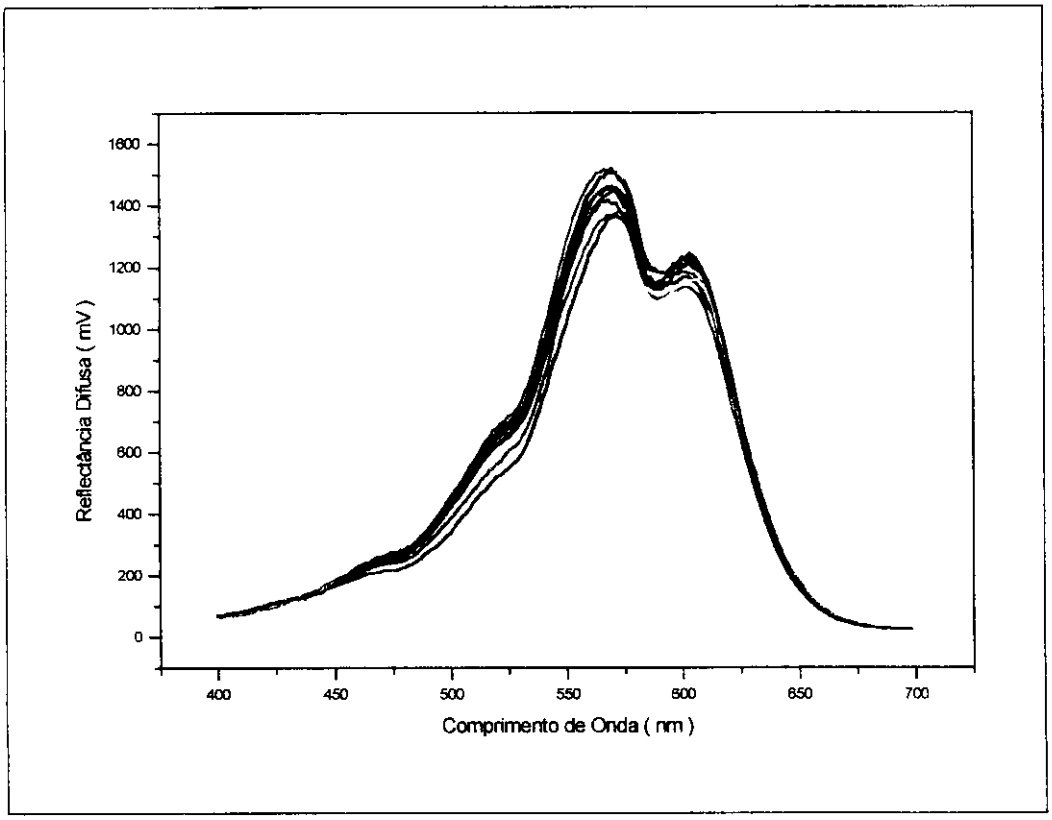


Figura 20: Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-7 em pH 9,0 obtidos em intervalos de 3 minutos

A Figura 21 mostra os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 obtidos após o optodo permanecer mergulhado na solução tampão pH = 9,0. Os espectros foram obtidos em intervalos de 3 minutos. Nota-se, pela Figura, uma melhora significativa na repetibilidade dos espectros de reflectância do PAR/XAD-4 em relação aos espectros do PAR/XAD-7, tendo ocorrido a estabilização dos espectros após 6 minutos de contato do optodo com a solução tampão pH 9,0.

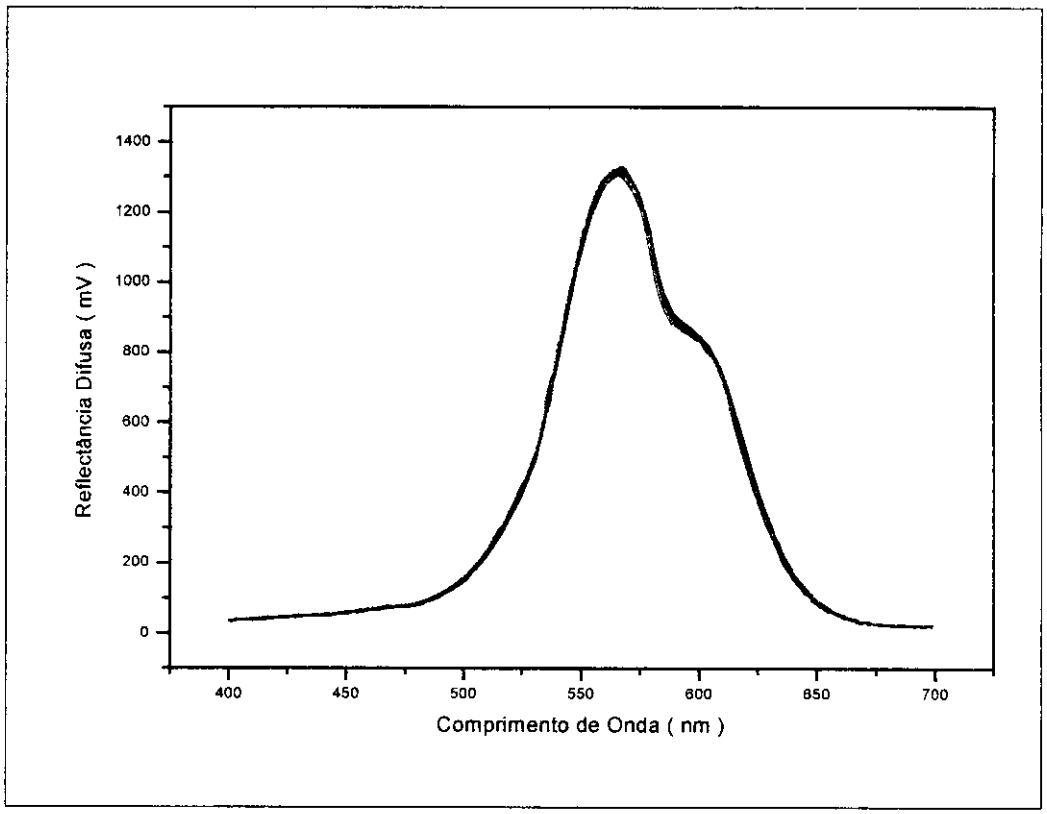


Figura 21: Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-4 em pH 9,0 obtidos em intervalos de 3 minutos

Levando-se em consideração os resultados mostrados nas Figuras 20 e 21 decidiu-se pela utilização do optodo contendo o PAR imobilizado na resina XAD-4 para o desenvolvimento de um procedimento de determinação de metais pesados. Porém, antes de desenvolver este procedimento decidiu-se aprofundar o estudo sobre o procedimento de imobilização do PAR na resina XAD-4.

4.3.1.2 – Estudos sobre a Imobilização do PAR na Resina XAD-4

Comparando-se o tempo de imobilização e a concentração da solução do reagente complexante usados inicialmente neste trabalho com os valores usados em outros trabalhos que tratam deste assunto, como no caso do trabalho de Malcik et al.[27] que realizam a imobilização de diversos reagentes em

vários suportes sólidos usando um tempo de 3 horas e uma concentração de 0,1% (m/v), nota-se que os valores inicialmente adotados neste trabalho eram elevados e por isso decidiu-se realizar alguns estudos sobre estes parâmetros.

Inicialmente, estudou-se a influência da variação do tempo de imobilização do PAR empregando-se três tempos de imobilização diferentes (6, 4 e 2 horas). A avaliação deste estudo foi feito comparando-se os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 após o optodo permanecer mergulhado em 20 mL de uma solução tampão pH 9,0 por 6 minutos, tempo necessário para ocorrer a estabilização do espectros conforme relatado no item 4.3.1.1. A Figura 22 mostra que os espectros do PAR/XAD-4 obtidos nos diferentes tempos de imobilização tem perfis e intensidade similares indicando que o tempo de duas horas já era suficiente para se processar a imobilização do PAR na resina XAD-4.

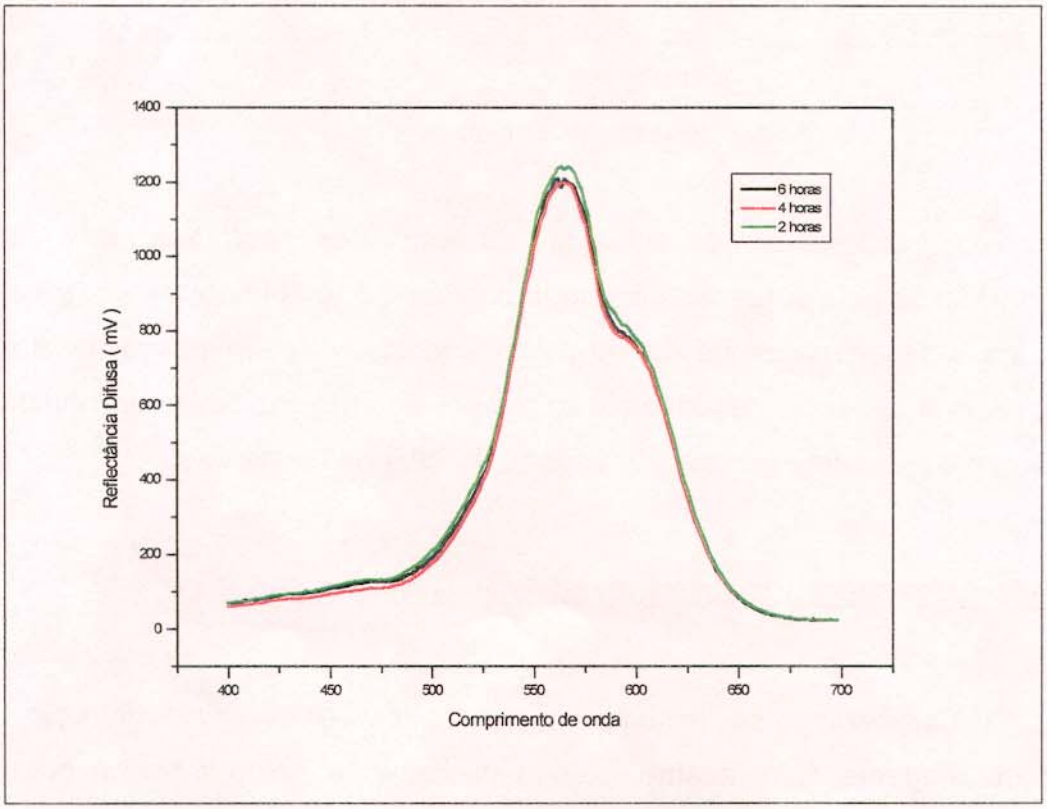


Figura 22: Espectros de reflectância do PAR/XAD-4 em pH 9,0 usando diferentes tempos de imobilização

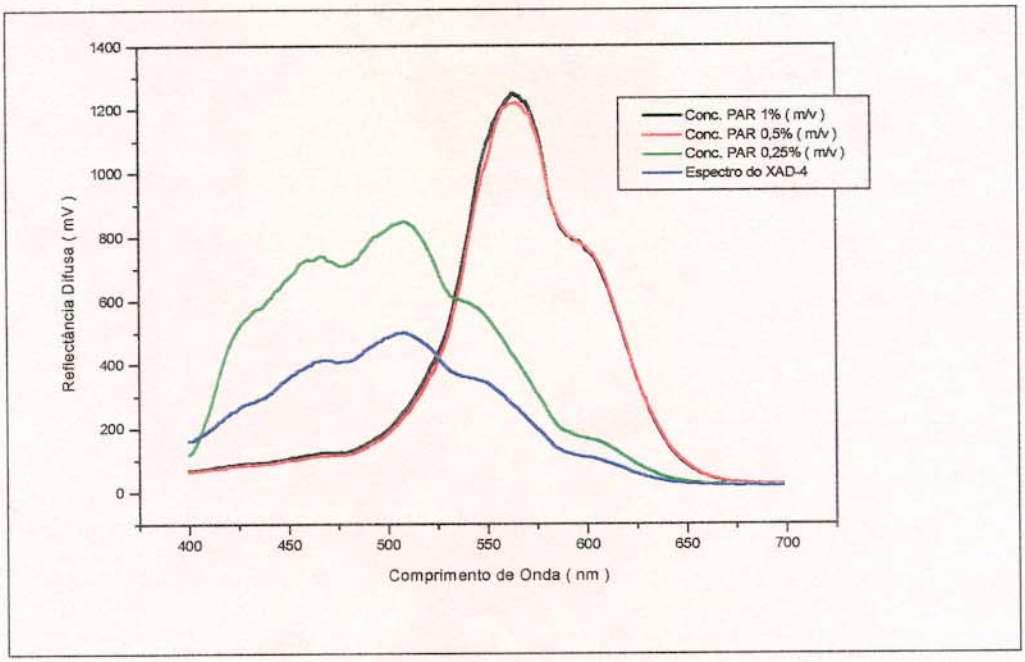


Figura 23: Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-4 imobilizado utilizando diferentes concentrações da solução de PAR em metanol (1% ; 0,5% e 0,25%) e o espectro de reflectância XAD-4.

Após a decisão de diminuir o tempo de imobilização do PAR na resina XAD-4 de 6 horas para 2 horas estudou-se a influência da variação da concentração da solução de PAR em metanol utilizando três concentrações diferentes de PAR em metanol (1%, 0,5% e 0,25%, (m/v)). Avaliou-se a influência desta variação comparando-se os espectros do PAR/XAD-4 após o optodo permanecer mergulhado em 20 ml de uma solução tampão pH 9,0 por 6 minutos. A Figura 23 mostra que o perfil e a intensidade dos espectros do PAR/XAD-4 obtidos utilizando-se as soluções de PAR em metanol de 1% e 0,5% eram muito parecidos, enquanto o espectro do PAR/XAD-4 obtido utilizando-se a solução de PAR em metanol de 0,25% tinha perfil e intensidade muito diferente dos dois anteriores, sendo parecido com o espectro da resina XAD-4, indicando

que a resina XAD-4 não adsorve significativamente o PAR usando a solução de 0,25% durante o tempo de imobilização de 2 horas.

Com base nos resultados acima obtidos o procedimento de imobilização do PAR na resina XAD-4 passou-se a consistir em misturar em um béquer 0,08 g da resina com 5 mL de uma solução de PAR em metanol 0,5% (m/V) mantendo-se esta mistura sob agitação constante por 2 horas.

4.3.1.3 – Determinação de Metais Pesados

O procedimento para a determinação de íons metálicos consistiu em mergulhar, inicialmente, o optodo PAR/XAD-4 em 20 ml de uma solução tampão pH 9,0, para ajustar o pH da fase sensora e permitir a reação do PAR com o metal. Em seguida, o optodo foi mergulhado em 20 ml de uma solução padrão de um íon metálico em pH 9,0 para formação do complexo Metal-PAR/XAD-4. Em seguida, regenerou-se a fase sensora, ou seja, removendo-se os íons metálicos que complexaram com o PAR imobilizado mergulhando o optodo em 20 mL de uma solução de HCl 10% (v/v).

Para a completar o procedimento acima deve-se definir o tempo que o optodo deveria permanecer mergulhado em cada uma das soluções acima citadas. Definiu-se o tempo de permanência do optodo na solução tampão pH 9,0 realizando-se o mesmo procedimento descrito no item 4.3.1.1 e verificou-se nos espectros de reflectância obtidos o tempo em que ocorria a estabilização do sinal. Concluiu-se que seis minutos eram necessários para que a intensidade dos espectros de reflectância atingisse a estabilidade.

Para a definição do tempo de permanência do optodo na solução padrão do íon metálico mergulhou-se o optodo em 20 mL de uma solução padrão de Ni(II) 5 mg/L e em seguida, registrou-se o espectro de reflectância em intervalos de 3 minutos e constatou-se que após seis minutos a intensidade dos espectros de reflectância permanecia constante. Na definição do tempo de permanência do optodo na solução de HCl 10% foi adotado o seguinte

procedimento, inicialmente o optodo foi mergulhado, por 6 minutos, em 20 mL de uma solução tampão pH 9,0 registrando-se o espectro de reflectância do PAR/XAD-4, depois foi mergulhado, por 6 minutos, em 20 mL de solução padrão de Ni(II) 5 mg/L, em seguida foi mergulhado por um minuto em 20 mL de HCl 10%, depois, novamente, mergulhado por 6 minutos em 20 mL da solução tampão pH 9,0 registrando-se o espectro do PAR/XAD-4. O tempo que o optodo permanecia mergulhado na solução de HCl 10% foi aumentado em um minuto a cada novo procedimento de regeneração até que o espectro do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 depois do procedimento de regeneração tivesse uma intensidade muito próxima do espectro do PAR/XAD-4 em pH 9,0 antes de iniciar o procedimento de regeneração. Realizando-se este estudo constatou-se que o optodo deveria permanecer mergulhado na solução de HCl 10% por 5 minutos, pois a partir deste intervalo de tempo os espectros do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 apresentavam intensidade similares a do espectro em pH 9,0 antes do procedimento de regeneração. A Figura 24 mostra os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 antes de iniciar o procedimento de regeneração e após sucessivas regenerações realizadas mergulhando-se o optodo na solução de HCl 10% por 5 minutos. Pode-se dizer por esta Figura que a regeneração do optodo realmente se processa mergulhando-se o optodo na solução de HCl por 5 minutos, uma vez que os espectros obtidos são similares.

Com os estudos acima relatados decidiu-se que seria adotado o seguinte procedimento na construção de curvas analíticas para alguns íons metálicos, como Ni(II), Cd(II) e Co(II), inicialmente, mergulhou-se o optodo em um béquer contendo 20 mL de uma solução tampão pH 9,0 por 6 minutos, registrando-se o espectro de reflectância (400 a 700 nm) do PAR/XAD-4 após este intervalo de tempo. Em seguida, mergulhou-se o optodo em 20 mL de uma solução padrão do íon metálico por 6 minutos, registrando-se o espectro de reflectância do PAR-Metal/XAD-4. Depois mergulhou-se o optodo em 20 ml de uma solução de HCl 10% por 5 minutos.

Na obtenção desta curvas analíticas foram empregadas cinco soluções padrão de diferentes concentrações para cada um dos metais estudados, usando-se uma faixa de concentração até 10 mg/L.

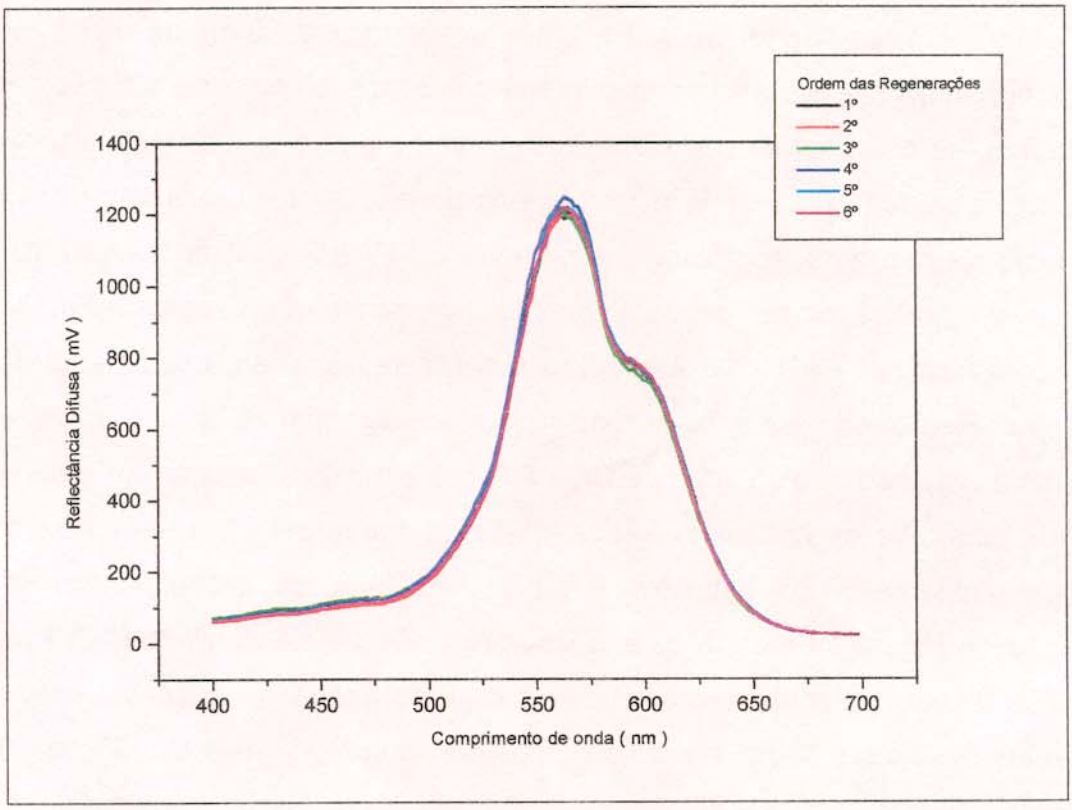


Figura 24: Espectros de reflectância difusa PAR/XAD-4 em pH 9,0 obtidos após sucessivos procedimentos de regeneração

4.3.1.4 – Curvas Analíticas para Ni(II), Cd(II) e Co(II)

Os espectros de reflectância dos complexos Metal-PAR/XAD-4 utilizados na construção das curvas analíticas dos três metais acima citados apresentam o mesmo comportamento, ou seja, a intensidade dos espectros de reflectância (400 a 700 nm) dos complexos diminuíam com o aumento da concentração da solução padrão do íon metálico usada na obtenção do complexos. Este fato ocorre devido a uma mudança de coloração da fase sensora (PAR/XAD-4) de laranja para vermelho ou vermelho-violeta devido a formação do

complexo metálico (PAR-Metal/XAD-4). A coloração do complexo metálico fica mais intensa à medida que a concentração do metal na solução aumenta tornando a intensidade do espectro menor na região espectral estudada. A Figura 25 ilustra o comportamento dos espectros de reflectância obtidos para os metais mostrando os espectros dos complexos Ni-PAR/XAD-4 formados utilizando-se soluções padrão de Ni(II) em concentrações diferentes.

