

**UTILIZAÇÃO DO MÉTODO SIMPLEX DE OTIMIZAÇÃO
EXPERIMENTAL EM SISTEMAS DE INJEÇÃO EM FLUXO E
APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA
DE FOSFATO EM PLANTAS**

ROBINSON LUIS TUON

Orientadora: Profa. Dra. MARIA FERNANDA GINE ROSIAS

**Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Univer-
sidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia. Área de
concentração: Energia Nuclear na Agri-
cultura**

**PIRACICABA
Estado de São Paulo
Agosto de 1989**

T927u

Tuon, Robinson Luis

Utilização do método simplex de otimização experimental em sistemas de injeção em fluxo e aplicação na determinação espectrofotométrica de fosfato em plantas. Piracicaba, 1989.

127p. *lus*

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Análise por injeção em fluxo 2. Espectrofotometria 3. fosfato em planta - Determinação 4. Método simplex 5. Planta - Análise I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 545.812

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO SIMPLEX DE OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL EM
SISTEMAS DE INJEÇÃO EM FLUXO E APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FOSFATO EM PLANTAS

ROBINSON LUÍS TUON

Aprovado em : 13/09/1989

Comissão Julgadora:

Dra. Maria Fernanda Giné Rosias

CENA/USP

Dr. Roy Edward Bruns

UNICAMP

Dr. Boaventura Freire dos Reis

CENA/USP


Dra. Maria Fernanda Giné Rosias

Orientadora

Aos meus pais Luiz e Inês,
com muito amor
e aos meus irmãos Rogerio e Rosnei,
pela nossa sincera amizade,

OFEREÇO

À Dra. Maria Fernanda Giné Rosias
e aos amigos da Seção de
Química Analítica do CENA,
pelo estímulo e consideração.

DEDICO

" Das tuas águas tão verdes
nunca mais me esquecerei"
(C. Meirelles)

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Fernanda Giné Rosias, pelo incentivo, pela amizade e pela excelente orientação, durante a execução desta pesquisa.

Ao Dr. Boaventura Freire dos Reis, pela constante ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Bohrer Sgrillo, pela iniciação na pesquisa.

Ao Dr. Francisco José Krug e Dr. Henrique Bergamin Filho, pela amizade e efetiva participação.

Ao Dr. Elias Ayres Guidetti Zagatto, Dr. Antonio Octávio Jacynto e Dr. José Roberto Ferreira pela amizade e pelos valiosos conselhos.

Ao Dr. Roy Edward Bruns pela colaboração no tratamento dos dados.

Aos amigos Dr. Epaminondas Sansigolo de Barros Ferraz e Dra. Elisabete De Nadai Fernandes pelo inestimável apoio e confiança.

Ao Dr. Klaus Reichardt e Dr. Reynaldo Victória pela amizade e cooperação.

Ao amigos Dr. Virgílio Franco do Nascimento Filho, Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda, Dr. Julio Marcos Melges Walder, pela colaboração e estímulo.

A Dra. Nativi P. V. Bertolo e Dr. Clovis Pompilio de Abreu pela amizade e consideração concedida.

Ao Centro de Energia Nuclear (CENA), a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação e pelas bolsas de estudo concedidas.

Aos amigos de pós-graduação Eneida Salati, Octávio Matsumoto, Vânia Sass, Max Mesquita, Helder de Oliveira, Marco A. Arruda, Rosana Antonio, Sandra M. Brienza, Ivan de Souza, Marina Santos Filha, Pedro Oliveira, Joaquim Nóbrega, Ana Paula Gervásio, Ivanildo Mattos, Plínio Camargo, Marilda Abbas e Suely Costa pela convivência amiga e pela cooperação em todos os momentos.

Aos técnicos, estagiários e amigos da Seção de Química Analítica do CENA, Cláudia M. Correa, Iolanda Rufini, Valdemir F. de Barros, Sheila P. Rubini, Maria Valéria L. Cruz, Aparecida de Fátima Patreze, José R. Botelho, Carlos Oliveira, Luciana Nalin, César Candido, pela constante ajuda.

Aos amigos Gaston J.F. Ramires, Gabriel A. Sarriés, Ariovaldo M. Carvalho e Marcelo Z. Silva, pela ajuda na parte computacional.

A Maria Mendes de Oliveira, Regina Telles Freitas e Alzira Ferraz Adão pelos serviços de secretaria.

As bibliotecárias Lia Antonioli, Silvia Zinsly, Cristina Pereira e Lidionete P. Brajão pela ajuda e atenção.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL.....	26
3.1. Instrumentos e acessórios.....	26
3.2. Reagentes e soluções.....	27
3.3. Amostras.....	29
3.4. Software.....	30
4. MÉTODO.....	31
4.1. O método simplex aplicado em sistemas FIA.....	31

4.1.1. Aplicação do método simplex em sistemas FIA em linha única sem reação química.....	33
4.1.2. Aplicação do método simplex em sistemas FIA em linha única com reação química	37
4.1.3. Aplicação do método simplex em sistemas em confluência e com reação química	39
4.2. Utilização do processo de reamostragem na zona dispersa para a obtenção da curva concentração x tempo ($F(t)=C$).....	41
4.2.1. O planejamento fatorial 2^k	45
4.2.2. Escolha dos intervalos de tempos e ponto de máximo das curvas experimentais.....	46
4.2.3. Ajuste polinomial pelo método dos mínimos quadrados.....	48
4.2.4. Superfície de 2o. grau ajustada aos dados do planejamento fatorial.....	50
4.2.5. Testes de exatidão no cálculo das concentrações através da curva.....	52

4.3. Aplicação do método simplex na determinação espectrofotométrica de fosfato utilizando sistema FIA.....	54
4.3.1. Procedimentos da otimização.....	54
4.3.2. Procedimento da otimização experimental variando-se a concentração do ácido ascórbico.....	55
4.3.3. Procedimento da otimização experimental, variando-se a concentração do molibdato de amônio.....	60
4.3.4. Superfície ajustada aos pontos observados durante a aplicação do método simplex.....	65
4.3.5. Sistema FIA otimizado para a determinação de fosfato em amostras de extratos vegetais.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1. Otimização utilizando o método simplex em sistemas FIA em linha única sem reação química.....	69
5.2. Otimização utilizando o método simplex em sistemas FIA em linha única com reação química.....	74

5.2.1. Reação espectrofotométrica para determinação de nitrito.....	74
5.2.2. Reação espectrofotométrica para determinação de cloreto.....	78
5.3. Otimização pelo método simplex em sistemas FIA em confluência.....	81
5.3.1. Reação espectrofotométrica para determinação de nitrito.....	81
5.3.2. Reação espectrofotométrica para determinação de cloreto.....	83
5.4. Pontos de máximo das curvas experimentais...	86
5.5. Resultados da análise fatorial.....	88
5.5.1. Análise da variância do planejamento fatorial.....	90
5.5.2. Curvas obtidas pela análise fatorial.	98
5.5.3. Superfície de 2o. grau ajustada aos dados do planejamento fatorial.....	105
5.3.4. Resultados dos testes de precisão....	107
5.6. Resultados da otimização do sistema FIA para determinação espectrofotométrica de fosfato em amostras de plantas.....	111
5.6.1. Resultados da otimização realizada variando-se a concentração do ácido ascórbico.....	111

5.6.2. Resultados da otimização realizada variando-se a concentração do molibdato de amônio.....	113
5.6.3. Resultado da determinação de fosfato em amostras vegetais.....	114
6. CONCLUSÃO.....	117
7. BIBLIOGRAFIA.....	120
8. APENDICE.....	127

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	- Diagrama do sistema de fluxo em linha única.....	34
2	- Diagrama do sistema de fluxos em confluência.....	40
3	- Diagrama do processo de reamostragem na zona dispersa.....	42
4	- Diagrama do sistema utilizado para a otimização da concentração do redutor e do tempo de residência da amostra.....	56
5	- Diagrama do sistema utilizado para a otimização da concentração do reagente e do tempo de residencia da amostra.....	63
6	- Diagrama do sistema utilizado para a determinação espectrofotométrica de fosfato em material vegetal.....	67

7	- Caminho do simplex na otimização do sistema FIA em linha única sem reação química.....	72
8	- Superfície de resposta do sistema FIA em linha única obtida experimentalmente.....	73
9	- Caminho do simplex na otimização realizada com a reação de nitrito no sistema FIA em linha única.....	77
10	- Caminho do simplex na otimização realizada com a reação de cloreto no sistema FIA em confluência.....	85
11	- Efeito do comprimento da bobina de reação no deslocamento temporal do máximo de sinal.....	87
12	- Curvas obtidas através das oito combinações do planejamento fatorial.....	100
13	- Gráfico das distribuições dos desvios das curvas ajustadas em cada combinação do planejamento fatorial.....	102

14	- Superfície ajustada aos dados obtidos pelo planejamento fatorial.....	106
15	- Gráfico de precisão na obtenção de concentrações aleatórias.....	109
16	- Curvas de concentração para procedimento manual de diluição e através da curva.....	110
17	- Superfície ajustada da resposta em função do tempo ($t=f(C)$) e da bobina de reação B2	112
18	- Gráfico de rotina para a determinação espectrofotométrica de fosfato em amostras de plantas.....	116

LISTA DAS TABELAS

Tabela		Página
1	- Combinações do fatorial 2^3	46
2	- Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em linha única com solução colorida.....	71
3	- Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em linha única com reação de nitrito.....	75
4	- Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em linha única com reação de cloreto.....	79
5	- Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em confluência com reação de nitrito.....	82
6	- Valores obtidos através da aplicação do	

	Método Simplex em sistemas em confluência com reação de cloreto.....	84
7	- Quadro dos desvios dos pontos experimentais às curvas polinomiais ajustadas através do planejamento fatorial.....	89
8	- Quadro dos sinais para o cálculo dos efeitos dos fatores.....	95
9	- Quadro das estimativas dos efeitos dos fatores.....	97
10	- Comparação da porcentagem de Co para procedimento manual e através da curva.....	107

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO SIMPLEX DE OTIMIZAÇÃO
EXPERIMENTAL EM SISTEMAS DE INJEÇÃO EM FLUXO E
APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA
DE FOSFATO EM PLANTAS

ROBINSON LUIS TUON

PROFa. Dra. MARIA FERNANDA GINE ROSIAS
(ORIENTADORA)

RESUMO

Estudou-se a utilização do Método Simplex na otimização de alguns parâmetros em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA).

Nos sistemas FIA com detecção espectrofotométrica, foram otimizados os volumes injetados e as bobinas de reação, visando a maximização do sinal em absorbância. Isto foi efetuado em sistemas FIA em linha única sem reação química utilizando-se injeção de solução de Eriocromo cianina R, com reação química de nitrito

pela reação de Griess modificada e cloreto, pela reação com tiocianato de mercúrio e nitrato fêrrico. Estas reações também foram utilizadas nos sistemas FIA em confluência.

Através de um planejamento fatorial, foi estudada a viabilidade de utilizar o processo FIA com reamostragem na zona dispersa, para fazer com que a concentração de reagentes ou soluções, se torne uma variável de ajuste contínuo durante a aplicação do Método Simplex. Através de uma função concentração \times tempo ($F(t)=C$), dada por um polinômio de grau 4, esta curva ajustada permitiu variar a concentração numa faixa de 0 a 18% da concentração da solução inicial.

A otimização dos parâmetros de fluxo e da concentração dos reagentes foi efetuada no sistema FIA para determinação espectrofotométrica de fosfato em digeridos de plantas, pelo método do fosfomolibdênio azul.

No sistema otimizado foram injetados simultaneamente amostra, reagente (molibdato de amônio) e solução redutora (ácido ascórbico). Na coalescência das soluções, obteve-se a reação que levou a maximizar uma função resposta ponderada com peso 0,1 para altura de sinal e 0,9 para tempo de residência da amostra no percurso analítico. O método apresenta resultados com

precisão caracterizada por um desvio padrão relativo menor que 1% para amostra típica de 20 mg PO_4^{3-} /l. Esse sistema permitiu efetuar 300 determinações por hora.

A análise de alguns materiais vegetais, certificados pela NBS (National Bureau of Standards), com o sistema proposto, teve resultados comprovados com os valores certificados.

UTILIZATION OF EXPERIMENTAL OPTIMIZATION SIMPLEX METHOD
IN FLOW INJECTION SYSTEMS AND APLICATION IN THE PHOSPHATE
SPECTROPHFOTOMÉTRIC DETERMINATION IN VEGETABLE MATERIALS

Author: Robinson Luís Tuon

Adviser: Profa. Dra. Maria Fernanda Giné Rosias

SUMMARY

Optimization of the flow injection analysis (FIA) system parameters was performed using the simplex procedure.

Injected volume and reaction coils were optimized in a spectrophotometric FIA system viewing maximization of the absorbance response. For a single line systems without chemical reaction a dye solution was used.

The optimization procedure for a single line system using a spectrophotometric detection was performed to determine nitrite (modified Griess reaction)

and chloride (ferric thiocyanate complex). Similarly, the optimization procedure was employed for the confluence systems using the same spectrophotometric reactions.

The sampling zone approach was used to produce different concentrations by adjusting commutation time delays. A factorial experiment was carried out to choose the best fitted curve to the experimental points.

The simplex procedure using the reagent and reductor concentrations as parameters adjusted continuously using the fitted curve was applied for the spectrophotometric determination of phosphate in plant digest using the blue phosphomolybdenum complex. So, the ammonium molybdate and the ascorbic acid concentrations were optimized together with the injected volume and the reaction coil.

The optimized system employs the simultaneous injection of the sample, colour reagent and reductor solution, producing a merging zone, in order to maximize the response function. This response function was composed by using a 0,1 weight for peak height and 0,9 for sample residence time.

The optimized system allows to perform 300 determinations per hour with a precision characterized by

a relative standard deviation lower than 1% for a typical sample containing 20 mg PO_4^{3-} /l. Accuracy was confirmed by using some plant reference materials from NBS (National Bureau of Standards).

1. INTRODUÇÃO

As modificações trazidas pela implantação de computadores como parte integrante nas rotinas de trabalho já se manifestam como alterações sensivelmente benéficas em todos os campos de pesquisa.

No campo da química, essa necessidade também é uma constante que se evidencia na busca de algoritmos utilizados através de programas computacionais, como meio de solucionar problemas que surgem nessa área, especificamente em automação de análises químicas.

A automação em química analítica teve um grande desenvolvimento a partir da proposição de sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA* ou FI). Esta metodologia baseia-se na injeção de uma amostra líquida em um fluido carregador, sofrendo dispersão enquanto é transportada para a unidade de detecção. Os sistemas FIA caracterizam-se pela facilidade de implementação, possibilidade de manipulação de soluções de forma automatizada, versatilidade para implantação de diferentes processos e métodos envolvidos nas análises químicas, e

* FIA, do inglês Flow Injection Analysis.

alto grau de reprodutibilidade das medidas.

A automação conseguida utilizando-se os sistemas FIA, permitem a variação contínua dos parâmetros químicos (pH, concentração de reagentes) e físicos que determinam o grau de dispersão do sistema (vazões, volumes injetados, volumes de reatores). A otimização dos sistemas FIA, têm sido efetuada utilizando-se o método clássico, no qual, varia-se um parâmetro por vez, mantendo-se os outros constantes. Entretanto, os parâmetros que afetam a dispersão da amostra não são independentes, e por isso, neste caso a otimização deve ser efetuada de forma multivariada. O Método Simplex de otimização aplica-se de forma sequencial e multivariada, principalmente quando os parâmetros envolvidos no sistema podem ser ajustados continuamente.

O Método Simplex consiste em movimentar uma figura geométrica, cujos vértices correspondem a um conjunto de valores dos parâmetros escolhidos para a otimização de uma função resposta. O objetivo da movimentação é o de forçar essa figura até atingir a região de resposta otimizada. Este método, requer o ajuste dos diversos parâmetros envolvidos no sistema a ser otimizado, dificultando-se assim sua aplicação quando esses parâmetros são discretos.