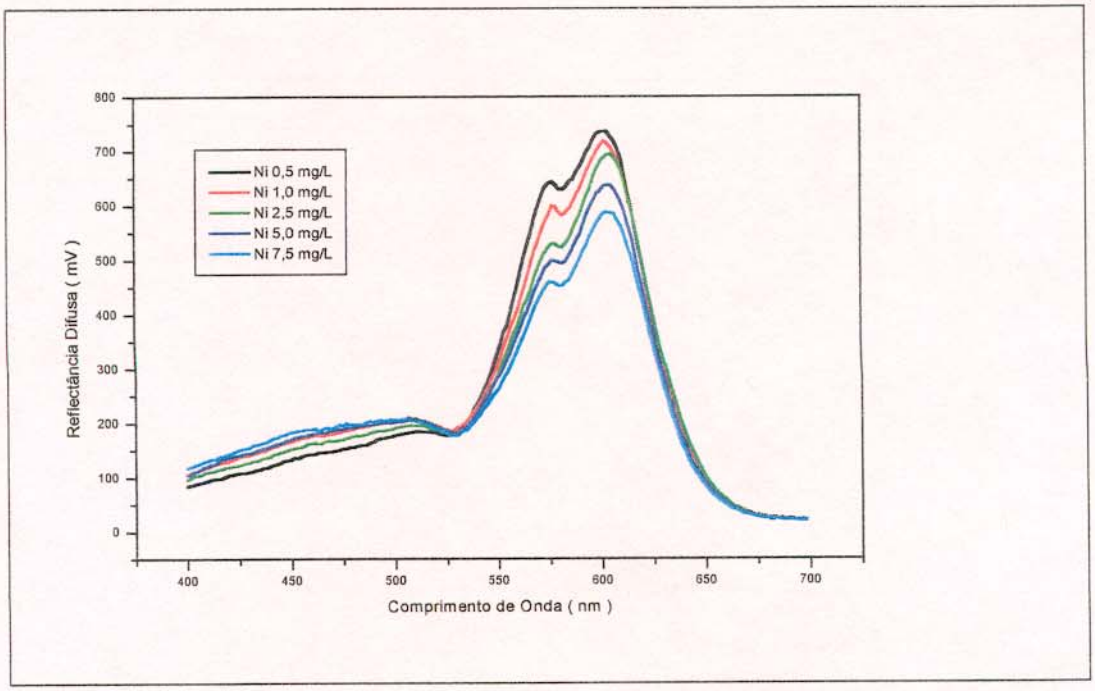


Figura 25: Espectros de reflectância dos complexos Ni-PAR/XAD-4 em pH 9,0

As curvas analíticas para Ni(II), Cd(II) e Co(II) foram construídas plotando-se os valores de reflectância relativa no comprimento de onda de máxima reflectância para os diferentes complexos metálicos versus a concentração da solução padrão do íon metálico usada na obtenção do espectro do complexo formado. A reflectância relativa (Rr) é obtida segundo a equação (XXII)

$$Rr = R_{máx} - R \qquad (XXII)$$

Onde $R_{máx}$ é o maior valor de reflectância obtido para cada metal na construção das curva analíticas e R é o valor de reflectância obtido para cada concentração.

A Figura 26 mostra as curvas analíticas obtidas para os metais Ni(II), Cd(II) e Co(II). A Tabela 3 mostra o comprimento de onda de máxima reflectância usada na obtenção das curvas analíticas a equação de reta obtida , a faixa de concentração estudada e coeficiente de correlação das curvas analíticas, mostradas na Figura 26.

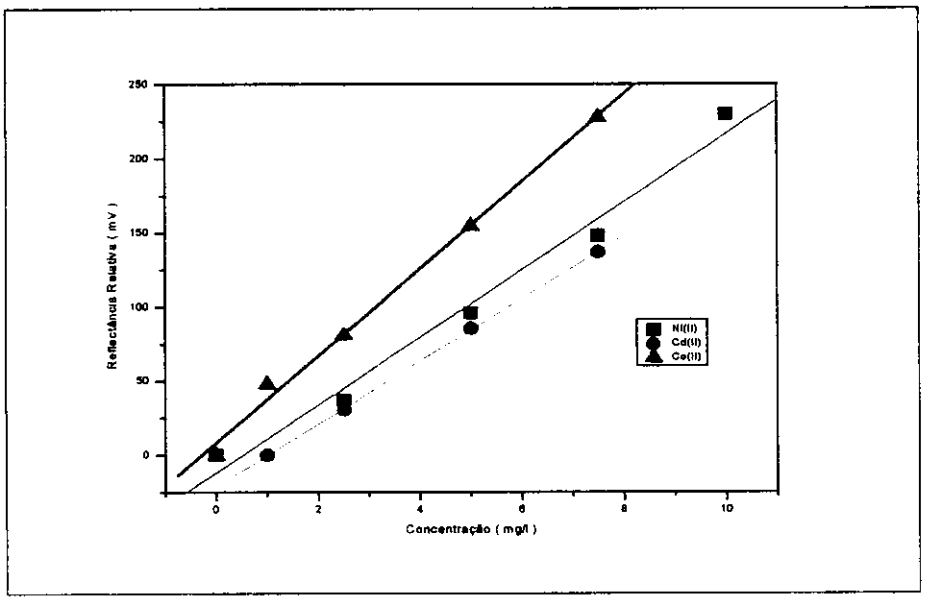


Figura 26: Curvas analítica de Ni(II), Cd(II) e Co(II)

Com os dados mostrados na Tabela 3 pode-se dizer que o optodo de PAR imobilizado na resina XAD-4 desenvolvido apresenta bom desempenho, podendo ser utilizado na obtenção de curvas analíticas para alguns metais como Ni(II), Cd(II) e Co(II) em uma faixa de concentração semelhante a outros trabalhos. O problema observado durante a utilização deste optodo operado em volume fixo de analito foi a dificuldade de regeneração da fase sensora à medida em que o optodo era utilizado, principalmente na obtenção de novas curvas analíticas. Este fato foi constatado através da observação da diminuição da intensidade dos espectros de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 à medida que outras determinações eram realizadas.

Tabela 3: Curvas analíticas de Ni(II), Cd(II) e Cd(II) obtidas com o optodo operado em volume fixo.

Metal	λ (nm)	Curva Analítica	Faixa de linearidade (mg/L)	Coeficiente de Correlação
Ni	605	R = -12,0 + 22,8[Ni]	Até 10	- 0,992
Cd	603	R= -21,2 + 21,2[Cd]	1- 7,5	- 0,999
Co	598	R = 8,28 + 29,4[Co]	Até 7,5	- 0,997

Com os dados mostrados na Tabela 3 pode-se dizer que o optodo de PAR imobilizado na resina XAD-4 desenvolvido apresenta bom desempenho, podendo ser utilizado na obtenção de curvas analíticas para alguns metais como Ni(II), Cd(II) e Co(II) em uma faixa de concentração semelhante a outros trabalhos. O problema observado durante a utilização deste optodo operado em volume fixo de analito foi a dificuldade de regeneração da fase sensora à medida em que o optodo era utilizado, principalmente na obtenção de novas curvas analíticas. Este fato foi constatado através da observação da diminuição da intensidade dos espectros de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 à medida que outras determinações eram realizadas.

A Figura 27 ilustra este comportamento mostrando a variação do valor da reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 no comprimento de onda de máxima reflectância (λ = 560 nm). Pode-se observar por esta Figura que a partir da oitava regeneração a intensidade da reflectância do PAR/XAD-4 no comprimento de onda de máxima reflectância cai a cada nova regeneração indicando uma dificuldade de regeneração da fase sensora devido, muito provavelmente, a uma dificuldade de contato da solução de regeneração nas partes mais internas da fase sensora próximas a extremidade do feixe bifurcado de fibras ópticas. Devido as dificuldades encontradas na regeneração da fase sensora decidiu-se estudar a possibilidade de se operar o optodo de PAR/XAD-4 em fluxo continuo, pois acreditou-se que neste modo de operação haveria um maior contato das soluções com a fase sensora.

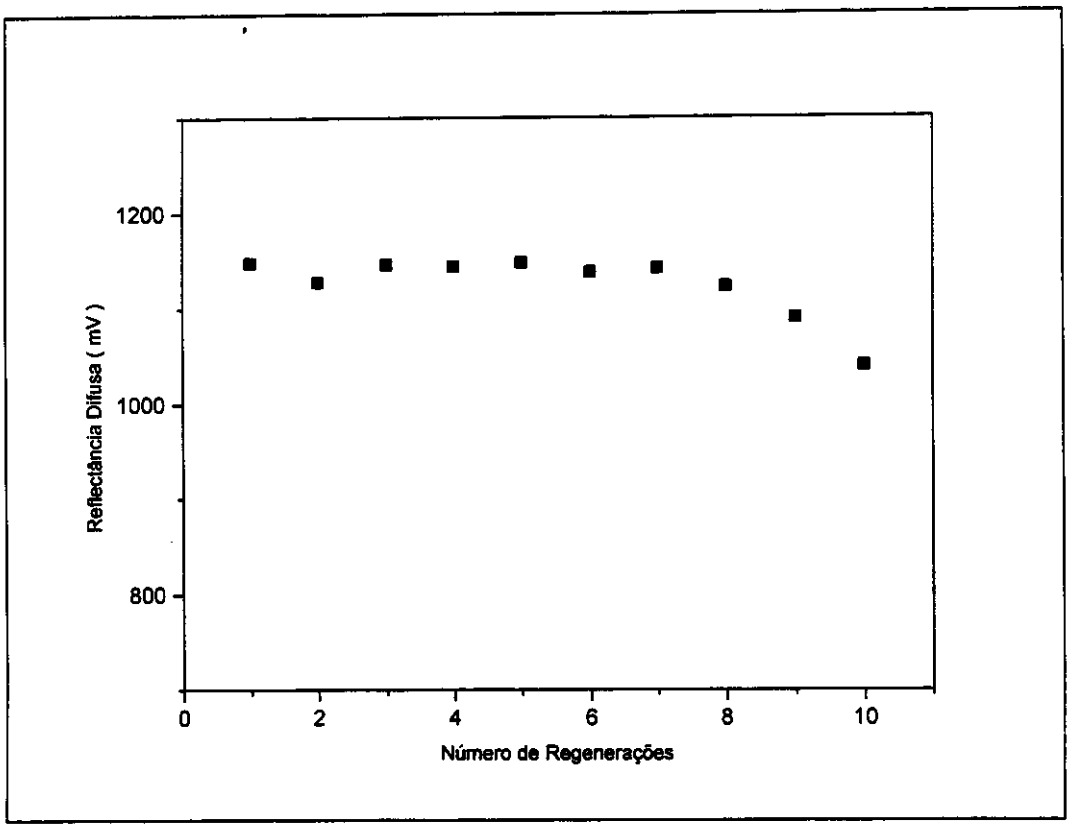


Figura 27: Valor da reflectância do PAR/XAD-4 após dez regenerações sucessivas.

4.3.2 – Optodo Operado em Fluxo Continuo

O primeiro passo realizado para operar o optodo PAR/XAD-4 em fluxo continuo foi construção de uma cela de fluxo, que retivesse a fase sensora presa à extremidade do feixe bifurcado de fibras óptica e permitisse a passagem do fluxo por esta fase sensora. A cela de fluxo, mostrada na Figura 28, é construída utilizando-se um bloco de acrílico (3,5 cm x 2,5 cm x 1,5 cm). Este bloco apresenta uma região central de 0,8 cm de diâmetro e 0,1 mm de profundidade utilizada para acomodar a fase sensora. A parte inferior desta região central contem dois orifícios com 1 mm de diâmetro onde são colados dois tubos de polietileno para permitir a passagem de fluxo pela fase sensora.

O sistema de fluxo continuo foi montado conectando-se cada um dos dois tubos de polietileno a tubos de tygon. Um destes tubos é conectado a uma bomba peristáltica e o outro é conectado a um outro tubo de polietileno que leva a solução para um frasco de descarte. A vazão usada neste sistema foi de 1,5 mL/min.

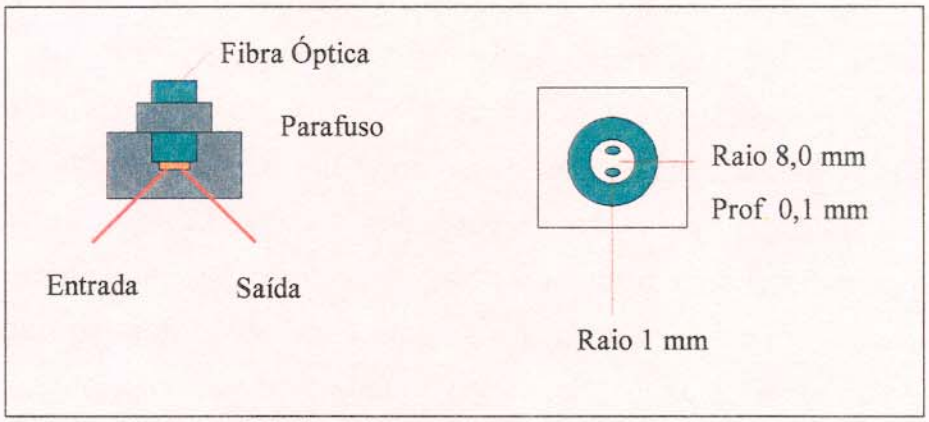


Figura 28: Representação da cela de fluxo

4.3.2.1 – Determinação de Metais Pesados

O procedimento utilizado para a determinação de metais pesados usando o optodo operado em fluxo é o mesmo do adotado na operação do optodo a volume constante, ou seja, a fase sensora do optodo deve ser inicialmente exposta a uma solução tampão pH 9,0, depois a uma solução padrão do íon metálico e em seguida a uma solução de HCl 10% para a regeneração da fase sensora.

A definição do tempo de passagem do fluxo contendo a solução tampão pH 9,0 pela fase sensora foi realizada passando-se a solução tampão pela fase sensora em intervalos de 30 segundos, registrando-se os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 após cada intervalo de tempo até que houvesse uma estabilização dos espectros de PAR/XAD-4. Verificou-se, inicialmente, que o

tempo de 3 minutos era suficiente para a estabilização dos espectros do PAR/XAD-4, porém constatou-se durante a realização de alguns experimentos a ocorrência de flutuações aleatórias nestes espectros de reflectância após a passagem do fluxo contendo o tampão pH 9,0 por 3 minutos. A ocorrência destas flutuações nos espectros de reflectância deveu-se muito provavelmente a formação de bolhas de ar durante a passagem do fluxo provocam uma alteração no índice de refração da fase sensora ocasionando as flutuações. Por esta razão, as operações de colocação da fase sensora na cela de fluxo deveriam ser realizadas com um cuidado maior afim de se obter um bom empacotamento da fase sensora evitando a presença de espaços vazios na fase sensora e consequentemente dificultando a formação de bolhas de ar. No caso da definição do tempo de passagem do fluxo contendo as soluções padrão dos íon metálicos deve ser levado em consideração a saturação da fase sensora, ou seja, o volume de solução padrão do íon metálico não pode provocar a complexação de todo o reagente presente na fase sensora. Por esta razão, a definição do tempo de passagem destas soluções deve ser precedido de um estudo de saturação da fase sensora, que é realizado utilizando-se soluções padrão do íon metálico com concentrações dentro da faixa de interesse.

O estudo de saturação da fase sensora foi realizado utilizando soluções padrão de Ni(II) 2,0 e 10 mg/L e consistiu em passar pela fase sensora um fluxo contendo a solução tampão pH 9,0 por 3 minutos e em seguida passar o fluxo contendo a solução padrão de Ni(II) 2,0 ou 10 mg/L em intervalos de 20s registrando-se o espectro de reflectância do complexo formado a cada intervalo de tempo. A Figura 29 mostra os espectros de reflectância obtidos e verifica-se que a intensidade dos espectros cai com o aumento da concentração do metal na fase sensora em virtude da passagem da solução. Nota-se, ainda, pela Figura que este decréscimo é muito maior nas primeiras injeções e vai diminuindo com o aumento do intervalo de tempo, indicando a saturação da fase sensora.

O tempo de passagem do fluxo contendo a solução padrão do íon metálico foi definido comparando-se as curvas de saturação da fase sensora

obtidas com a utilização das soluções de Ni(II) 2,0 e 10 mg/L. Através da comparação destas duas curvas de saturação concluiu-se que o tempo de 1 minuto era o ideal, pois neste intervalo de tempo há uma grande variação na intensidade dos espectros de reflectância obtidos com a utilização das soluções de 2,0 e 10 mg/L.

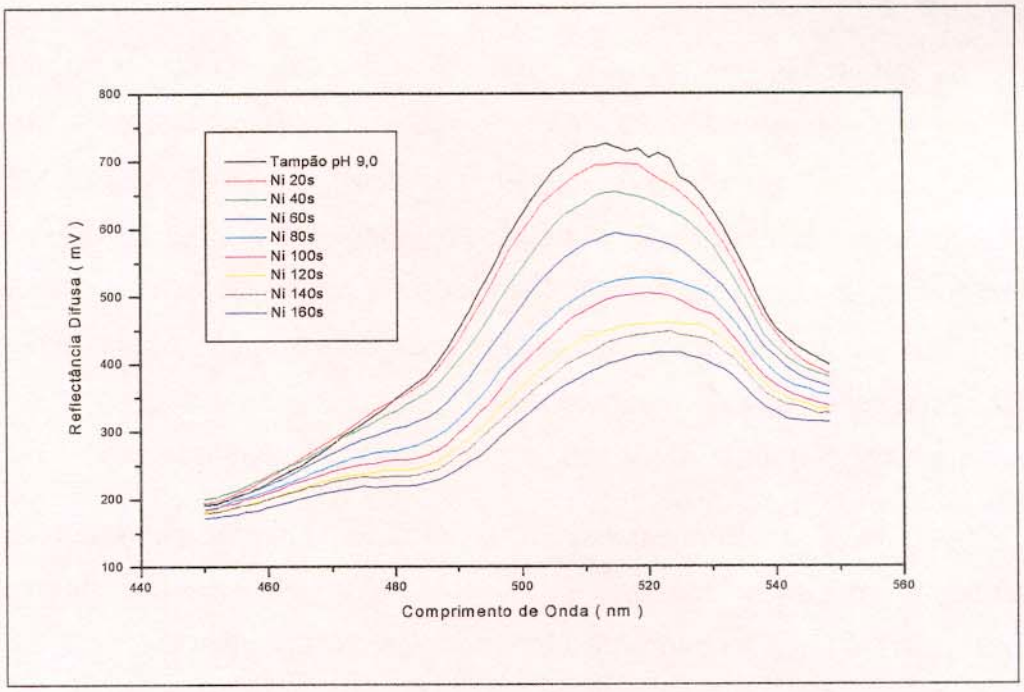


Figura 29: Curvas de saturação da fase sensora usando a solução de Ni(II) 10 mg/L

Na definição do tempo de passagem do fluxo contendo a solução de HCl 10% (V/V) utilizou-se o mesmo princípio usado com o optodo operado em volume fixo, ou seja, passa-se o fluxo contendo a solução de HCl em intervalos de tempo crescentes a cada nova etapa de regeneração até se atingir um tempo de passagem desta solução que produza um espectro de reflectância com a mesma intensidade do espectro de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 antes da reação do PAR/XAD-4 com o íon metálico. Concluiu-se que 3 minutos é o tempo necessário para regenerar a fase sensora usando-se HCl 10%.

Após o desenvolvimento do procedimento para a determinação de íons metálicos acima descrito iniciou-se a obtenção de curvas analíticas para vários metais. Porém, na realização destes experimentos constatou-se a ocorrência de flutuações aleatórias nos espectros de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 e dos complexos Metal-PAR/XAD-4 impossibilitando a obtenção de curvas analíticas para os metais estudados.

As flutuações nos espectros devem-se, provavelmente, a formação de bolhas de ar na fase sensora durante a passagem do fluxo. Por esta razão, decidiu-se modificar o sistema de fluxo continuo adotado com a introdução de um injetor para formar um sistema FIA (análise por injeção em fluxo). Este novo sistema tinham por objetivo reduzir o problema de formação de bolhas de ar na fase sensora, pois neste sistema há a passagem de uma solução continuamente pela fase sensora, chamada de fluído carregador, que dificulta a passagem de ar na fase sensora e consequentemente reduz a formação de bolhas de ar.

A figura 30 ilustra o sistema FIA construído. O injetor usado tem duas alças de amostragem, sendo uma para a solução de HCl 10% com um volume de 2,2 mL e outra para a solução padrão do íon metálico com um volume de 3 mL. A operação do sistema FIA consistiu em inicialmente carregar a alça do HCl, que após o seu preenchimento era deslocada, com o auxílio da alavanca do injetor, ao fluxo que passa pela fase sensora. Após a passagem do volume de HCl presente na sua alça de amostragem deixava-se passar pela fase sensora o fluído carregador, que é a solução tampão universal pH 9,0, até ocorrer o carregamento da alça da solução padrão do íon metálico. Após o preenchimento da alça da solução do íon metálico, esta era deslocada ao fluxo que passa pela fase sensora por um intervalo de 1 minuto.

Os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 e dos complexos Metal-PAR/XAD-4 continuaram apresentando flutuações aleatórias que impossibilitavam a obtenção de curvas analíticas. Estas flutuações foram associadas a formação de bolhas de ar na fase sensora, porém levou-se em consideração agora o fato destas flutuações estarem ocorrendo em virtude de um

empacotamento ruim da fase sensora devido a geometria da cela de fluxo. Por esta razão, decidiu-se alterar a geometria da cela construindo uma cela de fluxo em forma de "T", que permitisse um melhor empacotamento da fase sensora

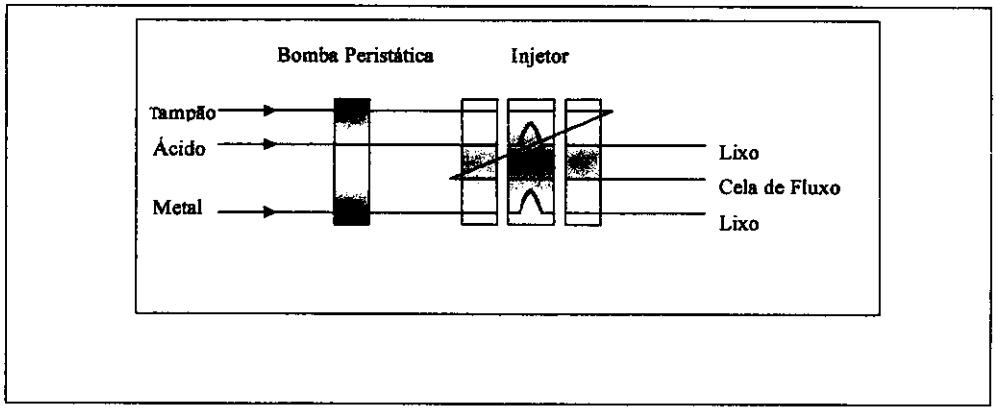


Figura 30: Representação esquemática do sistema FIA

4.3.3 - Optodo Operado em Fluxo com Cela em Forma de T

Construiu-se a cela de fluxo em forma de "T" utilizando um bloco de acrílico (2,5 cm x 2,0 cm x 1,5 cm). A cela construída contem uma perfuração cilíndrica de 6 mm de diâmetro na região central, que atravessa a cela, para a passagem do fluxo. A parte central desta perfuração tem um estreitamento em seu diâmetro para 0,7 mm. Este estreitamento tem uma extensão de 5 mm, onde a fase sensora era colocada. A fase sensora fica presa neste compartimento devido a telas de Nylon que eram presas em parafusos que compõem a cela, conforme pode ser visto na Figura 31. Nota-se pela Figura a existência de um terceiro parafuso utilizado para prender a cela de fluxo a extremidade de um feixe bifurcado de fibras ópticas. Devido a redução das dimensões da cela de fluxo realizou-se a substituição do feixe bifurcado de fibras ópticas de borosilicato utilizado na etapas anteriores por um feixe de fibras ópticas de plástico (Toray Europe, Londres) . Este feixe possui um diâmetro de 2 mm e foi bifurcado em uma das extremidades de tal forma a permitir que metade dos feixes

(16 fibras ópticas) fossem conectadas a fonte de luz e outra metade ao sistema de detecção. A distribuição dos feixes bifurcados foi realizada de tal forma que permitiu uma distribuição randômica entre as duas extremidades.

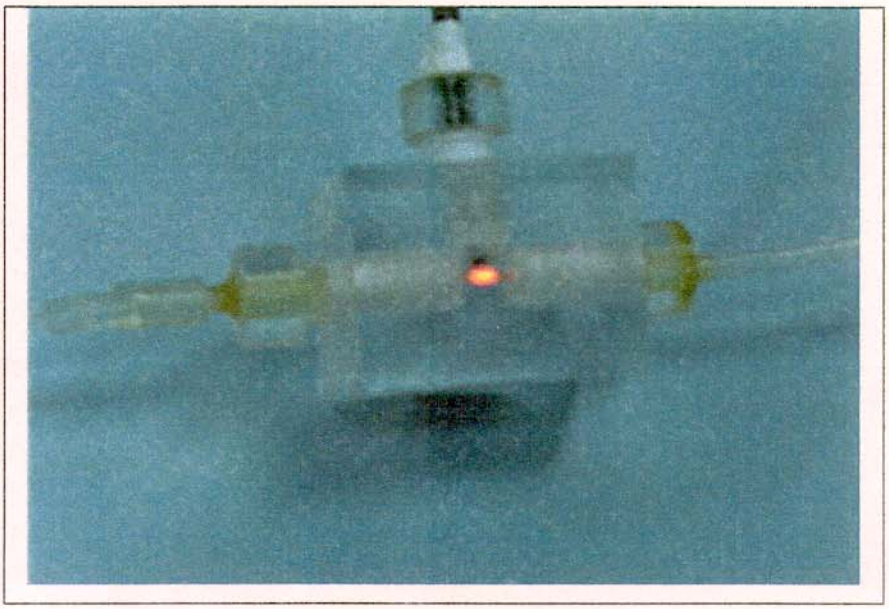


Figura 31: Foto da cela de fluxo em forma de "T"

Outra medida adotada com a finalidade de se obter uma melhor compactação da fase sensora foi a alteração da granulometria da resina XAD-4 utilizada na imobilização do PAR. Passou-se a utilizar a resina XAD-4 com granulometria entre 77 e 150 μm ao invés de 250 a 350 μm.

Realizou-se a operação da cela de fluxo em forma de "T" utilizando-se um sistema de fluxo parecido com o primeiro sistema de fluxo montado neste trabalho, realizando apenas a substituição dos tubos de tygon usados anteriormente por tubos mais estreitos devido a redução da dimensões da cela. Com estas alterações a vazão do sistema de fluxo passou de 1,5 mL/min para 1 mL/min.

O princípio utilizado no desenvolvimento do procedimento de determinação de metais foi similar aos descritos anteriormente, ou seja, inicialmente passou-se o fluxo contendo a solução tampão pH 9,0 para ajustar o pH da fase sensora, em seguida passou-se o fluxo contendo uma solução padrão do íon metálico para a formação dos complexo PAR-Metal e por último passou-se o fluxo contendo uma solução de HCl 10% para a regeneração da fase sensora. Os procedimentos realizados para determinar o tempo de passagem de cada uma das soluções acima citadas foram, também, os mesmos já descritos nos sistemas anteriores. Com estes estudos, concluiu-se que o procedimento para a determinação de metais pesados consistiu em passar pela fase sensora a solução tampão pH 9,0 por 3 minutos, depois a solução padrão do íon metálico por 1 minuto e depois a solução de HCl 10% por 3 minutos.

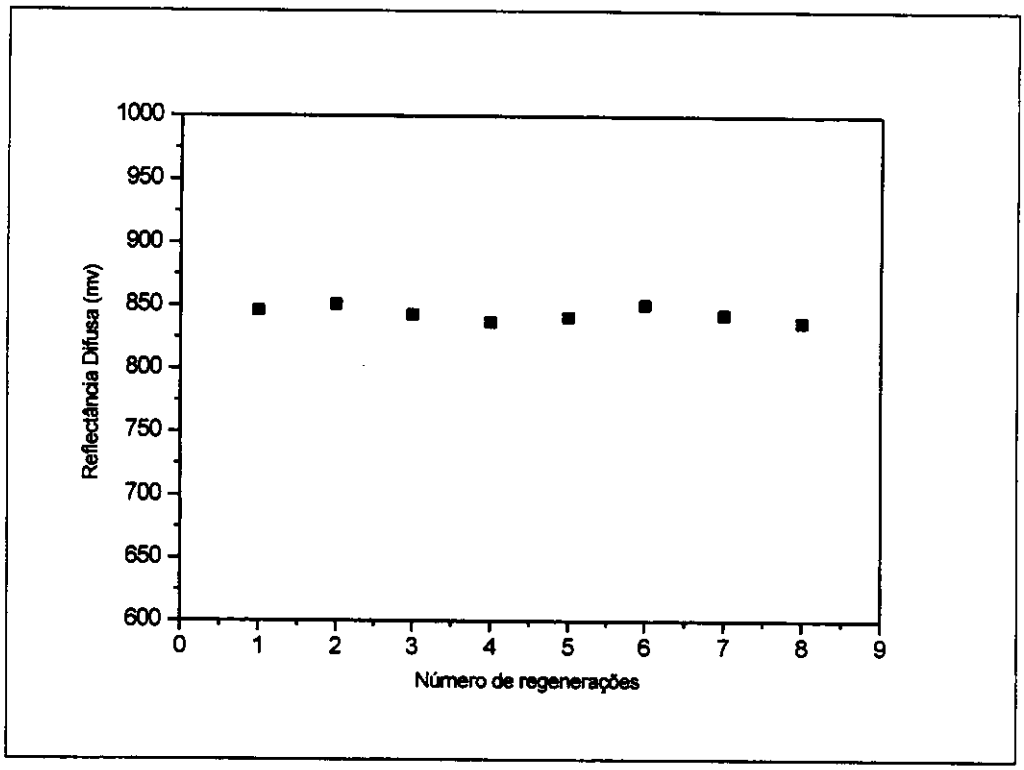


Figura 32: Valores de reflectância difusa do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 após oito regenerações sucessivas

A Figura 32 ilustra a melhora na repetibilidade dos espectros obtidos com este novo arranjo, mostrando os valores de reflectância (λ = 560nm) do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 após oito regenerações da fase sensora com HCl 10%, inicialmente com uma solução padrão de Ni(II) 4 mg/L.

Com a melhora na repetibilidade dos espectros do PAR/XAD-4 dos complexos Metal-PAR/XAD-4 decidiu-se realizar alguns estudos adicionais com este optodo, como por exemplo, a influência do uso de diferentes soluções tampão na resposta do optodo e um estudo sobre a lixiviação do PAR imobilizado na resina XAD-4 durante a passagem das soluções pela fase sensora.

4.3.3.1 - Influência do Uso de Tampões Diferentes

Na realização deste estudo utilizou-se os tampões borato pH 9,0 ; universal pH 9,0 e amônia-cloreto de amônia pH 9,0. Este estudo foi realizado analisando-se a resposta do optodo para soluções padrão de Ni(II) 2,0 e 10 mg/L preparadas nos três tampões. O procedimento adotado foi o mesmo utilizado no estudo sobre a saturação da fase sensora descrito no item 4.3.2.1. Inicialmente, passou-se um fluxo contendo a solução de um dos tampões citados acima, depois passou-se o fluxo contendo a solução padrão de Ni(II) 2,0 ou 10 mg/L em intervalos de 20s, obtendo-se os espectros de reflectância a cada novo intervalo de tempo.

Comparou-se a influência de cada tampão na resposta do optodo analisando-se os valores de reflectância no comprimento de onda de máxima reflectância (λ = 560 nm) dos complexos PAR-Metal formados utilizando as diferentes soluções tampões. As Figuras 33, 34 e 35 mostram os valores de reflectância obtidos para as duas soluções de Ni(II) 2,0 e 10 mg/L preparadas nos diferentes tampões

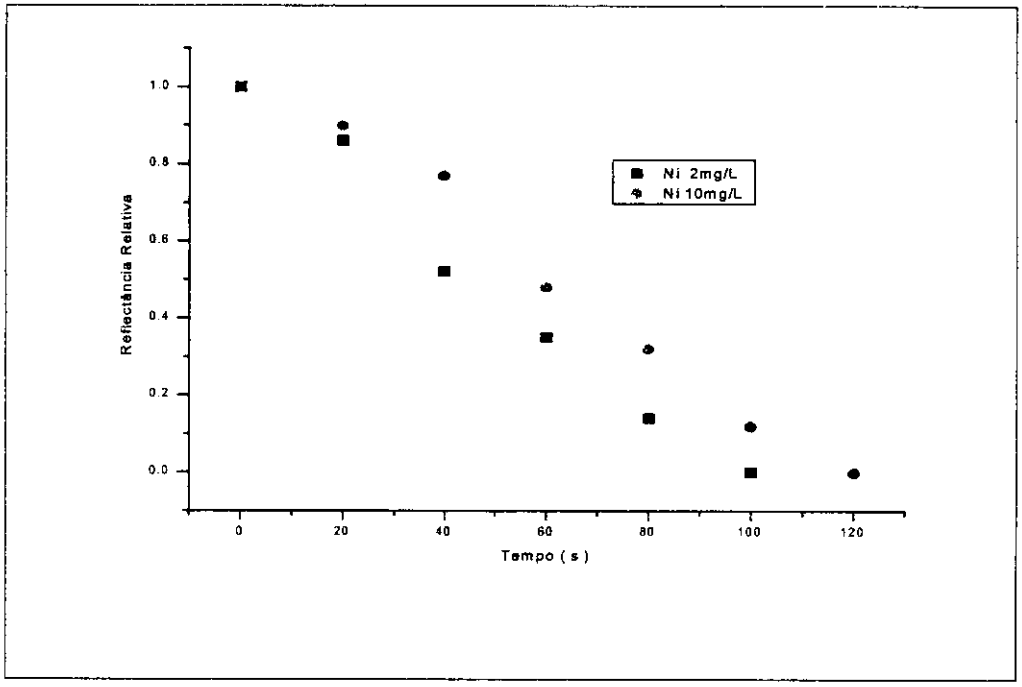


Figura 33: Valores de reflectância difusa do Metal -PAR/XAD-4 no tampão borato

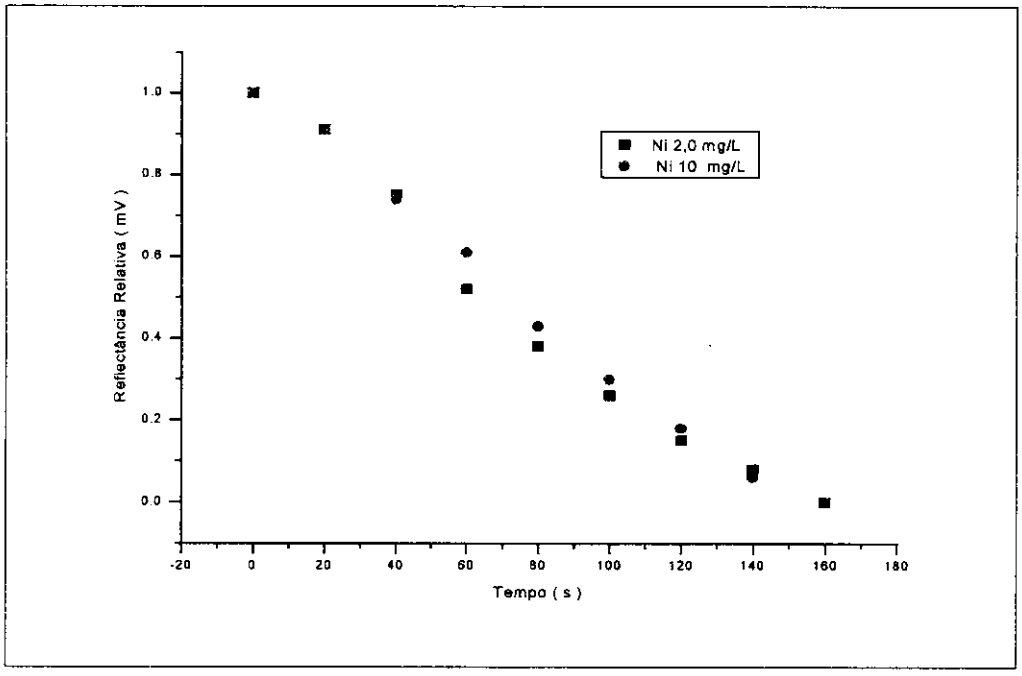


Figura 34: Valores de reflectância difusa do Metal-PAR/XAD-4 no tampão NH_3/NH_4

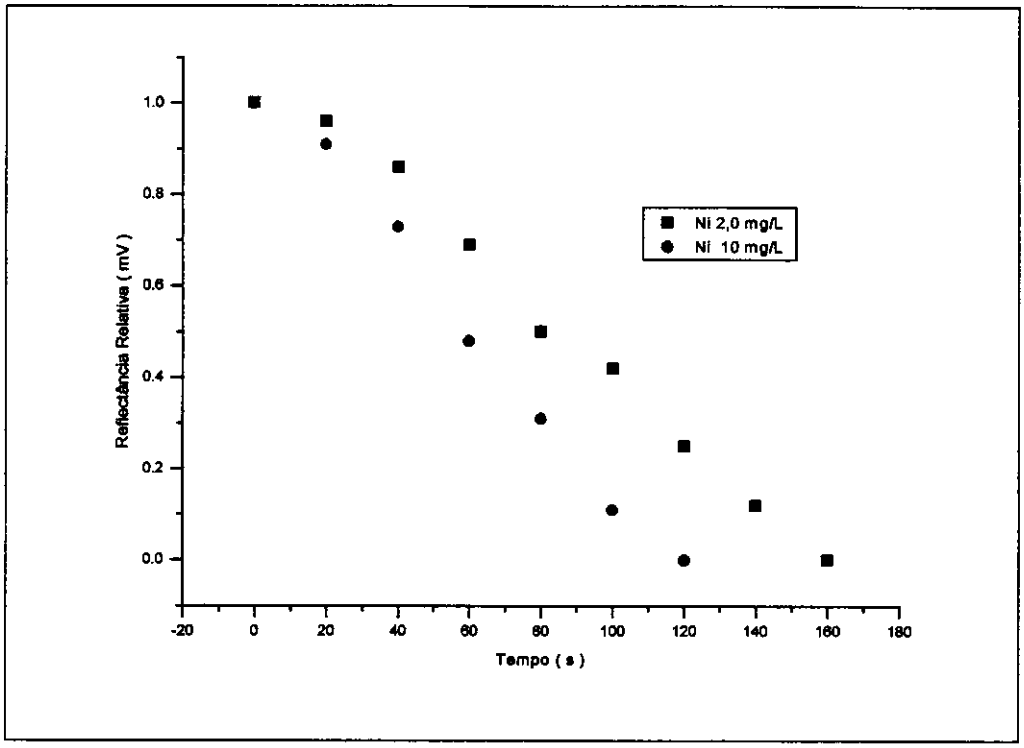


Figura 35: Valores de reflectância difusa do Metal-PAR/XAD-4 no tampão universal

Nota-se pelas Figuras 33, 34 e 35 a ocorrência de respostas inesperadas. Era esperado que o valor da reflectância no comprimento de onda máxima reflectância tivesse um decréscimo mais acentuado na passagem com a solução de 10 mg/L, pois de acordo com estudados já realizados neste trabalho constatou-se que a intensidade dos espectros de reflectância do PAR/XAD-4 na faixa de 400 a 700 nm sofre um decréscimo com a formação dos complexos PAR-Metal e que este decréscimo era maior à medida que era aumentada a concentração da solução do íon metálico. Porém, observando-se as Figuras 33 e 34 nota-se que o fato acima relatado não ocorria quando eram utilizados os tampões de borato e NH_3/NH_4Cl. Este comportamento inesperado para estes tampões deve-se muito provavelmente à complexação dos íons metálicos nestes tampões antes da passagem do fluxo pela fase sensora, o que dificultou a reação dos metais com o PAR. Por outro lado, no caso do tampão universal observa-se

pela Figura 35 que o resultado obtido era o esperado, ocorrendo um decréscimo no valor da reflectância muito mais acentuado para a solução de níquel 10 mg/L do que para a de 2 mg/L.