Quando o ajuste dos parâmetros no sistema precisa necessariamente ser processado de forma discreta,

o Planejamento Fatorial é um outro método de otimização utilizado para investigar os diferentes efeitos desses parâmetros. Através desse planejamento pode-se portanto ter uma idéia da significância de cada parâmetro nas características dos sinais de resposta nos sistemas FIA.

O objetivo do presente trabalho consiste em implementar a metodologia FIA com exploração de gradientes de concentração, de forma a obter funções contínuas para a aplicação do Método Sequencial Simplex de otimização, tendo-se em vista principalmente, o ajuste contínuo da concentração de reagentes. Com esse propósito, estudou-se a qualidade do ajuste de curvas da concentração em função do tempo $F(t)=C$, conseguido utilizando-se o procedimento de reamostragem na zona dispersa. Desta forma, diferentes concentrações de uma solução, são geradas de forma contínua e de maneira mais rápida do que as feitas manualmente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Quando se propõe a automação de um sistema, seja ele químico, físico, biológico, etc., deparamo-nos com o problema de sua otimização, isto é, controlar as variáveis que agem sobre o sistema de modo a conseguir as melhores respostas do mesmo.

O processo clássico para conseguir o controle das muitas variáveis que agem sobre um sistema, com o objetivo de otimizá-lo, é usar o Método do Fator Único, ou Univariado. Estuda-se assim um fator por vez, mantendo-se fixos os valores dos fatores restantes, sendo válido quando os mesmos são independentes.

Através da superfície de resposta formada por esses fatores, é possível investigar qual é o efeito de determinado parâmetro no sistema, bem como a sua interação com os outros restantes. Nem sempre a superfície de resposta pode ser visualizada facilmente, principalmente quando existem mais que dois parâmetros considerados.

Através dos experimentos fatoriais, é

possível com poucos experimentos para cada parâmetro estudado, explorar uma grande região do espaço dos fatores (Box et alii (1978)). Quando se deseja fazer um planejamento fatorial, escolhem-se os fatores e alguns níveis para cada um desses fatores conforme a situação do sistema desejado. Desse modo, se L_1 são os níveis do primeiro fator, L_2 os do segundo fator e L_k os do k -ésimo fator, o planejamento completo exigiria $L_1 \times L_2 \times \dots \times L_k$ experimentos. Um planejamento em dois níveis deverá possuir um nível baixo (-) e um nível alto (+). O efeito de um desses fatores neste planejamento segundo Box et alii (1978) seria a consequência na resposta do sistema quando varia-se o fator do nível baixo (-) para o nível alto (+). Os planejamentos em dois níveis são de grande importância prática.

Segundo ~~Gomes~~ **Gomes (1976)**, na definição de **Yates (1937)**, experimentos fatoriais são aqueles que incluem todas as combinações de vários conjuntos de tratamentos ou fatores. Os experimentos fatoriais são geralmente mais eficientes do que os experimentos simples, com um só conjunto de tratamentos, e permitem tirar conclusões mais gerais. Nos experimentos fatoriais os efeitos dos diversos fatores devem ser isolados e provados separadamente.

Deming (1978), citado por **Kowalski (1984)**

cita os experimentos fatoriais e a análise de variância, como métodos desenvolvidos para investigar os efeitos resultantes quando se têm muitas variáveis contínuas no sistema (tais como concentração de reagente, pH, temperatura). As variáveis que possuem um efeito significativo podem, portanto, serem ajustadas para a obtenção de melhores resultados. Segundo esse autor, os primeiros trabalhos envolvendo o problema geral de otimização experimental como uma função de várias variáveis foi colocado por **Hotelling (1941)** e discutido por **Friedman & Savage (1947)**, os quais apresentaram um processo de otimização sequencial univariado.

Através do planejamento fatorial, pode-se investigar de que maneira os vários parâmetros envolvidos em um sistema afetam em suas respostas. Portanto, esses experimentos podem ser realizados, tendo-se em vista escolher os parâmetros mais importantes para serem usados na otimização pelo Método Simplex.

Neste trabalho utilizou-se um planejamento fatorial ³ 2 para investigar como alguns dos parâmetros utilizados no processo de reamostragem na zona dispersa através de sistemas FIA, influem na precisão das curvas de resposta. Em **Box et alii (1978)** encontra-se um exemplo em detalhes desse planejamento, o qual juntamente com o método fornecido por **Gomes (1976)**, foi objeto de uso neste

trabalho.

Uma outra maneira de investigar os diversos efeitos que influem no comportamento de um sistema, seria observar as diversas tendências nos conjuntos de dados, e isto pode ser estudado através de ajustes de modelos. Quando se deseja ajustar um modelo de regressão a um conjunto de n dados, o problema geral da determinação das equações de curvas que se acomodem a esses dados é denominado de ajustamento de curvas (Murray (1974)).

Para funções com mesmo número de parâmetros a serem ajustados, os resíduos E_i , são definidos como a diferença entre os dados observados e os dados estimados pelo modelo. Uma medida da "qualidade do ajustamento" de um polinômio aos dados apresentados, seria $E_1^2 + E_2^2 + \dots + E_n^2$. Segundo Murray (1974), de todas as curvas que se ajustam a um conjunto de pontos, a que tem a propriedade de apresentar o mínimo valor de $E_1^2 + E_2^2 + \dots + E_n^2$, é denominada a melhor curva de ajustamento. A curva polinomial com essa propriedade, ajustará os dados no sentido dos mínimos quadrados.

Um estudo dos resíduos obtidos pelo ajustamento, pode fornecer muitas informações a respeito do ajuste como também investigar se a variância dos resíduos é constante ou não. Às vezes, uma região dos pontos pode se acomodar melhor a uma determinada curva, e assim, pode-se utilizar o ajuste apenas nessas regiões.

Neter & Wasserman (1974) fazem um estudo detalhado das várias formas de distribuições dos resíduos e Murray (1974) explica que, para decidir qual a curva a ser utilizada é conveniente obter diagramas de dispersão das variáveis transformadas, como por exemplo o logaritmo, o qual apresenta uma relação linear se a equação é uma curva exponencial.

A otimização dos sistemas onde existe interação entre as variáveis, deve ser efetuada através de análise multivariada. Box & Jehnken (1955) citado por Spendley et alii (1962), propuseram um procedimento operacional evolutivo para otimização. A aplicação desta técnica ocorre de forma sistemática, através de pequenas variações nos parâmetros do sistema, até o aparecimento de uma direção favorável na superfície de respostas para atingir o ótimo. Spendley et alii (1962) propuseram efetuar uma sequencia experimental na forma de simplex. Para isso consideram as chamadas regras do simplex, que nada mais são do que regras de decisões, a respeito das direções que deve mover o simplex sobre a superfície de resposta, até atingir o ponto de ótimo desejado.

Segundo Spendley et alii (1962), um simplex é uma figura geométrica definida por um número de vértices igual ao número de dimensões do espaço a que pertence mais um. Um simplex em duas dimensões é um triângulo. Um

simplex em três dimensões é um tetraedro e essa definição pode ser estendida a dimensões maiores, mas os simplexes não podem ser visualizados facilmente. A direção das etapas realizadas através das observações nos vértices de um simplex regular, se processará do centro do simplex para fora, através da face que é oposta ao ponto correspondente a pior observação. Assim, um movimento é feito, deslocando-se o simplex para um simplex justaposto, que é determinado, ignorando-se a resposta menos desejável e obtendo-se a sua imagem como se refletida num espelho; através da hiperface dos vértices restantes. Esse movimento do simplex sobre a superfície de resposta ficou conhecido como movimento de reflexão.