4.3.3.2 - Estudo sobre a Lixiviação do PAR

A lixiviação é um processo de desprendimento do reagente complexante do suporte sólido durante a operação do optodo. Dentre os vários métodos de imobilização existentes e relatados no item 1.1.2.1, o método de adsorção física, apesar de ser o mais utilizado, é que apresenta o maior risco de lixiviação devido ao fato de que as forças que mantém unidas as moléculas do reagente no suporte sólido serem as mais fracas se comparadas com outros métodos de imobilização.

Realizou-se um estudo sobre a lixiviação do PAR imobilizado na resina XAD-4 analisando-se os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão universal pH 9,0, após sucessivas regenerações da fase sensora com HCl 10%. Utilizou-se uma solução de níquel 4 mg/L na realização deste estudo.

Pela Figura 36 nota-se uma alteração no perfil dos espectros de reflectância do PAR/XAD-4 em pH 9,0 durante o processo de regeneração da fase sensora. Esta Figura 36 mostra seis espectros de reflectância do PAR/XAD-4 (500 a 650 nm) no tampão universal pH 9,0 após diferentes números de regenerações.

Os dois primeiros espectros mostrados na Figura 36 foram obtidos após as 10° e 11° regenerações, respectivamente. O terceiro e quarto espectros foram obtidos após 29° e 30° regeneração, respectivamente. Nota-se pela Figura duas importantes diferenças entre os dois primeiros espectros e os dois seguintes espectros. A primeira é que as intensidade dos 3° e 4° espectros caem bastante em relação aos dois primeiros espectros na região de 550 - 560 nm e a segunda é

que há um aumento na intensidade do 3º e 4º em relação aos dois primeiros na região que vai de 500 a 540 nm. Observa-se pela Figura 36 que o espectro do PAR/XAD-4 continua sofrendo alterações com o aumento do número de regenerações uma vez que os 5º e 6º espectros, obtidos após as 39º e 40º regenerações, respectivamente, apresentam um aumento na intensidade na faixa de 500 a 540 nm.

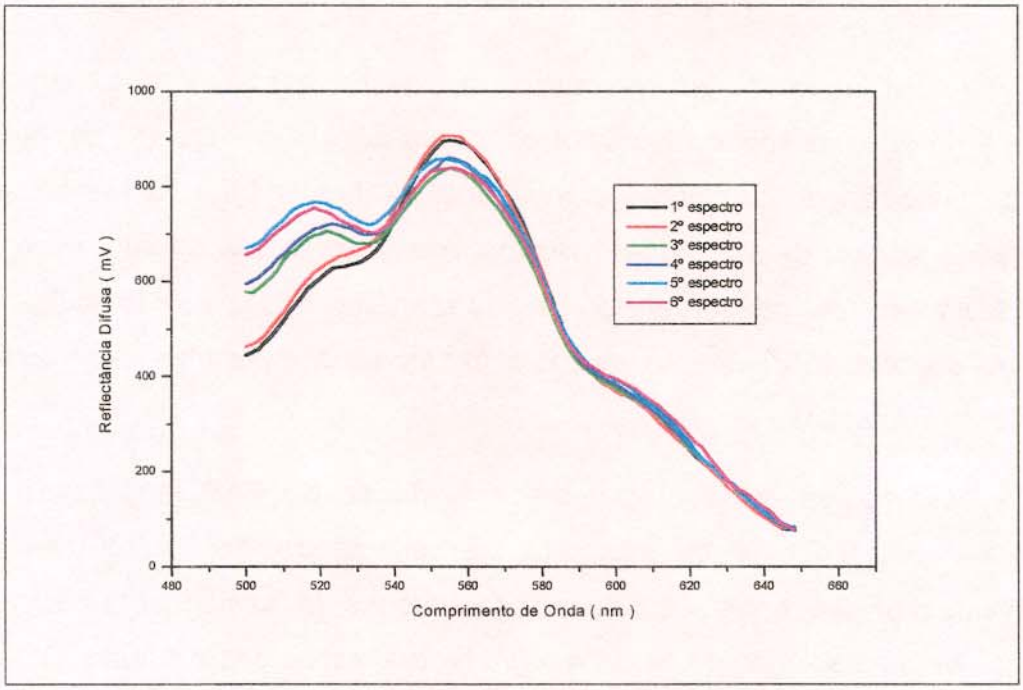


Figura 36: Espectros de reflectância difusa do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0 após diferentes número de regenerações

O estudo sobre a lixiviação do PAR imobilizado na resina XAD-4 permitiu constatar que este optodo pode ser utilizado até realizar 20 regenerações, pois os espectros de reflectância do PAR/XAD-4 no tampão universal pH 9,0 obtidos na 20 primeiras regenerações da fase sensora apresentam boa repetibilidade. A Figura 37 mostra os valores da reflectância obtidos no comprimento de onda de máxima reflectância do PAR/XAD-4 no tampão pH 9,0

após as 20 regenerações. As medidas apresentam uma estimativa do desvio padrão de 10%.

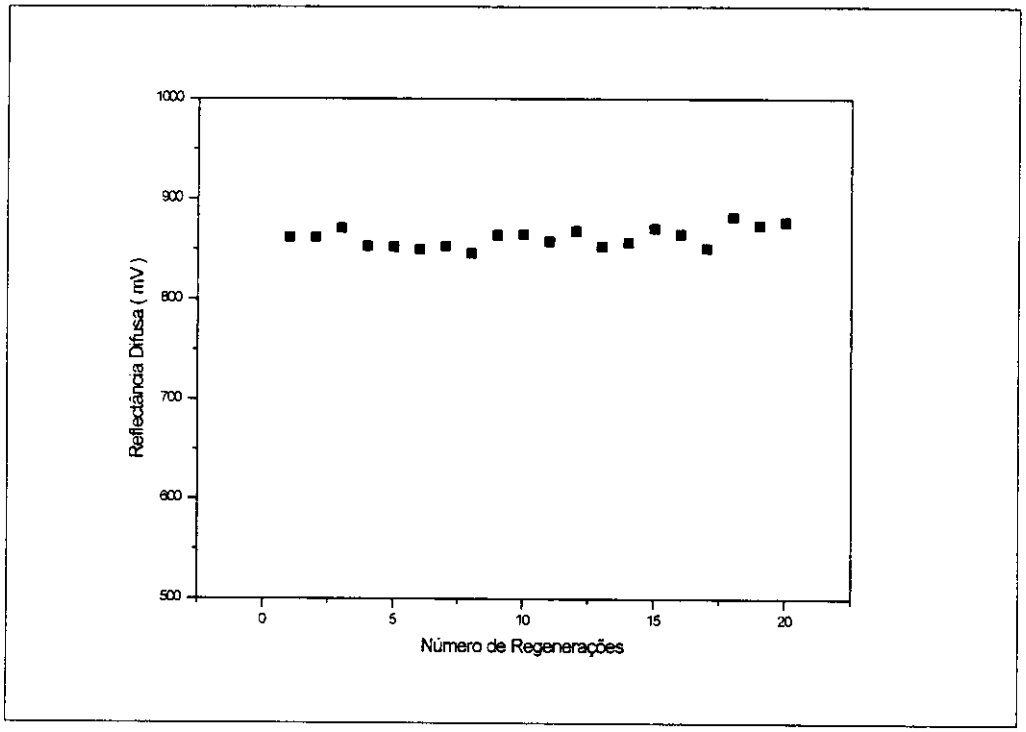


Figura 37: Valores de reflectância do PAR/XAD-4 (λ = 560) no tampão universal pH 9,0 em diferentes números de regeneração da fase sensora

4.3.3.3 - Determinação de Metais Pesados

O procedimento adotado na determinação de metais pesados usando o optodo de PAR/XAD-4 operado em fluxo com uma cela em forma de "T" consistiu em, inicialmente, passar um fluxo contendo a solução tampão pH 9,0 por 3 minutos, depois passar um fluxo contendo a solução padrão do íon metálico por 1 minuto, registrando-se o espectro de reflectância (500 a 650 nm) após cada injeção e, finalmente, passar um fluxo contendo a solução de HCl 10%. Utilizou-se

na obtenção das curvas analíticas cinco soluções padrão de cada metal na faixa de concentração até 10 mg/L.

4.3.3.4 - Curvas Analíticas para Ni(II), Cu(II), Mn(II) e Cd(II)

As curvas analíticas para os quatro metais foram construídas utilizando-se valores de reflectância no comprimento de onda de máxima reflectância para cada um dos metais. As curvas analíticas, que são mostradas na Figura 38, foram construídas plotando-se a reflectância relativa (Rr) versus concentração do metal.

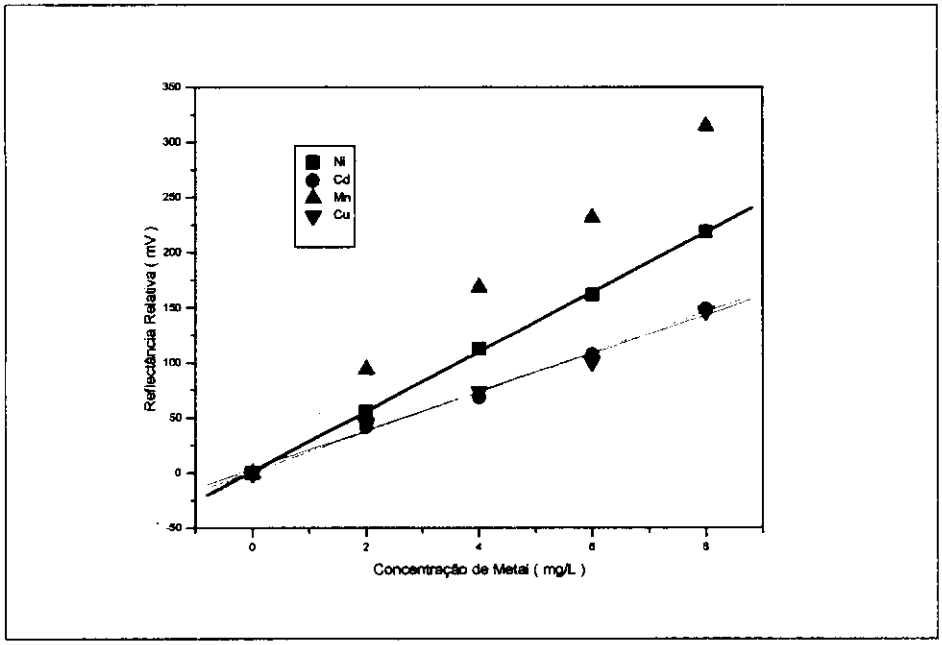


Figura 38: Curvas analíticas para Ni(II), Cu(II), Mn(II) e Cd(II)

Os valores obtidos com a construção das curvas analíticas são mostrados na Tabela 4. Esta tabela mostra o comprimento de onda de máxima reflectância usado para cada metal, as equações das curvas analíticas, a faixa de concentração para cada metal e o coeficiente de correlação das curvas.

Os valores mostrados na Tabela 4 são muito próximos dos valores obtidos com outros optodos para metais pesados descritos na literatura.

Tabela 4 : Curvas analíticas para Ni(II), Cu(II), Mn(II) e Cd(II)

Metal	λ (nm)	Faixa de Concentração	Curva Analítica	Correlação
Ni	567	Até 8,0 mg/L	R = 1,2 + 28[Ni]	0,9997
Cu	560	Até 8,0 mg/L	R = 3,4 + 18 [Cu]	0,9950
Cd	572	Até 8,0 mg/L	R = 0,8 + 18 [Cd]	0,9979
Mn	557	Até 8,0 mg/L	R = 8,4 + 38 [Mn]	0,9979

Tabela 5: Faixa de concentração de alguns optodos usados na determinação de metais pesados

Reagente/Suporte	Metal	Faixa de Concentração
Br-PADP/XAD-4[30]	Hg(II) e Cd(II)	até 10 mg/L
PAN/Nafion[28]	Ni(II)	1,2 a 7,2 mg/L
Alaranjado de xilenol/Wofatit ES[32]	Pb(II)	0,62 a 6,3 mg/L
Ditizona/XAD-4[159]	Pb(II)	0,02 a 2 mg/L
TAR/XAD-4[29]	Co, Cu, Fe, Ni e Ag	1 a 20 mg/L
PAN/PVC[31]	Hg(II)	2 a 200 mg/L
Purpurin/XAD-4[160]	Al(III)	1,35 a 86,3 mg/L
Ditizonato de Zinco/XAD7[25]	Hg(II)	até 180 mg/L
Fast Sulphon Black F (FSBF)[24]	Cu(II)	11 a 127 mg/L

A Tabela 5 resume as propriedades de alguns destes optodos para metais pesados. Nota-se que a faixa de concentração dos cinco primeiros optodos mostrados nesta tabela são semelhantes as obtidas neste trabalho com exceção do quinto optodo que tem uma faixa de concentração muito maior. Os quatros últimos optodos apresentados na Tabela 5 tem uma faixa de concentração

muito maior, porém estes optodos são operados em batelada e exigem um tempo de resposta elevado quando comparado aos demais optodos apresentados nesta tabela. O optodo de purpurin/XAD-4 para Al(III), por exemplo, tem um tempo de resposta de 20 minutos.

5 – Determinação Simultânea de Metais pesados usando o optodo PAR/XAD-4

Desenvolveu-se um procedimento para a determinação simultânea de dois metais, Ni(II) e Cd(II) e de três metais, Ni(II), Cd(II) e Mn(II) utilizando o optodo de PAR/XAD-4 operado em fluxo usando a cela em forma de "T". A determinação simultânea foi realizada utilizando métodos de calibração multivariada (PCR, PLS1 e PLS2), porque estes métodos permitem o desenvolvimento de modelos de calibração na presença de várias espécies simultaneamente mesmo na ausência de diferenças espectrais marcantes.

A determinação simultânea usando métodos de calibração multivariada envolve várias etapas. A primeira etapa, chamada de planejamento da calibração, consiste em construir um conjunto de misturas com composição conhecida, chamada de conjunto de calibração, utilizadas para a construção dos modelos de calibração e um outro conjunto de misturas, também, com a composição conhecida, chamada de conjunto teste, utilizadas para a validação do modelo construído com as misturas do conjunto de calibração. As outras etapas correspondem a obtenção dos espectros das misturas, a organização dos dados espectrais destas misturas, a realização de um preprocessamento e de um pré-tratamento dos dados espectrais, a construção dos modelos de calibração com os métodos PLS1, PLS2 e PCR e a validação destes modelos.

5.1 - Determinação Simultânea de Ni(II) e Cd(II)

5.1.1 – Planejamento da Calibração

O primeiro passo no planejamento da calibração é a definição do número e da composição das misturas usadas nos conjuntos de calibração e teste. A definição do número de misturas do conjunto de calibração foi realizado

usando-se um planejamento fatorial 2^n, com ponto central, onde n é o número de componentes. O algoritmo deste planejamento especifica cinco combinações de diferentes concentrações nos níveis extremos. Os valores extremos usados na elaboração das misturas foram 0,5 e 3,5 mg/L para os dois metais. Estes valores foram escolhidos tendo como base a faixa de linearidade dos metais e a saturação da fase sensora. O número e a composição das misturas utilizadas na construção dos modelos de calibração são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores das concentrações das misturas de calibração.

MISTURA	Ni (II) mg/L	Cd (II) mg/L
1	0,5	0,5
2	3,5	0,5
3	0,5	3,5
4	3,5	3,5
5	1,75	1,75

Ainda, dentro do planejamento de calibração deve-se definir o número e a composição das misturas que formam o conjunto teste. Utilizou-se, neste planejamento, cinco misturas com composições definidas de maneira aleatória. Porém, os valores de concentração dos metais escolhidos estavam dentro da faixa de concentração do conjunto de calibração. O número e a composição da misturas teste utilizadas na validação dos modelos de calibração são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de concentração das misturas teste.

MISTURA	Ni (II) mg/L	Cd (II) mg/L
10	1,0	2,5
20	2,5	1,0
30	2,0	1,5
40	3,0	2,0
50	1,5	3,0

5.1.2 - Obtenção dos Espectros das Misturas de Calibração e de Teste

O procedimento para a obtenção dos espectros de reflectância das misturas usadas no conjunto de calibração e de teste consistiu em passar pela fase sensora (PAR/XAD-4) um fluxo contendo uma solução tampão pH 9,0 por 3 minutos (vazão 1 mL/min), registrando-se o espectro de reflectância (400 a 700 nm) do PAR/XAD-4, depois passar pela fase sensora um fluxo contendo a solução de uma das misturas por um minuto, registrando-se o espectro de reflectância (400 a 700 nm) do complexo Metal-PAR/XAD-4 formado, e em seguida passar pela fase sensora um fluxo de uma solução de HCl 10% (v/v) por 3 minutos para regeneração da fase sensora.

Na construção e validação dos modelos de calibração multivariada foram utilizados seis espectros de reflectância de cada uma das misturas de calibração e três espectros para cada uma das misturas de teste. Na obtenção de cada um destes espectros utilizou-se o procedimento descrito no parágrafo anterior. Este fato foi um dos aspectos mais problemáticos enfrentados na elaboração dos modelos de calibração multivariada, pois conforme relatou-se no item 4.3.3.2, o PAR imobilizado na resina XAD-4 sofre um processo de lixiviação à medida em que o procedimento de obtenção dos espectros é repetido. A lixiviação do PAR diminui a vida útil do optodo, trazendo problemas de precisão e exatidão nas medidas obtidas. No estudo sobre o processo de lixiviação do PAR, relatado no item já citado anteriormente, constatou-se que o procedimento de obtenção dos espectros para uma determinada fase sensora poderia ser repetido por vinte vezes sem que ocorresse um lixiviação significativa do PAR. Nota-se, portanto, que o número de repetições do procedimento de obtenção dos espectros para uma determinada fase sensora sem que os resultados obtidos fossem comprometidos pelo processo de lixiviação era insuficiente na obter a quantidade necessária de espectros das misturas para a construção e validação dos modelos de calibração multivariada.

Para contornar o problema acima exposto foi utilizado como alternativa a troca da fase sensora após o procedimento de obtenção dos espectros ser repetido vinte vezes. Nestas trocas, utilizou-se a fase sensora obtida no mesmo processo de imobilização. Devido a necessidade de trocas freqüentes da fase sensora foi necessário o desenvolvimento de uma técnica de empacotamento da fase sensora na cela de fluxo com a melhor repetibilidade possível, pois os espectros de reflectância obtidos após a troca dos grânulos do PAR/XAD-4 deveriam apresentar perfis e intensidade similares. Do contrário, os sinais obtidos não poderiam ser utilizados na elaboração e validação dos modelos de calibração. Este fato foi verificado analisando-se os espectros do PAR/XAD-4 em pH 9,0 nos diferentes empacotamentos realizados. As fases sensoras que apresentavam espectros do PAR/XAD-4 discrepantes eram desprezados.