De forma geral, **Spendley et alii (1962)** consideram o simplex regular S_0 , com vértices v_1, v_2, \dots, v_{k+1} , e centro C_0 . Sobre cada face de S_0 é possível construir um novo simplex S_j com centro C_j , que possuirá k vértices $v_1, v_2, \dots, v_{j-1}, v_{j+1}, \dots, v_{k+1}$ em comum com S_0 , e completado por um novo vértice v_j^* , que é a imagem refletida de v_j pela hiperface comum aos k vértices menos v_j . A coordenada do novo vértice v_j^* , em notação vetorial é dada por:

$$v_j^* = 2/k (v_1 + v_2 + \dots + v_{j-1} + v_{j+1} + \dots + v_{k+1}) - v_j \quad (1)$$

Supondo agora que S_0 é um simplex no espaço

dos fatores e que as respostas n_j ($j=1,2,\dots,k+1$) nos vértices de S_0 sejam conhecidos ou tenham sido estimados por experimentos y_j , então o movimento será efetuado através do espaço dos fatores na direção $C_0 \rightarrow C_p$, onde C_p é o centro do simplex justaposto. Suponha que y_p seja a pior resposta encontrada entre y_1, \dots, y_{k+1} . Completado o novo simplex S_p , pela exclusão do ponto v_p correspondendo a pior resposta y_p , substitui-se este vértice por um outro v_p^* como definido anteriormente. Caso um resultado ocorrer em $(K+1)$ simplexes sucessivos, então deve-se fazer uma outra observação neste ponto, pois pode ter havido algum tipo de erro experimental. A repetição mostrará se realmente houve este erro, que será eliminado em caso afirmativo. Poderá ocorrer também que y_p seja o pior vértice no novo simplex S_p , neste caso não se deve retornar a S_0 , estando em S_p , mas rejeitar a segunda pior resposta do experimento, que seria também a segunda pior resposta de S_0 . O propósito dessa regra seria o de evitar que o simplex fique oscilando entre os mesmos pontos.

Através dessas regras, espera-se que o simplex venha circular continuamente um ótimo indicado numa região da superfície de resposta.

Uma modificação feita por Nelder e Mead (1965), conhecida como "Simplex de Tamanho-Variável", veio

aumentar sua utilização, oferecendo algumas vantagens primárias sobre o algoritmo original (tamanho fixo): o simplex poderia aumentar seu tamanho e assim cobrir a distância mais rapidamente podendo contrair e então reexpandir numa região diferente, para reorientar-se e mover-se mais eficientemente. Poderia também, contrair repetidamente em torno do ótimo, dando evidências de que um ótimo foi encontrado e que estaria definido nesta região.

A expansão no Simplex Modificado de Nelder & Mead (1965) é fixada como sendo duas vezes a distância de P_0 (o centróide da hiperface definida pelos vértices que permaneceram depois da eliminação do pior vértice), até W (o pior vértice); a contração pode ser mais ou menos a metade desta distância. As regras do Método Simplex Modificado com representações gráficas dos movimentos do simplex, podem ser encontradas em **Desing (1978)** citado por Kowalski (1984).

Long (1969) foi o primeiro a utilizar o Método Simplex Sequencial em Química Analítica utilizando o método original proposto por Spendley et alii (1962), isto é, utilizando-se apenas o movimento de reflexão. A aplicação do simplex permitiu aumentar a sensibilidade na determinação espectrofotométrica de SO_2 pelo método da p-

rosanilina e na determinação de fosfato pelo método do molibdênio azul. Esse autor faz algumas considerações a respeito da seleção dos fatores, localização do simplex inicial, definição da função resposta e fornece outras sugestões sobre a movimentação do simplex sobre a superfície de resposta. Segundo esse autor, as vezes num experimento é necessário considerar várias respostas de interesse. Um processo prático, seria seguir o ótimo da resposta mais importante através dos simpleses, enquanto vai-se medindo todas as outras respostas auxiliares em cada ponto experimental. Depois que o ótimo da superfície das respostas principais tiver sido encontrado, decide-se se este ótimo realmente satisfaz as outras respostas, senão, como diz Long (1969), talvez seja melhor sacrificar a intensidade de sinal por exemplo, em favor da estabilidade, transferindo-se o ponto de ótimo para uma porção diferente da superfície de resposta. Esse autor também sugere a aplicação dos experimentos fatoriais como forma de julgar a significância relativa dos fatores, que devem fazer parte do processo de otimização. Esses experimentos dão uma medida quantitativa da contribuição de cada fator para a resposta, mas isso pode ser descartado quando já se tem experiências preliminares com sistemas similares ao que se vai estudar. Uma observação importante é que os fatores que forem omitidos na

otimização pelo Método Simplex, são os de menor importância para o sistema. Entretanto na região do ótimo, as inclinações da superfície de resposta podem diferir consideravelmente daquelas da região em que foram checados no primeiro fatorial. Isto significa que poderão diferir as magnitudes dos efeitos, devido a uma dada mudança no nível da superfície, como também a importância dos fatores. Nestes casos então, o autor sugere que se refaça um fatorial para escolher os fatores importantes na região encontrada e inclui-los numa outra aplicação do Método Simplex, restrita a essa região. Para estabelecer o primeiro simplex das séries, é necessário decidir sobre os valores iniciais para cada um dos fatores. Isso é feito depois de experimentações preliminares terem indicado a melhor região do espaço dos fatores para o começo da aplicação. Assim então, os pontos experimentais definirão o simplex inicial, com cada ponto representando um vértice do simplex regular da dimensão requerida. Para a aplicação do Método Simplex, Long (1969) recomenda escolher, através de experimentos fatoriais, as variáveis mais importantes para usar no simplex, e manter os outros parâmetros constantes. Em seguida, aplicar as regras do simplex até a região do ótimo ser localizada, como proposto por Spendley et alii (1962) reduzindo os passos e circulando o ótimo. Depois,

se for necessário, para uma nova determinação das variáveis de interesse na superfície de resposta aplicar-se um experimento fatorial restrito para determinar as variáveis de interesse nesta região formulando-se, então, um novo simplex.

Esse autor sugere também, o uso de um processo em que se envolva a atribuição de pesos conforme a importância de cada resposta do sistema. Esse processo foi utilizado por **Morgan & Deming (1974)**.

Quando o sistema necessita otimizar mais do que uma resposta ao mesmo tempo, como é o caso de se desejar maximizar a intensidade do sinal, maximizar a velocidade analítica, minimizar o desvio padrão das medidas, maximizar a faixa linear de trabalho, etc., é possível agrupar essas respostas em uma única função resposta. Dependendo da importância de cada uma delas no sistema, aplicam-se valores em porcentagem, que são os chamados pesos para cada resposta. **Morgan & Deming (1974)**, citam que para se fazer isso é preciso que as respostas sejam dadas numa mesma escala de valores. Sendo assim, quando os diversos fatores têm diferentes unidades de medidas ou diferentes regiões de interesse, é possível transformar seus domínios de valores, a uma única escala. Um caminho seria estender o domínio da escala entre 0 a 1 (ou de 0% a 100%). Isto é realizado através de uma

transformação denominada de escalonamento por intervalo:

$$F = \frac{V - L}{H - L} * 100\% \quad (2)$$

onde:

F é o valor transformado,

V é o valor do fator na escala original,

L é o valor mínimo na escala original,

H é o valor máximo na região de interesse.

Os valores L e H são encontrados através de experimentos preliminares.

Esta maneira de considerar os métodos de otimização, foi também utilizado por **Alonso et alii** (1987), quando selecionou dois sistemas FIA diferentes. Na função resposta foram consideradas a altura de pico e o tempo de residência para a determinação espectrofotométrica de Fe(III) e de Zn(II). Esse trabalho foi realizado com o propósito de verificar o algoritmo descrito acima. A função resposta utilizada foi construída como uma combinação linear dos parâmetros, da seguinte forma:

$$FR = C_i.R_i + C_j(1-R_j) \quad (3)$$

onde:

C_i e C_j são os pesos,

R_i são as variáveis normalizadas para maximizar e,

R_j são as variáveis normalizadas para se minimizar.