Os espectros do PAR/XAD-4 em pH 9,0 obtidos em cada um dos procedimentos de obtenção dos espectros das misturas foram, também, utilizados para desprezar espectros de misturas cujos espectros do PAR/XAD-4 tivessem alguma alteração em seu perfil ou intensidade quando comparado com os demais espectros, principalmente, na faixa espectral de 500 a 550 nm, que indica aceleração do processo de lixiviação do PAR realizados. As fases sensoras empregadas que apresentavam espectros do PAR/XAD-4 discrepantes eram desprezados.

5.1.3 – Construção dos Modelos de Calibração

5.1.3.1 – Organização dos Dados Espectrais

Os espectros de reflectância (400 a 700 nm) dos complexos formados pelas misturas de calibração e de teste que foram obtidos por meio de um programa escrito em VisualBasic 4.0. Em seguida estes espectros foram exportados para o programa Micronal Origin 5.0, onde foi realizada a organização dos dados espectrais que estes pudessem ser utilizados para sua utilização na construção dos modelos de calibração empregando os métodos de calibração multivariada contidos no programa UNSCRAMBLER 6.0

Para que a análise multivariada seja realizada de forma correta é necessário realizar uma adequada organização e avaliação dos dados. Uma das características dos dados gerados por análises espectroscópicas é o elevado número de variáveis independentes, no caso deste trabalho, os valores a reflectância em cada comprimento de onda. Em alguns casos, o número elevado de variáveis independentes pode agir de forma depreciativa à análise dos dados, pois muitas destas variáveis podem trazer pouca ou nenhuma informação relevante para descrever o sistema em estudo, além de introduzir ruídos.

Analisando-se os espectros de reflectância dos complexos Metal-PAR/XAD-4 constatou-se que na faixa espectral de 400 a 500 nm e de 650 a 700 nm ocorria uma sobreposição das bandas de reflexão dos complexos Metal-PAR/XAD-4, conforme pode ser visto na Figura 25 (página 61 do capítulo 4) , e portanto, estas faixas espectrais não forneciam informações relevantes e, por estão razão, decidiu-se excluir estas faixas espectrais dos espectros de reflectância das misturas usadas na elaboração e validação dos modelos de calibração.

Os espectros de reflectância (500 a 650 nm) das misturas foram organizados em uma Matriz **X** (a x m), com a linhas e m colunas, onde cada linha representa uma mistura e cada coluna corresponde a um comprimento de onda do espectro de reflectância. A Figura 39 ilustra esta organização dos dados. Os valores de concentração das misturas foram organizados em uma matriz **Y** (a x p), com a linhas e p colunas, onde cada linha representa uma mistura e cada coluna corresponde a um componente da mistura.

As matrizes **X** e **Y** foram construídas no programa Micronal Origin 5.0 e exportadas para o programa UNSCRAMBLER 6.0, onde foram realizados alguns estudos de preprocessamento e de pré-tratamento dos dados espectrais para posterior utilização na construção e validação de modelos de calibração multivarida empregando os métodos PLS1, PLS2 e PCR.

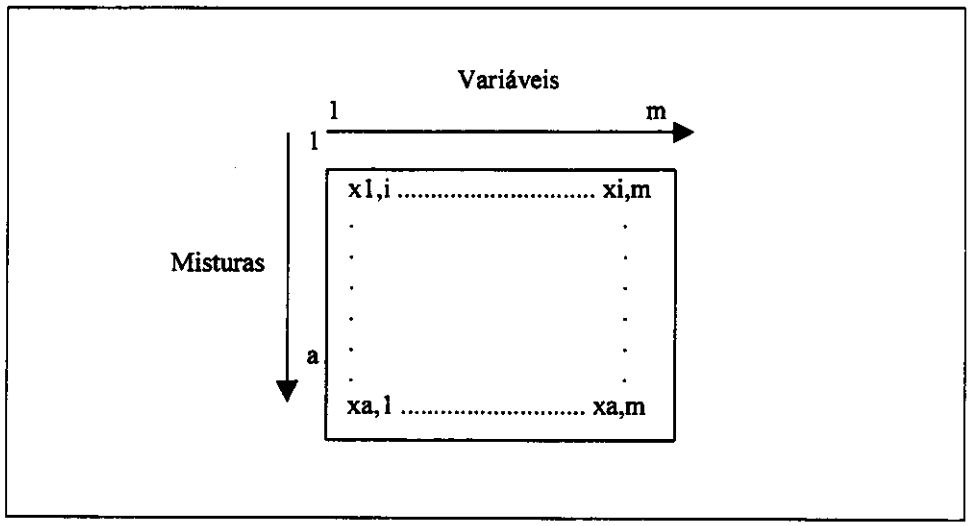


Figura 39: Representação matricial dos dados espectrais.

5.1.3.2 –Preprocessamento e Pré-Tratamento dos Dados

Os métodos de preprocessamento mais empregados na construção de modelos de calibração multivariada consistem em centrar os dados espectrais na média, fazer um escalanamento destes dados espectrais pela variância ou realizar um autoescalanamento destes dados. Já os métodos de pré-tratamento consistem em realizar a suavização e remoção de ruído instrumental e obter os espectros de primeira e segunda derivada dos espectros originais.

5.1.3.2.1 – Centrar os Dados na Média

Este tipo de preprocessamento é um dos mais empregados na construção de modelos de calibração multivariada, principalmente em casos de dados experimentais com um certo grau de ruído.

Neste caso, calcula-se o valor médio de cada variável, ou seja, de cada coluna da matriz **X** e em seguida subtrai-se este valor de cada elemento associado a esta variável, conforme equação (XXIII)

$$x_{ij(c)} = x_{ij} - \bar{x}_j \qquad (XXIII)$$

$x_{ij(c)}$ = valor centrado na média para variável j na amostra i

x_{ij} = valor da variável j na amostra i

$\bar{x}j$ = média dos valores das amostras na coluna j

5.1.3.2.2 – Escalanamento pela Variância

O escalanamento pela variância consiste em dividir todos os componentes de uma determinada variável pelo desvio padrão desta variável. Desta forma, a variância de todas as variáveis passam a ser unitária fazendo com que os pesos de diferentes variáveis sejam equivalentes e com isso minimiza-se o risco de perda de informações relevantes. Este tipo de preprocessamento é muito empregado quando as variáveis são obtidas em unidades diferentes.

5.1.3.2.3 – Autoescalanamento

O autoescalanamento é uma técnica de preprocessamento onde os dados de cada variável são centrados na média e escalonados pela variância. Isto permite que cada variável do conjunto de dados original tenha média zero e variância igual a um. Neste tipo de pré-tratamento as variáveis terão a mesma importância, independente de sua dimensão.

5.1.3.2.4 – Suavização e Remoção de Ruído Instrumental

A maioria dos sinais gerados por instrumentos analíticos encontram-se contaminados com ruídos. Os ruídos instrumentais dificultam a interpretação das propriedades associadas aos sinais analíticos.

O ruído instrumental pode ser suavizado ou removido do sinal analítico gerado pelo instrumento. A suavização é realizada empregando-se certos

tipos filtros incorporados em diversos softwares comerciais como Micronal Origin, Excel, Unscrambler.

Um dos filtros mais utilizados para este fim é o de média móvel, que é de fácil entendimento e de rápida execução. O método consiste em definir um intervalo de comprimentos de onda a partir do inicio do espectro. Em seguida, obtém-se a média dos valores de reflectância deste intervalo de comprimentos de onda substituindo-se o primeiro valor deste intervalo pelo valor médio. Este intervalo de comprimentos de onda é deslocado ponto a ponto até atingir o final do espectro. O problema deste tipo de filtro é a distorção que ele provoca no sinal analítico. Este tipo de distorção é crítica em picos estreitos, porém não causa grandes transtornos em sinais de banda larga.

Um outro filtro, também muito utilizado na suavização de ruídos instrumentais, é o filtro de Savitzky-Golay, que é menos sensível à largura do intervalo, pois o ajuste dos pontos do intervalo é obtido por um polinômio e não pela simples média dos pontos vizinhos, como ocorre no filtro de média móvel. Esta propriedade permite a utilização do filtro de Savitzky-Golay em sinais analíticos com picos estreitos.

A remoção do ruído pode ser realizada com o auxílio de filtros com transformada de Fourier. A idéia deste tipo de filtro é aplicar a transformada de Fourier direta para obter espectros de freqüência, que são utilizados para cortar as freqüências altas associadas na maioria dos casos a ruídos. Em seguida, aplica-se a transformada de Fourier inversa para recuperar o sinal analítico original, porém sem o ruído.

5.1.3.2.5 – Espectros de Primeira e Segunda Derivada

Uma outra forma de realizar um pré-tratamento dos dados espectrais é a utilização de espectros de primeira e segunda derivada. Estes espectros são freqüentemente usados para resolver problemas de sobreposição espectral, pois

evidenciam a estrutura fina e permitem isolar bandas que são indistintas nos espectros originais, além de correção da linha base.

5.1.3.3 – Obtenção dos Modelos de Calibração

Os modelos de calibração multivariada relacionando as matrizes **X** (valores de reflectância em vários comprimentos de onda) e **Y** (concentração dos componentes das misturas) foram construídos utilizando os métodos de calibração multivariada PLS1, PLS2 e PCR e empregando-se os dados espectrais originais, os dados espectrais centrados na média, os dados espectrais suavizados com o filtro de média móvel (usando largura do intervalo igual a cinco pontos) após os dados espectrais originais serem centrados na média e os dados espectrais de primeira derivada após os dados espectrais originais serem centrados na média.

Os dados suavizados com o filtro de média móvel e os dados espectrais de primeira ordem sem centrar os dados espectrais originais na média resultaram modelos de calibração muito ruins. No caso dos dados espectrais suavizados, o melhor modelo foi obtido usando o método PCR tendo um valor de RMSEP (erro médio quadrático de previsão, equação XXIV) igual a 0,987 para Ni(II) e 0,654 para Cd(II). No caso dos dados de primeira derivada, o melhor modelo foi obtido usando o PLS2 tendo um valor de RMSEP igual a 0,640 para Ni(II) e 0,875 para Cd(II).

$$RMSEP = (\Sigma (y_{ip} - y_{iv})/a)^{1/2} \qquad (XXIV)$$

Onde y_{ip} = valor estimado pelo modelo para a concentração da mistura i

y_{iv} = valor verdadeiro para a concentração da mistura i

a = número total de misturas

O primeiro passo realizado na construção dos modelos de calibração foi a escolha do número ótimo de componentes principais a serem utilizados na

construção dos modelos. O número ótimo de componentes principais deve ser aquele que produzir a melhor previsão possível para as concentrações do conjunto teste. A utilização de um número elevado de componentes principais pode ocasionar transferência de ruídos provenientes do conjunto de calibração para os modelos de calibração resultando em previsões errôneas das concentrações do conjunto teste. Por outro lado, a utilização de um número baixo de componentes principais pode deixar de incluir informações relevantes provocando a construção de modelos de calibração com baixa capacidade preditiva.

Existem várias maneiras de se determinar o número ótimo de componentes principais. Os mais utilizados são os validação externa e interna. O método de validação externa compara as previsões de concentração feitas pelo modelo de calibração com os valores verdadeiros de um conjunto teste que não participa da construção do modelo de calibração. O método de validação interna, não separa uma parte das misturas exclusivamente para serem usadas em um conjunto teste, mas utiliza todas as misturas como um único conjunto.

O método de validação interna mais utilizado é o crossvalidation, que procura validar o modelo de calibração usando um segmento do próprio conjunto de calibração que atua momentaneamente como um conjunto teste independente. Em seguida, esse segmento retorna ao conjunto de calibração e um novo segmento é usado como teste. O processo é repetido até que tenham sido feitas previsões para todo o conjunto de calibração

A determinação do número ótimo de componentes principais foi realizada utilizando-se o método de validação interna crossvalidation retirando uma mistura de cada vez para a validação do modelo. Neste caso, o número ótimo de componentes principais será aquele que apresentar o menor RSEMP obtido em um gráfico fornecido pelo UNSCRAMBLER 6.0, que relaciona componentes principais com RMSEP. A Figura 40 mostra os gráficos de RMSEP contra componentes principais obtidos na construção dos modelos de calibração de Ni(II) (A) e Cd(II) (B) usando os dados espectrais centrados na média empregando o

método de calibração multivariada PLS1 com aplicação do crossvalidation. Nota-se pela Figura 40 que o número ótimo de componentes principais para Ni(II) e Cd(II) é 4, pois é o número de componentes que fornece o menor valor de RMSEP.

As Tabelas 8 e 9 mostram o número ótimo de componentes principais em cada um dos métodos de calibração multivariada (PLS1, PLS2 e PCR). Nota-se pelas Tabela 8 e 9 que o número ótimo de componentes principais determinado pelo método de validação interno (crossvalidation) é na maioria dos casos maior que o número de componentes da mistura, este fato deve estar associado a colinearidade entre os espectros de reflectância dos complexos de Ni(II) e Cd(II) que exigem um número maior de componentes principais para a discriminação do modelo de calibração. Outro fator que deve influenciar este número maior de componentes principais é o fato dos espectros de reflectância das misturas serem obtidos com fases sensores com empacotamentos diferentes que devem proporcionar uma repetibilidade menor nos espectros de reflectância das misturas.

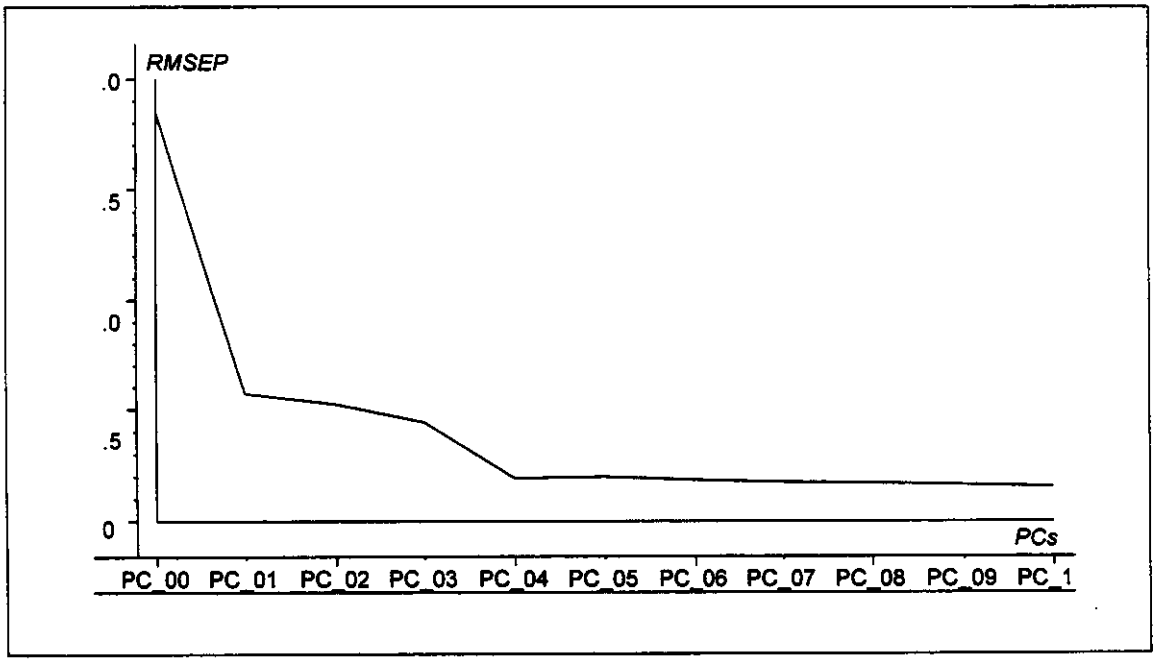


Figura 40a: Gráfico RMSEP x componentes principais do modelo PLS1 para Ni(II).

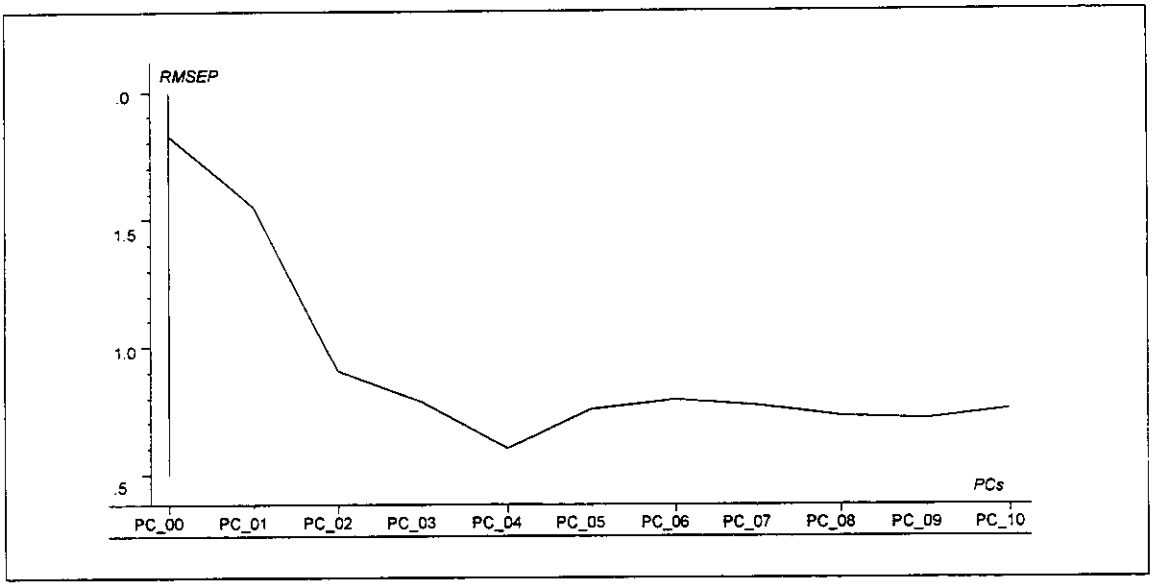


Figura 40b: Gráfico RMSEP x componentes principais do modelo PLS1 para Cd(II).

Tabela 8: Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation na determinação de Ni (II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR.

NÍQUEL (II)			
Pré-Tratamento	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**
Dados Originais	4	5	5
Centrados na Média	4	4	5
Filtrados – Média Móvel	5	5	8
1ª Derivada	2	3	6

Tabela 9: Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Cd (II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR.

CÁDMIO (II)			
Pré-Tratamento	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**
Dados Originais	2	5	5
Centrados na Média	4	4	4
Filtrados – Média Móvel	4	5	5
1ª Derivada	2	3	6

Outro fator importante a ser considerado na construção dos modelos de calibração multivariada é a identificação de amostras anômalas, que representam elementos que são muito diferentes ou que apresentam erros grosseiros quando comparados com a maioria dos dados. Porém, algumas vezes a presença de uma amostra diferente das demais não representa uma anomalia, podendo conter informações importantes que não são encontradas nas outras amostras, tornando-se assim importante na construção do modelo de calibração.

Os métodos mais utilizados para a detecção de anomalias são baseados em duas grandezas complementares *leverage* e resíduo de *Student*. A *leverage* pode ser interpretada como a distância entre um ponto e o centro do modelo. A *leverage* de um objeto, portanto, descreve sua influência para o modelo de calibração. Um valor baixo de *leverage*, próximo de zero, indica que a amostra correspondente têm muito pouca influência no modelo de calibração, por outro lado valores de *leverage* altos indicam que a amostra tem alta influência sobre o modelo. Os resíduos de *Student* correspondem a desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo de calibração. Amostras mal modeladas têm resíduos altos.

A melhor maneira de se determinar anômalias seria através da análise do gráfico dos resíduos de *Student* contra *leverage*. As amostras que *apresentam alto resíduo e alto valor de leverege devem ser excluídas do* tratamento. Para os casos de amostras que apresentam alto resíduo e pequeno valor de *leverege* ou vice-versa, uma avaliação cautelosa deve ser realizada. Esta avaliação foi efetuada construindo o modelo de calibração sem as amostras nas condições descritas acima e comparando-se os resultados obtidos com os resultados dos modelos iniciais, concluindo-se que a remoção destas amostras do conjunto de calibração não promoveram melhoras significativas na capacidade preditiva dos modelos iniciais. Por exemplo, no caso do modelo de calibração de Ni(II) construído com todas amostras do conjunto de calibração e usando o método PLS1 e com os dados espectrais centrados na média obteve-se um valor de RMSEP igual a 0,267. Já o modelo construído sem as duas amostras que

apresentaram valores de resíduos altos (acima de 0,5) e *leverege* baixo (abaixo de 0,10) obteve-se um valor de RMSEP igual 0,291. Por esta razão, utilizou-se na construção dos modelos de calibração todas as amostras do conjunto de calibração.