Uma modificação adicional do método simplex conhecido como Super Simplex Modificado (SMS), foi introduzido por Routh et alii (1977) como citado por Parker et alii (1985), e aplicado por Van der Wiel (1980). No lugar de limitar o novo vértice a 4 localizações possíveis: a reflexão original R , dada por $P_o + (P_o - W)$; sua expansão dada por $P_o + 2*(P_o - W)$; uma contração dada por $P_o + 0.5*(P_o - W)$; e uma contração alternativa dada por $P_o - 0.5*(P_o - W)$, onde P_o é o centróide da hiperface oposta a W , e W o vértice que corresponde a pior resposta; esse algoritmo permite o novo vértice ser colocado sobre a linha que conecta W a P_o . O algoritmo SMS envolve basicamente um experimento no vértice R , e um no centróide da hiperface P_o . Estes valores, juntamente com o resultado em W , dá 3 respostas ao longo do vetor $W \rightarrow P_o$, suficientes para ajustar um modelo de segunda ordem. O modelo expressa a alteração na resposta de P_o para W e de P_o para R como uma função das distâncias de P_o para W e de P_o para R . Pode-se portanto prever a melhor resposta através dos

parâmetros deste modelo ajustado. Assim, uma experiência é feita neste ponto previsto e a resposta é comparada com aquela em R ; o vértice com a melhor resposta será então retido para formar o novo simplex. Certas restrições existem no algoritmo SMS. Se o modelo mostrar uma superfície côncava, nenhum ponto pode ser encontrado que dê a resposta máxima. Neste caso, o novo vértice é colocado a uma certa distância máxima de P_0 (geralmente, 3 vezes a distância de P_0 a W). Se o vértice previsto estiver fora da fronteira, o vértice é colocado na fronteira. A única desvantagem óbvia do SMS é que um experimento extra é preciso para medir a resposta em P_0 , e que além disso, o modelo deve ser ajustado, envolvendo normalmente inversão e multiplicação de matrizes. Por isso é mais difícil para implantar que o algoritmo de Nelder-Mead (1965). Massart et alii (1978) explicam que no método simplex original, é preciso atribuir um valor para o passo das variáveis que será fixo durante todo o processo. Quando este valor for muito pequeno em relação aos parâmetros do sistema, serão precisos muitos experimentos para encontrar o ótimo; por outro lado, se muito grande, o ótimo não será determinado com suficiente precisão. Em última instância, há a possibilidade de se iniciar um novo simplex, com pequeno valor do passo fixado em torno do ótimo anteriormente previsto.

Entretanto, no Método Simplex Modificado (MS), podem-se variar esses passos durante o processo, oferecendo uma solução mais elegante e eficiente.

Em FIA, diferentes autores (Ruzicka & Hansen (1988) e Janse et alii (1983)), citam as várias interações entre os parâmetros do sistema que afetam a dispersão. Por exemplo, quando a amostra é injetada, a zona dispersa formada vai depender do volume injetado, volume do reator, geometria do reator, vazões dos fluxos, etc. Por essa razão o método univariado torna-se muito falho na maioria dos sistemas desse tipo, pois não leva em conta estas interações.

Janse et alii (1983) utilizaram dois processos de otimização: o Planejamento Fatorial para alguns fatores discretos e o Método Simplex para fatores contínuos, na determinação de fosfato inorgânico em solução aquosa como encontrado em superfícies de águas, utilizando-se sistema FIA.

Os parâmetros utilizados na otimização foram: vazão do fluxo carregador e vazão do reagente, volume injetado e comprimento de bobinas de reação.

Segundo os autores a influência desses fatores, têm sido investigados do ponto de vista teórico e que efeitos complexos de interação são esperados. A Função Resposta, segundo os autores, para ser bem definida, deve

cumprir os seguintes requisitos:

1) Indicar as melhores condições do sistema com respeito ao objetivo desejado, isto é, limite de detecção mínimo, mínima variância dos resultados analíticos, e faixa linear de trabalho mais ampla possível.

2) Deve estar baseada na segurança e reprodutibilidade das observações medidas.

3) A função resposta deve ser medida em um curto espaço de tempo. Para prever os efeitos de variações a curto prazo, seria necessário que as medidas de uma otimização simplex ou uma análise experimental, fossem concluídas em um dia.

As funções resposta para os sistemas FIA, sugeridas por estes autores foram: a) maximização da altura de pico, quando deseja-se otimizar a sensibilidade; b) minimização da largura de pico, segundo os autores isso otimizaria a velocidade analítica; c) maximização da razão sinal-ruído, e neste caso, será preciso o registro de uma série de sinais para se obter o desvio padrão e assim isso entraria em conflito com o item 3, mencionado anteriormente; d) maximização do coeficiente de correlação do gráfico de calibração, neste caso esta função resposta seria um bom critério para a linearidade e para a variância residual.

Neste trabalho, Janse et alii (1983), utilizam o planejamento fatorial e o Método Super Modificado Simplex (SMS) para três parâmetros contínuos de fluxo. Para a otimização pelo Método Simplex, utilizaram uma função resposta dada por:

$$FR = \text{largura de pico} / (\text{altura de pico})^2 \quad (4)$$

Segundo os autores, devido as baixas concentrações de fosfato, a otimização do método utilizando o ácido ascórbico como redutor não foi bem aceita, principalmente devido a lentidão na etapa de redução. Entretanto, numa escala em torno de 1 mg/l de fósforo, este método é confiável, possuindo gráficos com calibração linear com um erro padrão estimado em torno de 0,05 mg/l de fósforo. Em outra parte deste trabalho, utilizaram cloreto estânico como redutor, mas reportaram problemas de variações na linha de base e para resolver isso, adicionaram sulfato de hidrazina como estabilizador. No final do processo de otimização, o método simplex conseguiu alcançar o objetivo originalmente proposto, isto é, maximizar a função resposta dada pela equação 4 e levou a abaixar as vazões de reagente (0,4 ml/min) e do redutor (1 ml/min), mantendo as concentrações dos mesmos constantes em 8 g/l de reagente molibdato e 12 g/l de redutor).

Os autores recomendam efetuar um planeja-

mento fatorial, incluindo ajuste contínuo de parâmetros, antes da aplicação da otimização simplex.

Betteridge et alii (1983) aplicaram o Método Simplex Modificado num sistema FIA em linha única para a determinação espectrofotométrica da isoprenalina pela oxidação do ferrocianeto. O experimento foi realizado primeiramente considerando-se quatro variáveis: comprimento da bobina do reator, vazão do fluxo carregador, pH e concentração do reagente. Em uma segunda série de experimentos incluiu-se o volume de amostra injetado. Esse trabalho mostrou a velocidade com que o Método Simplex encontra o ótimo, variando simultaneamente todos os parâmetros envolvidos na otimização, e verificou-se que este ótimo era similar ao encontrado através do método univariado.

Em 1985-a **Betteridge et alii** desenvolveram novas modificações no Método Simplex Modificado de Nelder & Mead (1965), denominado "Composite Modified Simplex Method (CMS)". Esse método foi primeiramente testado em polarografia (Wade (1983)), e depois em um sistema FIA em sínteses químicas (Betteridge et alii (1985-a)). Posteriormente, em **Betteridge et alii (1985-b)**, fizeram a comparação do CMS, com outros métodos de otimização simplex, encontrados na literatura. A aplicação do CMS em FIA foi utilizada na determinação espectrofotométrica de

urânio (VI), otimizando-se 12 variáveis deste sistema. A resposta foi medida em altura de pico, e para cada experimento foi calculado o desvio padrão das alturas. Utilizou-se também uma resposta alternativa dada por:

$$R = \frac{\text{média das alturas de pico}}{\text{s.d.} + 1} \quad (5)$$

onde s.d. é o desvio padrão das alturas.

Parker et alii (1985) propuseram uma nova modificação do SMS e chamou-se a esse novo algoritmo de SMS2 (Super Simplex Modificado 2). No lugar de fazer um experimento para medir a resposta em P_0 (o centróide da hiperface), a resposta é escolhida como sendo a média das respostas dos vértices retidos. Isto é, todos os vértices no presente simplex com as exceções de W , o vértice correspondendo a pior resposta, e R sua reflexão. Esperou-se que isso diminuiria o número de experimentos. Estudos realizados para medir comparativamente o desempenho do SMS2 com referencia ao SMS e ao MS, concluíram que para calcular as funções matemáticas escolhidas para a 2a. fase da pesquisa, o SMS2 apresenta-se como um algoritmo superior quando a superfície de respostas for simples, enquanto que é melhor utilizar o MS em superfícies mais complexas.

* ICP-AES, do inglês Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry.

Na terceira fase do trabalho, esses dois algoritmos foram comparados utilizando-os na otimização instrumental dos parâmetros do ICP-AES*. Foram realizadas pesquisas univariadas em cada um dos parâmetros para confirmar que os algoritmos simplex tinham localizado o verdadeiro ótimo. Em ambos os métodos, o valor ótimo para cada parâmetro foi bem definido, contudo os dois métodos diferiram na velocidade com que o ótimo foi localizado, o SMS2 requer uma média de 12 estimativas enquanto o MS requer 24 estimativas.

Betteridge et alii (1986) desenvolveram um analisador FIA automatizado, acoplado a um microcomputador contendo uma interface paralela bidirecional para controlar o experimento, adquirir e processar os dados. O objetivo foi facilitar a rapidez no desenvolvimento de novos métodos analíticos baseados em FIA, fazendo uso do método de otimização simplex modificado (MS). Os aparelhos utilizados permitiram a variação das vazões, pH e concentrações dos reagentes. O sistema utiliza cinco bombas peristálticas para controlar a variação na concentração de cada fluido, bem como a vazão total do fluxo, sendo que o microcomputador controla as velocidades dessas bombas através de um software do qual também faz parte o programa que realiza o Método Simplex para se obter os resultados necessários. A esse

sistema, podem ser acoplados detectores espectrofotométricos ou eletroquímicos.

Para cada vértice do simplex foram realizadas três observações e como resposta em cada ponto, foi atribuída a média da altura dos dois sinais mais consistentes entre os três observados. Realizaram 23 experimentos e observaram as respostas em cada vértice do simplex. A resposta do último ponto obtido foi de 3,57 vezes maior que a obtida no início do processo, isto é, no primeiro vértice do simplex.

Como conclusão da pesquisa, observou-se que a melhoria relativa na sensibilidade obtida com a otimização simplex automatizada, foi idêntica comparada com métodos manuais, mas o conjunto das variáveis otimizadas diferem apreciavelmente. No entanto, dado que a natureza da superfície de resposta possuía um grande patamar, os resultados obtidos não foram inconsistentes.

Reis et alii (1981), foram os primeiros a propor o processo denominado "reamostragem na zona dispersa" ou "zone sampling", dentro da metodologia FIA. Este processo possibilita selecionar uma porção determinada de uma zona dispersa, e injetá-la em um outro fluxo carregador, onde sofrerá uma nova dispersão e a levará para a unidade de detecção.

A seleção de uma porção da zona dispersa é

efetuada utilizando uma unidade de comutação, cuja permanência em cada posição é controlada por um intervalo de tempo através de um temporizador. Os autores propuseram este processo para efetuar diluições controladas de uma amostra injetada. Aplicaram este processo para programar diluições na determinação de potássio em digeridos vegetais por espectrometria de absorção atômica. Os resultados das diluições automatizadas apresentaram-se mais estáveis e confiáveis do que as efetuadas de forma manual. Este procedimento foi empregado para efetuar adições padrão por Giné et alii (1983 e 1988).

3. MATERIAL

3.1. Instrumentos e acessórios

- Bomba Peristáltica Ismatec modelo mp13 GJ-4, utilizada como unidade propulsora.
- Espectrofotômetro Micronal modelo B 34211.
- Injetor proporcional com 3 seções de comutação, construído em acrílico segundo Reis et alii (1981) com unidade de comutação operada manual ou comandada eletronicamente por meio de solenóides de tração (Bergamin et alii (1980)).
- Microcomputador SACI (Sistema Automático para Contrôl Instrumental), baseado no microprocessador 8085 da Intel, desenvolvido na Seção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).
- Registrador Potenciométrico Radiometer

com unidade de alta sensibilidade Rea 1/1. Modelo REC 61.

- Tubos de "tygon" de vários diâmetros internos para bombeamento.
- Tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno.
- Conectores de fluxos construídos em acrílico em forma de Y.
- Bobinas helicoidais enroladas em tubo de 2 cm de diâmetro externo.
- Microcomputador PC XT-2002. Microtec, equipado com impressora Rima XT 180, para o tratamento dos dados.
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratórios de química analítica.

3.2. Reagentes e soluções

Foi utilizada sempre água destilada e deionizada para preparar todos os reagentes e soluções padrão.

- Reagente para Cloreto

Preparado com 30 g de nitrato fêrrico,

0,626 g de tiocianato de mercúrio dissolvido em 150 ml de álcool, acrescentou-se 6 ml de ácido nítrico concentrado à mistura, atingindo um volume final de 1000 ml.

- Reagente para Nitrito

Preparado com 5g de sulfanilamida e 0,25g de N-naftil etilenodiamino dicloreto dissolvidos em 25 ml de ácido fosfórico e completado num balão volumétrico de 250 ml.

- Solução Tampão de Acetato de amônio

Preparado dissolvendo-se o sal acetato de amônio em água e ajustado o pH a 4,7 com ácido acético e hidróxido de amônio. Concentração final de 0,2 M.

- Molibdato de amônio

Preparado a partir do sal de molibdato de amônio dissolvido em água em meio ácido de 0,5 M de ácido nítrico (Concentração 7% m/v e 1% m/v).

- Ácido ascórbico

Solução aquosa de ácido ascórbico. Esta solução foi preparada sempre alguns minutos antes de utilizá-la (Concentrações de 6% m/v e 0,26% m/v).

- Solução de ácido perclórico a 0,25 M.

- Solução de ácido nítrico a 0,5 M.

- Solução de Cianina eriocromo R em várias concentrações, pH=3, ajustado com ácido acético e hidróxido de amônio.

- Solução estoque de Cloreto (1000 mg/l), dissolvendo-se 1,6485 g de Cloreto de sódio em 1000 ml de água.

- Solução estoque de Nitrogênio na forma de Nitrito (1000 mg/l), dissolvendo-se 1,231 g de nitrito de sódio em aproximadamente 200 ml de água, acrescentando 2 gotas de clorofórmio e diluindo até 250 ml de água. A solução foi mantida em refrigerador.

- Solução estoque de Fósforo (1000 mg/l), dissolvendo-se 1,098 g de fosfato de potássio em 250 ml de água. Conservada em refrigerador.

3.3. Amostras

Amostras de origem vegetal (serrapilheiras), sofreram digestão nitro-perclórica, de acordo ao procedimento descrito em Krug *et alii* (1977), citado por Zagatto *et alii* (1981)

Os materiais de referência certificados utilizados para a comparação com as amostras de origem vegetal analisados foram : NBS 1575 (PINE NEEDLES), NBS 1573 (TOMATO LEAVES) e NBS 1572 (CITRUS LEAVES).

3.4 Software

O Software computacional do Método Simplex utilizado nesta pesquisa, baseia-se no Método Simplex Modificado (Nelder e Mead (1965)). É um programa em linguagem FORTRAN denominado OTISIM, compatível com os microcomputadores da linha PC-XT (Vergili (1983)).

4. MÉTODO

4.1. O Método Simplex aplicado em sistemas FIA

Um simplex é definido como sendo uma figura geométrica cujo número de vértices é igual ao número de dimensões do espaço a que pertence mais um. Um simplex em duas dimensões é um triângulo. Um simplex em três dimensões é um tetraedro e essa definição pode ser estendida a dimensões maiores, mas os simplexes não podem ser visualizados facilmente.

Para um sistema com n variáveis, $n+1$ experimentos são necessários para iniciar o método. As n variáveis podem ser observadas como um sistema com n eixos ortogonais onde cada experimento pode ser representado por um ponto neste espaço.

Como conclusão do primeiro conjunto de experimentos, determina-se qual é a melhor (M), pior (P) e a próxima (M') resposta. Por reflexão da pior resposta (P) através de um ponto (O) situado na face oposta do simplex, sua reflexão (R) é gerada, esperando-se que essa resposta

seja melhor do que P.

No caso mais simples, o simplex é um triângulo, formado pelos vértices P , M e M' , e O é o ponto médio entre M e M' . De modo mais geral, seria o centro da hipersuperfície formada por todos os vértices do simplex exceto P .