5.1.3.4 – Validação dos Modelos de Calibração

A validação dos modelos de calibração construídos foi realizada comparando-se os valores de concentrações do conjunto teste previstas com seus respectivos valores verdadeiros. A comparação destes valores foi realizada por meio da análise de algumas propriedades capazes de medir o grau de ajuste do modelo de calibração com o conjunto teste. As duas propriedades usadas para medir este grau de ajuste do modelo de calibração foram o RMSEP (erro médio quadrático de previsão) e os coeficientes de correlação (r). As Tabelas 10, 11 e 12 mostram os valores de RMSEP e os coeficientes de correlação obtidos na comparação do diferentes modelos de calibração construídos com o conjunto teste.

Os fatores usados na definição do método de calibração e a forma de pré-tratamento de dados que produz o melhor modelo de calibração foram o menor erro médio quadrático de previsão e o melhor coeficiente de correlação, que é aquele que mais se aproximar de 1. Levando-se em consideração estes fatores, que são mostrados nas Tabelas 10, 11, 12 conclui-se que os modelos construídos com os dados espectrais centrados na média apresentaram os melhores resultados nos três métodos de calibração usados e que o melhor modelo de calibração foi obtido utilizando-se o método PLS1, uma vez que o PCR, apesar de apresentar um resultado ligeiramente superior ao PLS1 no caso do Ni(II), apresentou um resultado muito pior para Cd(II).

As Figuras 41 e 42 mostram um gráfico que relaciona os valores previstos pelos modelos de calibração, construídos usando os dados centrados na média, para o conjunto teste com os seus respectivos valores verdadeiros. Neste

gráficos, quanto mais próximos de um for a inclinação e mais próximo de zero o coeficiente linear, melhor a concordância entre os resultados. Com base nesta informação e observando-se os gráficos presentes nas Figuras 41 e 42 concluiu-se que o melhor modelo de calibração para a determinação simultânea de Ni(II) e Cd(II) foi construído com o método PLS1.

Tabela 10: Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS1.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II)		Cd(II)	
	RMSEP	R	RMSEP	R
Dados Originais	0,302	0,952	0,642	0,739
Centrados na Média	0,267	0,958	0,213	0,955
Filtro Média Móvel (5)	0,507	0,750	0,458	0,911
1ª Derivada	0,652	0,733	0,639	0,884

Tabela 11: Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS2.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II)		Cd(II)	
	RMSEP	R	RMSEP	R
Dados Originais	0,963	0,304	0,397	0,863
Centrados na Média	0,329	0,969	0,397	0,863
Filtro Média Móvel (5)	0,605	0,724	0,391	0,844
1ª Derivada	0,472	0,917	0,639	0,745

Tabela 12: Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PCR.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II)		Cd(II)	
	RMSEP	R	RMSEP	R
Dados Originais	0,828	0,327	0,521	0,837
Centrados na Média	0,219	0,972	0,403	0,926
Filtro Média Móvel (5)	0,375	0,843	0,358	0,893
1ª Derivada	0,532	0,744	0,605	0,554

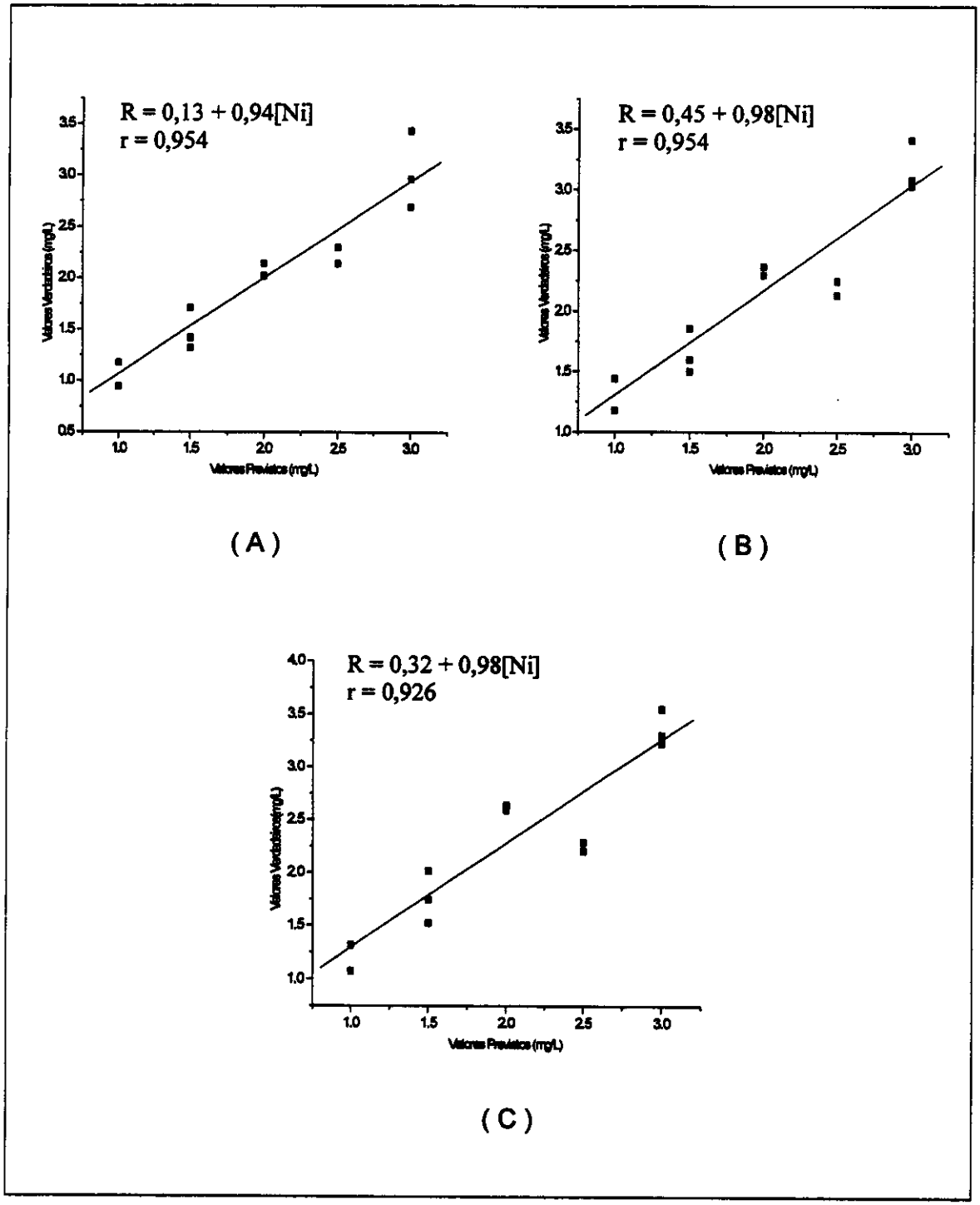


Figura 41: Comparação dos valores de concentração de Ni(II) previstos pelos modelos PLS1 (A), PLS2 (B) e PCR (C), com os valores verdadeiros do conjunto teste.

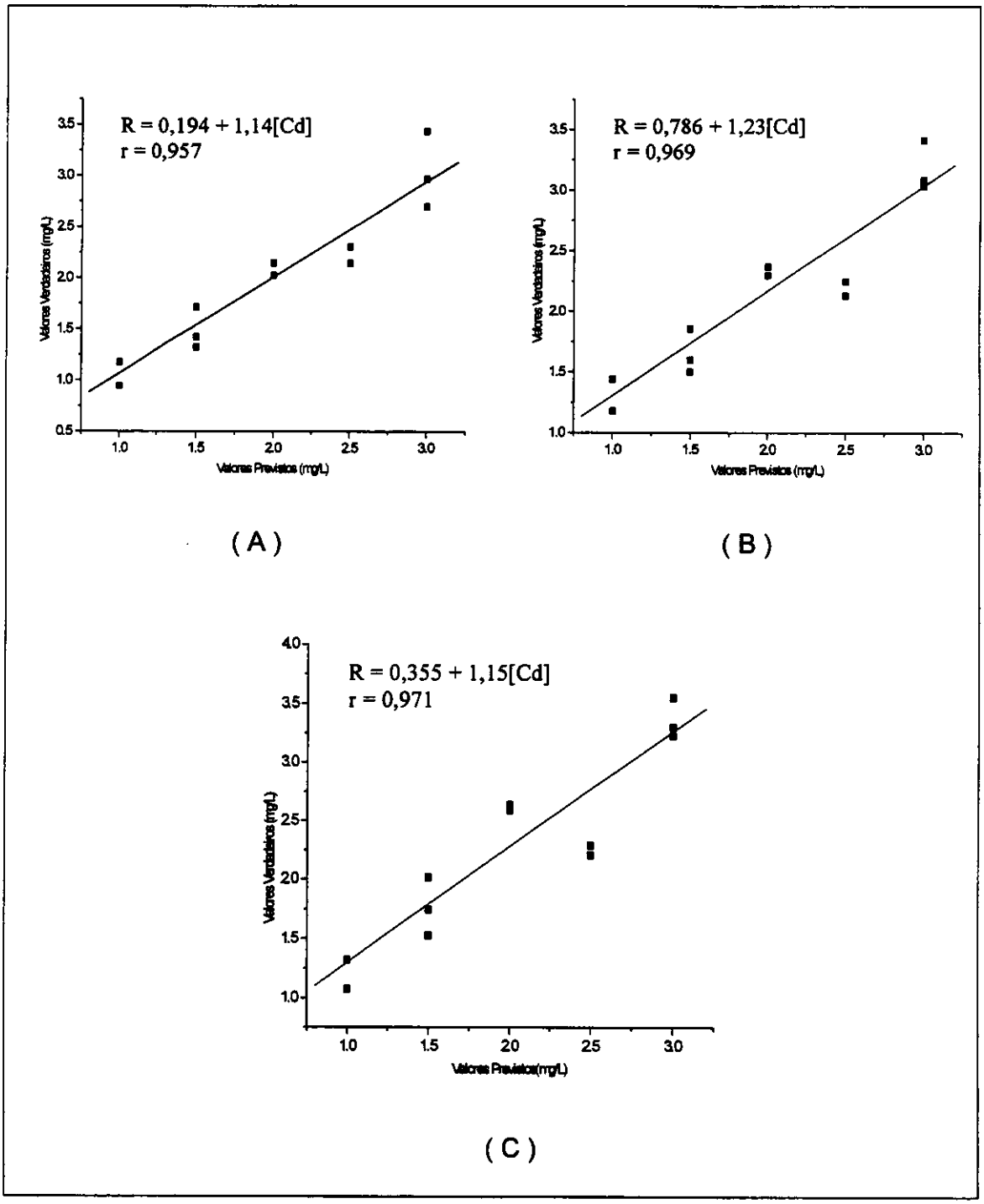


Figura 42: Comparação dos valores de concentração de Cd(II) previstos pelos modelos PLS1 (A), PLS2 (B) e PCR (C), com os valores verdadeiros do conjunto teste.

A Tabela 13 mostra os valores dos erros médios relativos, calculados conforme a equação (XXV) obtidos com os três diferentes métodos de calibração e as diferentes formas de pré-tramento do dados espectrais.

$$\text{Erro} = \frac{\Sigma | (yp - yv)/yv |}{N} \times 100 \qquad (XXV)$$

Onde yp é o valor previsto pelo modelo para a concentração do elemento presente em uma amostra, yv é o seu valor verdadeiro e n é o número de amostras do conjunto de teste.

Tabela 13: Erros médios relativos nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste usando os métodos PLS1, PLS2, PCR.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II) erro%			Cd(II) erro %		
	PLS1	PLS2	PCR	PLS1	PLS2	PCR
Dados Originais	41	47	37	39	19	33
Centrados na Média	8,8	12	9,1	9,7	15	20
Filtro Média Móvel (5)	23	28	20	23	20	14
1ª Derivada	30	21	27	40	43	33

Pela Tabela 13 nota-se que o melhor modelo para a determinação simultânea de Ni(II) e Cd(II) foi o modelo construído com o método PLS1 utilizando os dados espectrais centrados na média. Os valores do erro médio relativo para Ni(II) de 8,8% e para Cd(II) de 9,7% são valores superiores aos encontrados em trabalhos que realizam a determinação espectrofotométrica simultânea. Porém, cabe lembrar que os valores obtidos estão bem próximos da estimativa do desvio padrão dos espectros de reflectância da instrumentação num intervalo de seis horas, conforme foi relatado no item 3.3.3. Levando-se em consideração o erro proveniente da própria instrumentação pode-se dizer que os resultados obtidos

estão muito próximos do limite da instrumentação utilizada na realização destas determinações.

5.2 - Determinação Simultânea de Ni(II), Cd(II) e Mn(II)

O procedimento utilizado na construção dos modelos de calibração para a determinação simultânea dos três metais foi o mesmo utilizado na obtenção dos modelos de calibração para dois metais descrito nos itens anteriores. Inicialmente, elaborou-se o planejamento de calibração, que envolveu a definição da composição das misturas de calibração usadas na construção dos modelos PLS1, PLS2 e PCR e a composição das misturas testes usadas na validação dos modelos construídos com as misturas de calibração.

Definiu-se a composição das misturas de calibração utilizando um planejamento fatorial, 2^3, com ponto central, cujo algoritmo especifica nove combinações diferentes de concentrações nos níveis extremos. Os valores extremos de concentração, assim como na determinação simultânea de dois metais, foram de 0,5 e 3,5 mg/L. A Tabela 14 mostra a composição das misturas de calibração.

Tabela 14: Composição das misturas de calibração

MISTURA	Ni(II) mg/L	Cd(II) mg/L	Mn(II) mg/L
1	0,5	0,5	0,5
2	3,5	0,5	0,5
3	0,5	3,5	0,5
4	0,5	0,5	3,5
5	3,5	3,5	0,5
6	3,5	0,5	3,5
7	0,5	3,5	3,5
8	3,5	3,5	3,5
9	1,75	1,75	1,75

A composição das misturas teste usadas na validação dos modelos construídos foi definida de forma aleatória, porém com valores de concentração dos metais dentro da faixa de concentração das misturas de calibração. A Tabela 15 mostra a composição das misturas teste usadas.

Tabela 15: Composição das misturas teste

MISTURA	Ni(II) mg/L	Cd(II) mg/L	Mn(II) mg/L
10	2,5	1,0	1,0
20	2,0	2,0	2,5
30	1,5	0,75	0,75
40	1,0	1,5	1,5
50	0,75	2,5	2,0

O passo seguinte na determinação simultânea dos três metais foi a obtenção dos espectros de reflectância das misturas de calibração e de teste. O procedimento usado na obtenção dos espectros foi o mesmo adotado na determinação simultânea de dois metais. A única mudança foi a alteração do tempo de bombeamento das soluções das misturas de calibração e de teste de um minuto para 45 segundos. Esta alteração teve por objetivo evitar a saturação da fase sensora, uma vez que a concentração total da mistura oito, mostrada na Tabela 13, é de 10,5 mg/L e atinge o ponto de saturação da fase sensora se fosse mantido o tempo de um minuto para o bombeamento das misturas.

Assim como na determinação de dois metais, os dados espectrais foram organizados em uma matriz **X** (a,m), com a linhas e m colunas, onde cada linha representa uma mistura e cada coluna corresponde um comprimento de onda do espectro de reflectância das misturas. Os valores de concentração das misturas foram organizados em uma matriz **Y** (a,p), com a linhas e p colunas, onde cada linha representa uma mistura e cada coluna corresponde a um componente. As matrizes **X** e **Y** foram construídas no programa Micronal Origin 5.0 e exportadas para o programa UNSCRAMBER 6.0 onde foram realizados

alguns estudos sobre os diferentes métodos de pré-tratamento dos dados espectrais para sua posterior utilização na construção e validação dos modelos de calibração empregando os métodos de calibração multivariada PLS1, PLS2 e PCR. Os modelos de calibração foram construídos usando os dados espectrais originais, os dados espectrais centrados na média, os dados espectrais suavizados com filtro de média móvel usando 5 pontos como largura do intervalo e obter os espectros derivativos de primeira ordem.

Inicialmente, escolheu-se o número ótimo de componentes principais empregados na construção dos modelos calibração utilizando o método *crossvalidation, usando um mistura de cada vez na validação dos modelos.*

As Tabelas 16, 17 e 18 mostram o número de componentes principais utilizados na construção dos modelos de calibração empregando os diferentes métodos de calibração multivariada e os diferentes métodos de pré-tratamento do dados.

Tabela 16: Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Ni (II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR.

NÍQUEL (II)			
Pré-Tratamento	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**
Dados Originais	5	6	11
Centrados na Média	4	10	11
Filtrados – Média Móvel	9	14	2
1ª Derivada	4	10	6

Tabela 17: Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para Cd (II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR.

CÁDMIO (II)			
Pré-Tratamento	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**
Dados Originais	5	6	4
Centrados na Média	6	10	11
Filtrados – Média Móvel	10	14	4
1ª Derivada	5	10	4

Tabela 18: Número de componentes principais escolhidos por crossvalidation para de Mn (II) nas modelagens PLS1, PLS2 e PCR.

MANGANÊS (II)			
Pré-Tratamento	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**
Dados Originais	5	6	1
Centrados na Média	6	10	1
Filtrados – Média Móvel	11	14	1
1ª Derivada	6	10	1

Nota-se pelas Tabelas 16, 17 e 18 que o número de componentes principais determinado pelo método de crossvalidation foi na maioria dos casos maior que o número de componentes das misturas. Este fato deve estar associado aos mesmos fatores citados na determinação simultânea de dois metais, ou seja, a colinearidade dos espectros de reflectância dos complexos Metal-PAR/XAD-4 dos metais estudados e a utilização de espectros de reflectância das misturas obtidos com fase sensora com empacotamentos diferentes que devem proporcionar uma repetibilidade menor nos espectros de reflectância das misturas.

A Tabela 18 mostra que o método PCR não consegue construir um modelo de calibração para Mn(II), sendo que o melhor modelo foi obtido utilizando um componente principal em todas as formas de preprocessamento e pré-tratamento dos dados e mesmo assim a capacidade preditiva destes modelos foram muito ruins, como pode-se ver pelos valores de RMSEP e coeficientes de correlação destes modelos mostrados na Tabela 21.

5.2.1 – Validação dos Modelos de Calibração

As Tabelas 19, 20 e 21 mostram os valores dos RMSEP e dos coeficientes de correlação obtidos na comparação do diferentes modelos de calibração construídos.

Tabela 19: Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS1.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II) mg/L		Cd(II) mg/L		Mn(II) mg/L	
	RMSEP	R	RMSEP	R	RMSEP	R
Dados Originais	0,288	0,911	0,345	0,949	0,458	0,942
Centrados na Média	0,210	0,976	0,308	0,952	0,420	0,965
Filtro Média Móvel	0,598	0,965	1,043	0,411	2,038	0,981
1ª Derivada	0,509	0,952	0,634	0,700	1,014	0,990

Tabela 20: Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PLS2.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II) mg/L		Cd(II) mg/L		Mn(II) mg/L	
	RMSEP	R	RMSEP	R	RMSEP	R
Dados Originais	0,286	0,960	0,531	0,924	0,774	0,944
Centrados na Média	0,193	0,988	0,293	0,952	0,427	0,972
Filtro Média Móvel	0,662	0,957	1,043	0,389	2,015	0,981
1ª Derivada	0,566	0,949	0,645	0,604	0,921	0,989

Tabela 21: *Valores de RMSEP e coeficientes de correlação nas previsões das* concentrações das amostras do conjunto teste na calibração PCR.

PRÉ-TRATAMENTO	Ni(II) mg/L		Cd(II) mg/L		Mn(II) mg/L	
	RMSEP	R	RMSEP	R	RMSEP	R
Dados Originais	0,242	0,945	0,713	0,826	0,852	- 0,713
Centrados na Média	0,191	0,962	0,613	0,853	0,725	0,631
Filtro Média Móvel	0,526	0,720	0,462	0,709	1,480	$-1,5 \times 10^{-2}$
1ª Derivada	1,002	0,878	0,613	0,979	0,787	0,722

A escolha do melhor modelo de calibração construído foi realizada avaliando-se o modelo que apresenta o menor erro médio de previsão (RMSEP) e o melhor coeficiente de correlação (r), que é aquele que mais se aproximar de um. Com base nestes critérios os modelos construídos com os dados espectrais centrados na média apresentaram os melhores resultados com os métodos de calibração multivariada, PLS1 e PLS2, sendo que o melhor resultado foi obtido para o modelo construído com o método PLS2, seguido pelo construído com o PLS1. Nota-se pelas Tabelas 19,20 e 21 que os piores resultados foram obtidos com o método PCR, que não conseguiu construir um modelo de calibração satisfatório para Mn(II) obtendo nos modelos construídos valores RMSEP e coeficiente de correlação muito ruins devido muito provavelmente a alta correlação dos espectros dos complexos.

Para uma melhor comparação dos modelos de calibração obtidos na determinação simultânea de Ni(II), Cd(II) e Mn(II) construiu-se a Tabela 22, que contém os valores dos erros médio relativos para os diferentes métodos de calibração e as diferentes forma de pré-tratamento dos dados.

Tabela 22: Erros médios relativos nas previsões das concentrações das amostras do conjunto teste usando os métodos PLS1, PLS2 e PCR.

METAL	**Ni(II) erro%**			**Cd(II) erro%**			**Mn(II) erro%**		
Pré-tratamento	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**	**PLS1**	**PLS2**	**PCR**
Dados originais	21	22	7,9	21	47	58	30	62	74
Centrados na Média	16	14	12	21	20	49	30	31	64
Filtro – Média Móvel	48	52	47	65	59	60	86	65	64
Primeira Derivada	40	44	80	48	50	54	53	50	68

Nota-se que os valores obtidos são muito maiores que os valores obtidos na determinação simultânea de dois metais, mostrados na Tabela 13, indicando uma maior dificuldade de se realizar a calibração na presença de três

metais simultaneamente muito provavelmente devido a colinearidade dos espectros dos complexos dos três metais estudados e devido a necessidade de se realizar um maior número de troca da fase sensora, devido ao problema da lixiviação, provocando um erro maior nos espectros de cada uma das misturas utilizadas na construção e validação dos modelos de calibração.

Analisando-se os resultados obtidos nas determinações simultâneas de dois e três metais pode-se dizer que é possível a utilização do sensor químico de fibra óptica de PAR/XAD-4 na determinação simultânea de dois e três metais, principalmente, quando o importante for determinar as proporções entre eles, como em algum processo de remoção ambiental. Observa-se pelos resultados apresentados neste capítulo que os erros médios quadráticos de previsão (RMSEP) obtidos na determinação simultânea de dois e três metais são bons, porém apresentam valores superiores aos encontrados em determinações espectrofotométricas simultânea. Os valores de RMSEP maiores devem ser associados a limitações apresentadas neste trabalho, como por exemplo, a lixiviação do PAR que provoca uma diminuição no tempo de vida útil do sensor e provocando a necessidade de trocas da fase sensora para completar a obtenção de espectros de misturas necessárias para a construção e validação dos modelos e este fato deve provocar uma menor repetibilidade nos espectros das misturas ocasionando um erro maior.

6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho realizado descreveu vários estágios no desenvolvimento de um sensor químico de fibras ópticas (optodo), baseado no PAR imobilizado na resina XAD-4, para a determinação simultânea de metais pesados com o auxílio dos métodos de calibração multivariada (PLS1, PLS2 e PCR).

Constatou-se durante o processo de desenvolvimento do optodo, que o mesmo deveria ser operado em fluxo usando uma cela em forma de "T", pois este arranjo apresentou o melhor desempenho devido a maior facilidade de compactação e regeneração da fase sensora. A faixa de concentração obtida para vários íons metálicos usando este arranjo está dentro da faixa obtida na maioria dos optodos descritos na literatura que utilizam este mesmo tipo de arranjo.

Notou-se que a fase sensora utilizada neste trabalho sofria um processo de lixiviação durante a operação do optodo. Por esta razão, foi desenvolvida uma técnica de empacotamento da fase sensora que possibilitasse a sua troca mantendo a repetibilidade dos espectros de reflectância para que o optodo pudesse ser utilizado na determinação simultânea de metais pesados.

O optodo de PAR/XAD-4 foi utilizado na determinação simultânea de dois e de três metais empregando os diferentes métodos de calibração multivariada usando diferentes formas de preprocessamento e pré-tratamento dos dados, que consistiam em centrar os dados espectrais na média, suavizar os dados espectrais com filtro de média móvel e utilizar espectros de primeira ordem dos espectros originais. Os melhores resultados na determinação simultânea de dois metais foram obtidos empregando-se o método PLS1 com os dados centrados na média. No caso da determinação simultânea de três metais os melhores resultados foram obtidos empregando-se os métodos PLS1 e PLS2 com os dados espectrais centrados na média.

Os valores de RMSEP obtidos na validação dos modelos de calibração construídos tanto na determinação simultânea de dois e de três metais são superiores aos valores obtidos em determinações espectrofotométricas simultânea. Estes erros maiores estão associados a algumas limitações do optodo desenvolvido, como a quantidade fixa do reagente complexante, bem como o processo de lixiviação.

Com base nestas observações a metodologia desenvolvida na utilização do optodo de PAR/XAD-4 na determinação simultânea de metais pesados pode ser aperfeiçoada realizando a adaptação do sistema para a utilização de um espectrofotômetro com arranjo de diodos que permitiria a obtenção de vários espectros de reflectância em intervalos de tempo curtos para se ter uma média maior de espectros para cada mistura.

Um outro fator que poderia melhorar o desempenho do optodo seria a utilização de um suporte sólido menos susceptível à lixiviação. Poder-se-ia, por exemplo, verificar a possibilidade de se realizar a imobilização do PAR em lâminas de PVG, pois os resultados obtidos com a polimerização química da polianilina (Pani) em lâminas de vidros porosos do tipo Vycor, conhecidos também como PVG, permitiu a construção de optodos para medidas de pH com tempo de vida útil de cinco meses.

Na construção dos modelos de calibração multivariada poderia se utilizar alguma programa computacional para realizar uma seleção de variáveis como por exemplo o algoritmo genético e APS (algorítmo das projeções sucessivas). Esta seleção poderia reduzir o número de comprimentos de onda utilizados na construção dos modelos de calibração e possibilitar o uso de LEDs para a obtenção dos valores de reflectância das misturas e com isso possibilitaria o desenvolvimento um sistema de detecção portátil.

Poder-se-ia construir cartuchos de fases sensoras para screening.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azubel, M., Fernández, F. M., Tudino, M. B., Troccoli, O. E., **"Novel application and comparison of multivariate calibration for the simultaneous determination of Cu, Zn and Mn at trace levels using flow injection diode array spectrophotometry"**, *Analytica Chimica Acta*, 1999, 398, 93-102.

2. Castillo, E., Cortina, J. L., Beltrán, J. L., Prat, M. D., Granados, M., **"Simultaneous determination of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) in surface water by solid phase extraction and flow injection analysis with spectrophotometric detection"**, *Analyst*, 2001, 126, 1149-1153.

3. Pimentel, M. F., Neto, B. B., Araújo, M . C. U., Pasquini, C., **"Simultaneous multielemental determination using a low-resolution inductively coupled plasma spectrometer/diode array detection system"**, *Spectrochimica Acta Part B*, 1997, 52, 2151-2161.

4. Engstrom, E., Karlberg, B., **"Screening method for metals based on array spectrophotometric and multivariate analysis"**, *Journal of Chemometrics*, 1996, 10, 509-520.

5. Tewari, P.K, Singh, A.K., Synthesis, **Characterization and applications of pyrocatechol modified amberlite XAD-2 resin for preconcentration and determination of metal ions in water samples by flame atomic absorption spectrometry(FAAS)**, *Talanta*, 2001, 53, 823-833.

6. Rodrigues, A. M. G., Torres, A. G., Pavon, J. M. C., Ojeda, C. B., **"Simultaneous determination of iron, cobalt, nickel and copper by UV-visible spectrophotometric with multivariate calibration"**, *Talanta*, 1998, 47, 463-470.

7. Teixeira, L. S. G., Costa, A. C. S., Garrigues, S., Guardia, de la M., **"Flow-injection solid phase partial least-square spectrophotometric simultaneous determination of iron, nickel and zinc"**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2002, 13(1), 54-59.

8. Hernández, O., Jiménez F., Jiménez, A. I., Arias, J. J., Havel, J., **"Multicomponent flow injection based analysis with diode array detection and partial least square multivariate calibration evaluation. Rapid determination of Ca(II) and Mg(II) in waters and dialysis liquids"**, *Analytica Chimica Acta*, 1996, 320, 177-183.

9. Shamsipur, M., Mashhadizadeh, H.M., **Cadmium ion-selective electrode based on tetrathia-12-crown-4**, *Talanta*, 2001, 53, 1065-1071

10. Mousavi, M.F., Barzegar, M.B, Sahari,S., **A PVC-based capric acid membrane potentiometric sensor for lead(II) ions,** *Sensors and Act.B,* 2001, 73, 199-204

11.Gupta, V.K., Kumar, A., Mangla, R., **Protoporphyrin IX dimethyl ester as active material in PVC matrix membranes for the fabrication fo zinc(II) selective sensor**, *Sensors and Act B*, 2001, 76, 617-623

12. Mousavi M.F., Alizadeh, N., Shamsipur, M., Zohari, N., **A new PVC-based 1,10-dibenzyl-1,10-diaza-18-crown-6 selective electrode for detecting nickel(II) ion,** *Sensors and Act. B*, 2000, 66, 98-100.

13. Schoning M.J., Hullenkremer, B., Gluck, O, Luth, H., Emons, H., **Voltohmmetry - a novel sensing principle for heavy metal determination in aqueous solutions**, *Sensors and Act. B*, 2001, 76, 275-280.

14. Saban, S.B., Darling, R.B., **Multi-element heavy metal ion sensors for aqueous solutions**, *Sensors and Act. B*, 1999, 61, 128-137.

15. Hassan, S.S.M., Saleh, M.B., Gaber, A.A.A., Mekheimer, R. A.H., Kream, N.A.A., **Novel mercury(II) ion-selective polymeric membrane sensor based on ethyl-2-benzoyl-2-phenycarbamoyl acetate**, *Talanta*, 2000, 53, 285-293.

16. Wolfbeis, O. S., **Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensores, (FOCSB),** Volumes I e II, CRC Press, Boca Raton, 1991.

17. Arnold, M. A., **Fiber-optic chemical sensors**, *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1015A-1025A.

18. Norris, J. O. W, **Current status and prospects for the use of optic fibres in chemical analysis,** Analyst, 1989, 114, 1359-1372.

19. Seitz, W. R., **Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics**, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1998, 19, 135-173.

20. Pantano, P., Walt, D.R., **"Analytical applications of optical imaging fibers"**, *Analytical Chemistry*, 1995, 1, 481 A- 487 A.

21. Narayanaswany, R., **Optical chemical sensors: transduction and signal processing**, *Analyst*, 1993, 118, 317-322.

22. Janata, J., **Principles of chemical sensors**, Plenum Press, New York, 1990

23. Capitan-Vallvey, L. F., Cienfuegos-Galvez, P. A., Ramos, M . D. F., **Avidad-Castaneda, R., "Determination of calcium by a single-use optical sensor"**, Sensors and Act.B, 2000, 71, 140-146.

24. Mahendra, N., Gangaiya, P., Sotheeswaran, S., Narayanswamy, R., **"Investigation of a Cu(II) fibre optic chemical sensor using fast sulphon black F (FSBF) immobilised onto XAD-7"**, *Sensors and Act. B*, 2002, 81, 196-201.

25. Ahamad, M., Hamazah, H., Marsom, E.S., **"Development of na Hg(II) fibre-optic sensor for aqueous environmental monitoring"**, *Talanta*, 1998, 47, 275-283.

26. Taib, M. N., Narayanaswamy, R., **"Solid-state instruments for optical fibre chemical sensors"**, *Analyst*, 1995, 120, 1617-1625.

27. Malcik, N., Tunoglu, N., Caglar, P., Wnek, G. E., **"Fiber-optic cation determination using crown ether dyes immobilized on polymer membranes"**, *Sensors and Act.B*, 1998, 53, 204-210.

28. Madden, J. E., Cardwell, T. J., Cattrall, R. W., Deady, L. W., **"Nafion-based optode for the detection of metal ions in flow analysis"**, *Analytical Chimica Acta*, 1996, 319, 129-134.

29. Kuswandi, B., Taib, M. N., Narayanaswamy, R., **"A new solid state instrument for optical toxic metal ions sensing"**, *Sensors and Act B*, 1999, 76, 183-190.

30. Vaughan, A. A., Narayanaswamy, R., **"Optical fibre reflectance sensors for the detection of heavy metal ions based on immobilised Br-PADAP"**, *Sensors and Act. B*, 1998, 51, 368-376.

31. Sanchez-Pedreno, C., Ortuno, J. A., Garcia, M. S., Valero, M. V., **"Development of a new bulk optode membrane for the determination of mercury(II)"** , *Analytica Chimica Acta*, 2000, 414, 195-203.

32. Klimant, I., Otto, M., **"A fiber optical sensor for heavy metal ions based on immobilized xylenol orange"**, *Mikrochi. Acta*, 1992, 108, 11-17.

33. Oehme, I., Wolfbeis, O.S., **Optical sensors for determination of heavy metal ions**, *Mikrochim. Acta*, 1997, 126, 177-192.

34. Lubber, D. W., Opitz, N., **Optical fluorescence sensors for continuos measurement of chemical concentrations in biological system,** *Sensors. and Act. B*, 1983, 4, 641-654.

35. Gehrich, J. L., Luebbers, D. W., Opitz, N., Hansmann, D. D., Miller, W. W., Tusa, J. K., Yafuso, M., **Optical Fluorescence and its application to an intravascular blood gas monitoring system,** *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1986, BME-33, 117-132.

36. Spichiger, M. E., Freiner, D., Bakker, E., Rosatzin, T., Simon, W., **Optodes in clinical chemistry: potential and limitations**, *Sensors. and Act. B*, 1993, 11(B), 263-271.

37. García R. P., Moreno, F. A., Díaz, M. E., Sanz-Medel, A., Narayanaswamy, R., **Serum analysis for potassium ions using a fibre optic sensor**, *Clin. Chim. Acta*, 1992, 207, 31-40.

38. Baldini, F., Bracci, S., Cossi, F., Bechi, P., Pucciani, F., **Controlled-Pore glasses embedded in plastic optical fibers for gastric pH sensing purposes**, *Appl. Spectrosc.*, 1994, 48, 549-552.

39. Grattan, K. T. V., **"Principles of optical fibre sensing for water industry applications"**, Measurement, 1997, 20(2), 109-119.

40. Boisde, G., Blanc, F., Pérez, J. J., **Chemical measurements with optical fibers for process control,** *Talanta*, 1988, 35, 75-82.

41. Freeman, J. E., Childers, A. G., Steele, A. W., Hieftje, G. M., **A fiber-optic absorption cell for remote determination of copper in industrial electroplanting baths**, *Anal. Chim. Acta*, 1985, 177, 121-128.

42. Xie, X., Shakhsher, Z., Suleiman, A. A., Guibault, G. G., **A fiber optic biosensor for sulfite anlysis, in food**, *Talanta*, 1994, 41, 317-321.

43. Zeng, H. H., Wang, K. L., Li, D., Yu, R. Q., **Development of an alcohol optode membrane based on fluorescence enhancement of fluorescein derivates,** *Talanta*, 1994, 41, 969-975.

44. Bush, M., Gutberlet, F. Hoebel, W., Polster, J., Schmidt, H. L., Schewenk, M., **Application of optrodes in Fia-based fermentation process control using the software package FIACRE**, *Sensors. and Act. B*, 1993, 11(B), 407-412.

45. Rogers, K. R., Poziomek, E. J., **"Fiber optic sensors for environment monitoring"**, *Chemosphere*, 1996, 33(6), 1151-1174.

46. Andres, R. T., Narayanaswamy, R., **"Fibre-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue"**, *Talanta*, 1997, 44, 1335-1352.

47. Alizadeh, N., Moemeni, A., Shamsipur, M., **"Poly(vinyl chloride)-membrane ion selective bulk optode based on 1,10-dibenzyl-1,10-diaza-18-crown-6 and 1-(2-piridylazo)-2naphthol for Cu(II) and Pb(II) ions"**, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 464, 187-196.

48. Wang, K., Seiler, K., Rusterholz, B., Simon, W., **"Characterization of na optode membrane for Zn(II) incorporating a lipophilized analogue of the dye 4-(2-pyridylazo)resorcinol"**, *Analyst*, 1992, 117, 57-60.

49. Radloff, D., Matern, C., Plaschke, M., Simon, D., Reichert, J., Ache, H. J., **"Stability improvement of na optochemical heavy metal ion sensor by covalent receptor binding"**, *Sensors and Act. B*, 1996, 35-36, 207-211.

50. Segura-Carretero, A., Costa-Fernández, J. M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., **"Low-level mercury determination with thiamine by fluorescence optosensing"**, *Talanta*, 1999, 49, 907-913.

51. Krawczyk, T. K., Moszcynska, M., Trojanowicz, M., **"Inhibitive determination of mercury and other metal ion by potentiometric urea biosensor"**, *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, 15, 681-691.

52 – Russel, D., Narayanaswamy, R., **An optical-fibre sensor for fluoride**, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 220, 75-81.

53. Bentley. A. E., Alder, J. F., **Optical fibre sensor for detection of hydrogen cyanine in air. Part 1: Reagent characterization and impregnated bead detector performance**, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 222, 63-73.

54. Yang, S. T., Bachas, L. G., **Fiber optic chemical sensor for nitrate based on na electropolymerized cobalto porphyrin film**, *Talanta*, 1994, 41, 963-968.

55. Lumpp, R., Reichert, J., Ache, H. J., **Optical sensor for the detection of nitrate**, *Sensors And Act. B*, 1992, 7(B), 473-475.

56. Oliveira, W. A., Saliba, P. R., **Optosensing of carbon monoxide through paper impregnated with palladium(II) chloride,** *J. Braz. Chem. Soc.*, 1994, 5, 39-42.

57. Milanovich, F. P., Brown, S. B., Colston, B. W., Daley, P. F., Langry, K. C., **A fiber-optic sensor system for monitoring chlorinated hydrocarbon pollutants,** *Talanta*, 1994, 41, 2189-2194.

58. Rodriguez-Mendez, M. L., Khoussed, Y., Souto, J., Sarabia, J., Aroca, R., de Saja, J. A., **Langmuir-Blodgett films of lanthanoid diphthalocyanines as enviromental tabaco-smoke sensors**, *Sensors And Act, B*, 1994, 18(B), 89-92.

59. Baron, M. G., Narayanaswamy, R., Thorpe, S. C., **Optical thin films for gas sensing**, *Sensors And Act. B*, 1993, 14(B), 543-544.

60. Matias, F. A. A., **Desenvolvimento de sensores químicos com fibras ópticas para a determinação quantitativa de fuligem e de monóxido de carbono emitidos por veículos automotores**, Tese de Doutorado – Unicamp, 1999.

61 - Raimundo, I. M., Narayanaswany, R., **Simultaneous determination of relative humidity and ammonia in air employing an optical fibre sensor and artificial neural network**, *Sensors. And Act. B*, 2001, 74(B), 60-68.

62. Ge, Z., Brown, C. W., Sun, L., Yang, S. C., **Fiber optic pH sensor based on evanescent wave absortion spectroscopy**, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2335-2338.

63. Edmonds, T. E., Flatters, N. J., Jones, C. F., Miller, J. N., **Determination of pH with acid-based indicators: implications for optical fibre probe**, *Talanta*, 1988, 35, 103-107.

64 - Kirkbright, G. F., Narayanaswamy, R., Welti, N. A., **Fibre-optic pH probe based on the use of na immobilised colorimetric indicator**, *Analyst*, 1984, 109, 1025-1028.

65. Giozza, W. F., Conforti, E., Waldman, H., **Fibras ópticas**, Makron Books do Brasil Editora Ltda, Rio de Janeiro, 1991.