Para estudar as diferentes aplicações do Método Simplex, foram organizados dois experimentos tendo como objetivo o aumento do sinal analítico. A resposta é dada pela altura do sinal obtido. Como cada experimentação neste trabalho foi realizada mantendo sempre constante a escala no registrador, a resposta assim medida é proporcional a sensibilidade.

Foram realizados experimentos com sistemas FIA em linha única sem reação química utilizando a solução colorida de cianina eriocromo R, e experimentos envolvendo reações químicas, no caso, as reações de cloreto e de nitrito.

O método para a reação de nitrito utiliza a complexação e diazotação do nitrito, através da reação de Griess modificada e posterior espectrofotometria deste. O método para o cloreto, baseia-se na reação entre os íons cloreto com tiocianato de mercúrio, com liberação de íons tiocianato, os quais em presença de íons férricos, formam o complexo colorido tiocianato férrico, a ser medido.

Como foi dito anteriormente, o grande problema na aplicação do Método Simplex é o ajuste constante dos parâmetros envolvidos na otimização.

No caso dos sistemas FIA, quando não se tem um monitoramento automatizado no controle dos parâmetros envolvidos no sistema, o ajuste contínuo destes se torna muito difícil. Essa operação de ajustar os parâmetros, deve ser realizada todas as vezes em que se deve fornecer as respostas para a continuação do Método Simplex em direção ao ótimo. A mudança discreta, como é o caso quando se ajustam as vazões com a bomba peristáltica utilizada nesta pesquisa, é um entrave para o método.

Tendo-se em vista esse problema, as vazões não foram consideradas como parâmetros para a otimização do Método Simplex, e sim, se mantiveram constantes durante as aplicações completas do método.

4.1.1. Aplicação do Método Simplex em sistemas FIA em linha única sem reação química

Como uma primeira aplicação do Método Simplex, utilizou-se um sistema FIA em linha única, mostrado na figura 1.

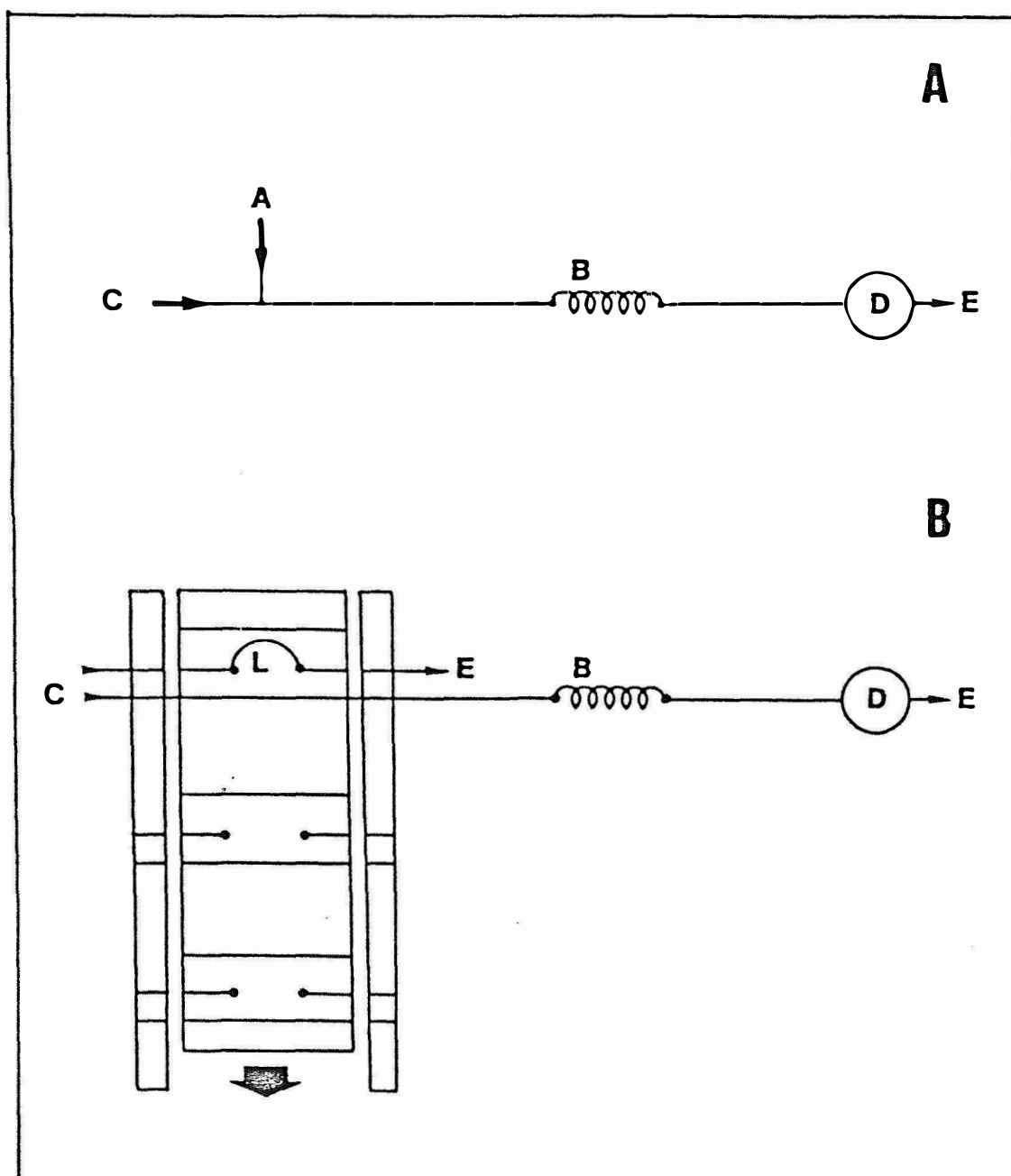


FIGURA 1 - Diagrama do sistema de fluxo em linha única.

A) Esquema do sistema

B) Diagrama operacional do sistema

C- Solução carregadora; A-Amostra; L-Alça que define o volume de amostra a ser injetado em C; E-Sobina tubular helicoidal de reação; D- Unidade de detecção; E-Descarte.

Os parâmetros a serem otimizados, para se maximizar a altura de sinal, foram o comprimento da alça de amostragem L que define o volume injetado na solução carregadora C e o comprimento da bobina de reação B , enquanto que a vazão de C permaneceu constante com valor de 2 ml/min.

Uma solução colorida de cianina eriocromo R é aspirada e a alça L é preenchida com esta solução (figura 1-B). Através da comutação do injetor, o volume contido em L é introduzido na solução carregadora C de acetato de amônio, dispersando-se na bobina de reação B e seguindo diretamente para a unidade de detecção (D), no caso, um espectrofotômetro ajustado a um comprimento de onda de 535 nm e depois descartado (E).

Esse experimento foi repetido três vezes e a média aritmética das alturas dos sinais obtidos, foi utilizada como resposta na aplicação do Método Simplex.

O programa computacional utilizado para a aplicação do Método Simplex exige alguns dados de entrada (inputs) para a inicialização do processo.

Neste caso, os dados iniciais fornecidos ao programa foram :

No. de variáveis = 2

Valores iniciais: $X(1) = 48.0$

$X(2) = 100.0$

Step(1)= 5.

Step(2)= 5.

Critério de parada do Simplex EPS = 0.01

No. de iterações máxima ITMAX = 50

Os valores de $X(1)$ e $X(2)$ definem as coordenadas do ponto de início do processo e correspondem aos valores dos comprimentos da alça de amostragem L e da bobina de reação B, expressos em cm, respectivamente. Os "steps" são as variações iniciais para L e B em cms e indicam neste caso, o tamanho das arestas para a construção do primeiro simplex. O programa também tem um critério para finalizar o processo, definido através de EPS que é a medida mínima entre duas coordenadas de um mesmo parâmetro podendo também finalizá-lo através de ITMAX que corresponde ao número máximo de experimentos que deverão ser realizados.

Após a entrada com os dados iniciais, a resposta experimental obtida com esses valores dos parâmetros, também é fornecida ao programa. A partir desta resposta, inicia-se o processo sequencial, fornecendo ao usuário, os novos valores dos parâmetros com os quais o experimento deve ser realizado, continuando o processo de otimização.