66. Tadini, R., Silva Jr., D. N., **Fibras ópticas**, Livros Érica Ltda, São Paulo, 1990. Cherin, A. H., Na Introduction to Optical Fibers, McGraw-Hill International Edition, São Paulo, 1983.

67. Allard, F. C., **Fiber optics handbook for engineers and scientists**, McGraw-Hill Publishing Co., New York, 1990.

68. Personick, S. D., **Optical fiber transmission systems**, Plenum Press, New York, 1983.

69. Sterling Jr, D. J., **Technician's guide to fiber optics**, Delmar Publishers Inc., New York, 1987

70. Rao, G. N., Srivastava, S., Srivastava, S. K., Singh, M., **"Chelating ion-exchange resin membrane sensor for nickel(II) ions"**, *Talanta*, 1996, 43, 1821-1825.

71. Nguyen, T., McNamara, K.P., Rosenzweig, Z., **"Optochemical sensing by immobilizing fluorophore-encapsulating liposomes in sol-gel thin film"**, *Analytica Chimica Acta*, 1999, 400, 45-54.

72. Zaporozhets, O., Petruniock. N., Sukhan, V., **"Determination of Ag(I), Hg(II) and Pb(II) by using silica gel loaded with dithizone and zinc dithizonate"**, *Talanta*, 1999, 50, 865-873.

73. Otsuki, S., Adachi, K., **"Characterization of nafion solutions and films and observation of the casting process using basic dyes as optical probes"**, *Journal of Applied Polymer Science*, 1995, 56, 697-705.

74. Newcombe, D. T., Cardwell, T. J., Cattrall, R. W., Kolev, S. D., **"An optical redox chemical sensor based on ferroin immobilised in a Nafion® membrane"** , *Analytical Chimica Acta*, 1999, 401, 137-144.

75. Kuswandi, B., Narayanaswamy, R., **"Polymeric encapsulated membrane for optrodes"** , *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, 364, 605-607.

76. Morozko, S. A., Ivanov, V. M., **"Test methods in analytical chemistry:immobilized 1-(2-piridylazo)-2-naphthol as na analytical reagent**, *Journal of Analytical Chemistry*, 1995, 50(6), 572-578.

77. Lee, D. W., Eum, C. H., Jeon, S. J., **"Adsorption behavior of 8-hydroxyquinoline and its derivatives on amberlite XAD resins, and adsorption of metal ions by using chelating agent-impregnated resins"**, *Analytical Sciences*, 1988, 4, 505-510.

78. Narayanaswamy, R., Sevilla, F., **" Reflectometric of the acid-base equilibria of indicators immobilised on a styrene/divinylbenzene copolymer"**, *Analytica Chimica Acta*, 1986, 189, 365-369.

79. Co, A. C., Ko, A. N., Ye, L., Lucy, C. A., **"Modification of 4-(2-piridylazo)-resorcinol postcolumn reagent selectivity through competitive equilibra with chelanting ligands"**, *Journal of Chromatography*, 1997, 770, 69-74.

80. Lisichkin, G. V., Kudryavtsev, G. V., Nesterenko, P. N., **"Chemically Modified silicas and their use in inorganic analysis"** , *Zhurnal Analiticheskopi Kimii*, 1983, 38(9), 1684-1705.

81. Teixeira, V. G., Coutinho, F. M. B., Gomes, A. S., "**Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divenilbenzeno**, *Química Nova*, 2001, 24(6), 808-818.

82. Zaporozhets, O. A., Gaver, O. M., Sukhan, V. V., **" Immobilisation of analytical reagents on support surfaces"** , *Russian Chemical Reviews*, 1997, 66(7), 637-646.

83. Su, P.G., Huang, S., **"Use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol or 2-(2-pyridylazo)-5-dimethylaminophenol as chelating agent for detremination of cadmium in seawater by atomic absorption spectrometry with on-line flow-injection sorbent extraction"**, *Analytica Chimica Acta*, 1998, 376, 305-311.

84. Ershova, N. I., Ivanov, V. M., "**Diffuse reflection spectroscopy of indium sorbates with immobilized heterocyclic azo compounds**", *Analytica Chimica Acta*, 1998, 364, 235-241.

85. Saxena, R. Singh, A. K., **"Pyrocatechol violet immobilized amberlite XAD-2: synthesis and metal-ion uptake suitable for analytical applications"**, *Analytical Chimica Acta*, 1997, 340, 285-290.

86. Ayonar-Cañada, M. J., Pascual-Reguera, M. I., Molina-Díaz, A., **"Continuous flow-though solid phase spectrophotometric determination of trace amounts of zinc"**, *Analytical Chimica Acta*, 1998, 375, 71-80.

87. Zaporozhets, O., Petruniock, N., Bessarabova, O., Sukhan, V., **"Determination of Cu(II) and Zn(II) using silica gel loaded with 1-(2-thiasolylazo)-2-naphthol"**, *Talanta*, 1999, 49, 899-906.

88. Gojon, C., Dureault, B., Hovnanian, N., Guizard, C., **"A comparison of immobilization sol-gel methods for na optical chemical hydrazine sensor"**, *Sensors and Act. B*, 1997, 39, 154-162.

89. Chung, M., Huang, C.I., Hsung, H.Y., Cheng, K. L., **"Simple on-site tests using XAD resin with immobilized reagent: Determination of copper at parts-per-billion and sub-parts-per-billion levels"**, *Microchemical Journal*, 1998, 59, 462-463.

90. Zimehl, R. **"Flow microcalorimetry and competitive liquid sorption II. Liquid sorption and wetting on macroreticular hydrophilic/hydrophobic networks"** *Thermochimica Acta*, 1998, 310, 207-215.

91. Molina, M. F., Bosque-Sendra, J. M., Nechar, M., El Bergmi, R., **Complexes of Zn(II) and Cd(II) with 4-(2-pyridylazo)resorcinol sorbed on sephadex QAE: characterization and theoretical study**, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 389, 281-290.

92. Vaughan, A. A., **"Optical fibre based heavy metal ion sensing systems"**, Tesis Doctor – University of Manchester, 1998

93. Sotomayor, M.D.P.T., **"Construção e aplicação de optodos em sistemas analiticos baseados em variação de pH"**, Tese de Doutorado – UNICAMP, 2000.

94. Kostov, Y., Tzonkov, S., Yotova, L., **Dynamic model of na optical absorption-based pH sensor**, *Analyst*, 1993, 118, 987-990.

95. Zhang, Y., Seitz, W. R., **Single fiber absorption measurements for remote detection of 2,4,6-trinitrotoluene,** *Anal. Chim. Acta*, 1989, 221, 1-9.

96. Skoog, D. A., Leary, J.J., **Principles of instrumental analysis**, Saunders College Publishing, Orlando, 1992.

97. Zeng, H., Wang, K., Liu, Ch., Yu, R., **A reversible optode membrane for picric acid based on the fluorescence quenching of pyrene,** *Talanta*, 1993, 40, 1569-1573.

98. Tromberg, B. J., Eastham, J. F., Sepaniak, M. J., **Optical fiber fluoroprobes for biological measurements**, *Appl. Spectrosc.*, 1984, 38, 38-42.

99. Meadows, D., Schultz, J. S., **Fiber-optic biosensors based on fluorescence energy transfer**, *Talanta*, 1988, 35, 145-150.

100. Xie, X., Suleiman, A. A., Guibault, G. G., **Determination of urea in serum by a fiber-optic fluorescence biosensor,** *Talanta*, 1991, 38, 1197-1200.

101. Wendlandt, W. W., Hecht, H. G., **Reflectance spectroscopy**, Interscience, New York, 1966.

102. Kortum, G., **Reflectance Spectroscopy, Springer-Verlag,** New York, 1969.
Wendlandt, W. W., Modern aspects of reflectance spectroscopy, Plenum Press, New York, 1968.

103. Kealy, D., **Quantitative reflectometry – principles and scope**, *Talanta*, 1972, 19, 1563-1571.

104. Kortum, G., Braun, W., Herzog, G., **Principles and techniques of diffuse-reflectance spectroscopy,** *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 1963, 2, 333-404.

105. Hecht, H. G., **A comparison of the Kubelka-munk, Rozenberg and Pitts-Giovanelli methods of analysis of diffuse reflectance for several model systems,** *Appl. Spectrosc.*, 1983, 37, 348-354.

106. Guthrie, A. J., Narayanaswamy, R., Russell, D. A., **Application of Kubelka-munk diffuse reflectance theory to optical fibre sensors**, *Analyst*, 1988, 113, 457-461.

107. Grum, F., Wightman, T. E., **Absolute reflectance of Eastman white reflectance standard**, *Appl. Optics*, 1977, 16, 2775-2776.

108. Saldanha, T.C.B., **"Uma metodologia para análise espectrofotométrica multicomponente simultânea na região ultravioleta usando o 4-(2piridilazo)resorcinol (PAR) e calibração multivariada"**, Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco, 1998.

109. Hauser, P. C., Rupasinghe, T. W. T., **"Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer"**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 357, 1056-1060.

110. Yong, P., Eccles, H., Macaskie, L . E., **"Determination of uranium, thorium and lanthanum in mixed solutions using simultaneous spectrophotometry"**, *Analytica Chimica Acta*, 1996, 329, 173-179.

111. Abbas, M.N., Homoda, A.M., Mostafa, G.A.E., **First derivative spectrophotometric determination of uranium(VI) and vanadiuim(V) in natural and saline waters and some synthetic matrices using PAR and cetylpyridinum chloride**, *Analytical Chim. Acta*, 2001, 436, 223-231.

112. Melgarejo, A.G, Céspedes, A.G., Pavón, J.M.C., **Simultaneous determination of nickel, zinc and copper by second-derivate spectrophotometry using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol as reagent**, *Analyst*, 1989, 114, 109-111.

113. Toral, M.I., Richter, P., Rodrígues, C., **Simultanoeus determination of copper and iron by second derivative spectrophotometry using mixtures of ligands**, *Talanta*, 1997, 45, 147-153.

114. Sedaira, H., **Simultaneous determination of manganese and zinc in mixtures using first and second derivative spectrophotometry**, *Talanta*, 2000, 51, 39-48.

115. Gómez, E., Estela, J. M., Cerda, V., Blanco, M., **"Simultaneous spectrophotometric determination of metal ions with 4-(pyridyl-2-azo)resorcinol (PAR)"**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1992, 342, 318-321.

116. Gomez, E., Estela, J. M., Cerda, V., **"Simultaneous spectrophotometric determintion of calcium and magnesium in water"**, *Analytica Chimica Acta*, 1991, 249, 513-518.

117. Engstrom, E., Jonebring, I., Karberg, Bo., **"Assessment of a screening method for metals in seawater based on the non-selective reagent 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR)"**, *Analytica Chimica Acta*, 1998, 371, 227-234.

118. Abdollahi, H., **"Simultaneous spectrophotometric determination of chromium(VI) and iron(III) with chromogenic mixed reagents by H-point standard addition method and partial least squares regression"**, *Analytical Chimica Acta*, 2001, 442, 327-336.

119. Gómez, F.B., Reig, F.B., Falcó, P.C., **" A chemometric study of simultaneous determination of calcium and magnesium in the natural waters"**, *Talanta*, 1999, 49, 155-163.

120. Kargosha, K., Sarrafi, A. H. M., **"Simultaneous spectrophotometric determination of calcium and magnesium in dialysis fluids using multivariate calibration methods"**, *Analytical Letters*, 2001, 34(10), 1781-1793.

121. Ferreyra, R. E., Caminã, J. M., Marchevsky, Luco, J. M., **"Simultaneous spectrophotometric determination of La, Ho, Mn 5-Br-PADAP complexes using multivariate calibration with partial least-square (PLS) data evaluation",** *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 368, 595-600.

122. Rodrigues, A. M. G., Torres, A. G., Pavon, J. M. C., Ojeda, C. B., **"Simultaneous determination of iron, cobalt, nickel and copper by UV-visible spectrophotometric with multivariate calibration",** *Talanta*, 1998, 47, 463-470.

123. Arrabal, M. J., González, P. V., Gámez, C. C., Misiego, A. S., **"Spectrophotometric determination of mixtures of iron(III) and manganese(II) by complexation with 3-indolylacetohydroxamic acid and principal component regression multivariate calibration",** *Analyst*, 1994, 119, 1537-1540.

124. Rezaei, B., Ensafi, A. A., Shandizi, F., **Simultaneous determination of cobalt and nickel by spectrophotometric method and artificial neural network,** *Microchemical J.*, 2001, 70, 35-40.

125. Ghasemi, J., Niazi, A., **"Simultaneous determination of cobalt and nickel. Comparison of prediction ability of PCR and PLS using original, first and second derivate spectra",** *Microchemical Journal*, 2001, 68, 1-11.

126. Walmsley, A.D., **Improved variable selection procedure for multivariate linear regression**, *Analytica Chim. Acta*, 1997, 354, 225-232

127. Arcos, M.J., Ortiz, M.C., Villahoz, B., Sarabia, L.A., **Genetic-algorithm-based wavelength selection in multicomponent spectrometric determination by PLS: application on indomethacin and acemethacin mixture**, *Analytica Chim. Acta*, 1997, 339, 63-77

128. Glavão, R.K.H., Pimentel, M.F., Araujo, M.C.U.,Yoneyama, T., Visani, V., **Aspects of the sucessive projections algorithm for variable selection in multivariate calibration applied to plasma emission spectrometry**, *Analytica Chim. Acta*, 2001, 443, 107-115.

129. Araujo, M.C.U., Saldanha, T.C.B., Galvão, R.K.H., Yoneyama, T., Chame, H.C., Visani, V., **The sucessive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis**, *Chemmetrics and Intell Lab.Sys*, 2001, 57, 65-73.

130. Iturriaga, H., Coelho, J., Maspoch, S., Porcel, M., **Multi-component kinetic-spectrophotometric analysis selection of wavelength and time ranges**, *Analyst*, 2001, 126, 1135-1141.

131. Linares, M.S., Fraga, J.M.G., Jiménez, A.I., Jiménez, F., Arias, J.J., **Influence of the selected wavelength range on the simultaneous spectrophotometric determination of mixture components by use of partial least-squares,** *Analytical Letters*, 1999, 32(12), 2489-2505.

132. Saldanha, T. C. B., Araújo, M. C. U., Neto, B. B., Chame, H. C., **"Simultaneous analysis of Co(II), Cu(II), Mn(II), Ni(II) and Zn(II) in the ultraviolet region using 4-(pyridil-2-azo)resorcinol and multivariate calibration",** *Analytical Letters*, 2000, 33(6), 1187-1202.

133. Silva, J. C.G. E., Oliveira, C. J. S., **"Parafac decomposition of three-way kinetic-spectrophotometric spectral matrices corresponding to mixture of heavy metal ions"**, *Talanta*, 1999, 49, 889-897.

134. Ghasemi, J., Niazi, A., Safavi, A., **"Simultaneous catalytic determination of cobalt, nickel and copper using resazurine sulfide reaction and partial least squares calibration method",** *Analytical Letters*, 2001, 34(8), 1389-1399.

135. Fernández, F. M., Tudino, M.B., Troccoli, O. E., **Multicomponent kinetic determination of Cu, Zn, Co, Ni and Fe at trace levels by first and second order multivariate calibration**, *Analytica Chim. Acta*, 2001, 433, 119-134.

136. Silva, R.P.M., El Khakani, M. A., Chaker, M., Dufresne, A., Courchesne, F., **Simultaneous determination of Cd, Pb and Cu metal trace concentrations in water certified samples and soil extracts by means of Hg-eletroplated-Ir microelectrode array based sensors,** *Sensors and Act B*, 2001, 76, 250-257.

137. Cha, K. W., ParK, C., Park, S. H., **Simultaneous determination of trace uranium(VI) and zinc(II) by adsorptive cathodic stripping voltammetry with aluminon ligand**, *Talanta*, 2000, 52, 983-989.

138. Staden, J. F., Matoetoe, M. C., **Simultaneous determinations of copper, lead, cadmium and zinc using differential pulse anodic stripping voltammetry in a flow system**, *Analytical Chim. Acta*, 2000, 411, 201-207.

139. Ensafi, A. A., Zarei, K., **Simultaneous determination of trace amounts of cadmium, nickel and cobalt in water samples by adsorptive voltammetry using ammonium 2-1mino-cyclopentene dithiocarboxylate as a chelating agent**, *Talanta*, 2000, 52, 435-440.

140. Herrero, A., Ortiz, M.C., **Multivartiate calibration transfer applied to the routine polarographic determinationb of copper, lead, cadmium and zinc**, *Analytical Chim. Acta*, 1997, 348, 51-59.

141. Ni, Y., Wu, Y., **Simultaneous determination fo mixtures of metal ions by complexometric titration and multivariate calibration**, *Analytica Chim. Acta*, 1997, 354, 233-240.

142. Munoz, E., Palmero, S., Garcia-Garcia, M. A., **A continuous flow system design for simultaneous determination of heavy metals in river water samples**, *Talanta*, 2002, 57, 985-992.

143. Silva, P.R.M., El Khakani, M. A., Le Drogoff, Chaker, M., Vijh, A. K., **Mercury-eletroplated-iridium microelectrode array based sensors for the detection of heavy metal ultratraces: optimization of the mercury charge**, *Sensors and Act B*, 1999, 60, 161-167.

144. Ertas N., Akkaya, E.U., Ataman, O.Y., **Simultaneous detemination fo cadmium and zinc using a fiber optic device and fluorescence spectrometry**, *Talanta*, 2000, 51, 6930-699.

145. Chan, W.H., Lee, A.W.M., Kwong, D.W.J., Liang, Y., Wang, K., **Simultaneous determination of potassium and sodium by optode spectra and an artificial neural network algorithm**, *Analyst*, 1997, 122, 657-661.

146 – Raimundo, Jr., I. M., Narayanaswamy, R., **Simultaneous determination of metal ions in water**, *Sensors and Act. B*, 2003, 90, 189-197.

147. Ferreira, M.M.C., Antunes, A.M., Melgo, M.S., Volpe, P.L.O., "**Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial**", *Química Nova*, 1999. 22(5), 724-731.

148. Thomas, E. V., "**A primer on multivariate calibration**", *Analytical Chemistry*, 1994, 66(15), 795A-804A.

149. Reis, M. M., **Aplicação de métodos quimiometricos em separação de espectros e reconhecimento de padrões** - Tese Mestrado – Unicamp – 1997.

150. Ribeiro, F.A.L., **"Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos"**, Tese de Mestrado – Unicamp, 2001.

151. Costa Filho, P.A., **"Algoritmo genético na seleção de variáveis em calibração multivariada de dados espectroscópicos"**, Tese de Mestrado – Unicamp, 1998.

152. Cirino, L., R., **Aplicações de métodos quimiometricos no estudo da relação estrutura-atividade a) congêneros de bifenis policlorados b) derivados de 4 aminometiltioxantenona e 5- aminometilbenzotiopiraindazol** – Tese Mestrado – 2001.

153. www. Galactic.com/ algorithms/pls.htm

154. Helland, I. S., **"Some theoretical aspects of partial least squares regression"**, *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems*, 2001, 58, 97-107.

155. Wold, S., Sjostron, M., Eriksson, L., **"PLS-regression: a basic tool of chemometrics"**, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2001, 58, 109-130.

156. Depczynski, U., Frost, V.J., Molt, K., **"Genetic algorithms applied to the selection of factors in principal component regression"**, Analytica Chimica Acta, 2000, 420, 217-227.

157. Cullen, T. F., Crouch, S. R., **"Factors affecting the accuracy of multicomponent kinetic-spectrophotometric determinations based on multivariate calibration methods"**, *Analytica Chimica Acta*, 2000, 407, 135-146.

158 – Shibata

159. Jesus, F., A. L., de Oliveira, W. A., **Imobilização de 4-(2-piridilazo)resorcinol e seu uso na construção de optodo para determinação de Zn(II)** – VII Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, Resumo 245, 1995.

160 – Oliveira, W. A., Narayanaswamy, R., **A flow-cell optosensor for lead based on immobilized dithizone**, *Talanta*, 1992, 39(11), 1499-1503.

161. Ahmad, M., Narayanaswamy, R., **Optical fibre Al(III) sensor based on solid surface fluorescence measurement**, *Sensors and Act. B*, 2002, 81, 259-266.