Completada a otimização desse sistema,

obteve-se uma superfície de resposta da altura de sinal (H), com experimentos realizados com diversos valores discretos para o comprimento da alça de amostragem (L) e da bobina de reação (B). Isto foi feito como forma de comprovar o resultado da otimização, em termos de interações entre esses dois parâmetros.

4.1.2. Aplicação do método simplex em sistemas FIA em linha única com reação química

Planejou-se um processo de otimização pelo Método Simplex em um sistema FIA em linha única envolvendo a reação química do nitrito. A vazão do reagente (para nitrito) de 2 ml/min permaneceu constante durante toda a otimização. A concentração da solução padrão usada em todos os experimentos foi de $1 \text{ mg N-NO}_2^- / \text{l}$. Os parâmetros escolhidos para esta situação foram também o comprimento da alça L que define o volume injetado e o comprimento da bobina de reação B (figura 1). O procedimento foi análogo ao realizado no item 4.1.1.

A cada experimentação necessária ao Método Simplex, injetava-se a solução padrão de N-NO_2^- através da

alça de amostragem L, na solução reagente C, e este dispersava-se em B, onde ocorria a reação, seguindo para a unidade de detecção D. O comprimento de onda utilizado no espectrofotômetro foi de 535 nm.

As respostas foram obtidas em triplicata e a média aritmética das alturas dos sinais obtidos, foi fornecida para o Método Simplex.

Além de utilizar uma vazão do reagente de 2 ml/min, essa otimização foi também repetida utilizando-se vazões de 3 e 4 ml/min.

Esta mesma experimentação foi repetida, utilizando-se a reação de cloreto com as mesmas vazões do reagente (para cloreto), isto é 2, 3 e 4 ml/min. O comprimento de onda utilizado neste caso foi de 480 nm. A concentração da solução padrão de cloreto usada em todos os experimentos foi de 20 mg/l.

As condições de contorno para o mínimo e máximo comprimento da alça de amostragem L e comprimento de bobina B, foram definidos durante todas as experimentações de modo a assegurar as características analíticas dos sistemas FIA (Ruzicka & Hansen (1988)). Durante o processamento das otimizações neste caso e durante todas as otimizações realizadas neste trabalho, quando essas características não foram atendidas, uma resposta nula era fornecida.

Para cada otimização fez-se uso do programa computacional da mesma forma descrita no item 4.1.1, mudando-se apenas os valores de entrada que podem ser verificados nos resultados (item 5).

4.1.3. Aplicação do Método Simplex em sistemas em confluência com reação química

Foram realizados experimentos com o sistema em confluência mostrado na figura 2 para a determinação de nitrito e posteriormente repetido para cloreto. A razão entre as vazões C1 e C2 correspondentes ao fluxo da solução carregadora da amostra e ao fluxo confluyente do reagente, foi variada de forma a estudar seu efeito nas aplicações do método de otimização.

Foram realizados experimentos com os valores para C1 e C2, diferenciando-se os três casos mostrados a seguir:

CASO-1) C1=1 ml/min de água e C2=4 ml/min de reagente

CASO-2) C1=4 ml/min de água e C2=1 ml/min de reagente

CASO-3) C1=2,5 ml/min de água e C2=2,5 ml/min de reagente

No sistema da figura 2, a amostra é

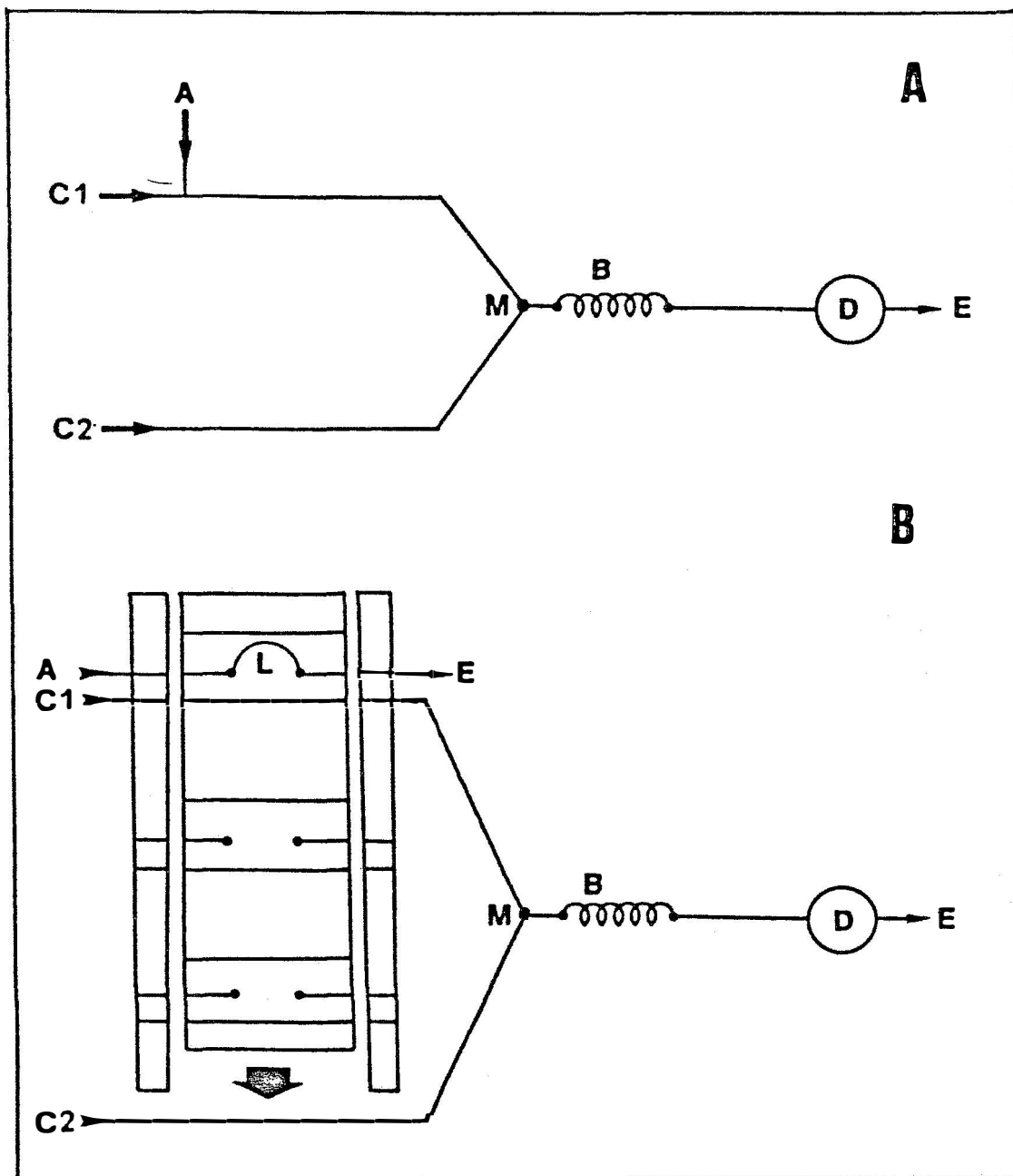


FIGURA 2 - Diagrama do sistema de fluxos em confluência.

A) Esquema do sistema

B) Diagrama operacional do sistema

A-Amostra; L-Alça que define o volume de amostra a ser injetado em C1; C1 e C2- Soluções carregadoras; B-Bobina de reação; M-Ponto de confluência entre os fluxos C1 e C2; D-Unidade de detecção; E-Descarte.

aspirada enchendo a alça L, injetada na solução carregadora C1 e transportada até o ponto M, localizado a 2 cm do injetor (Zagatto et alii (1987)). Neste ponto encontra o fluxo confluyente C2 correspondente ao reagente, ocorrendo a reação durante a passagem por B, até atingir o detector. Os comprimentos de onda utilizados foram os mesmos indicados no item 4.1.2.

Este procedimento foi realizado em triplicata, e a média aritmética das alturas dos sinais foi dada como resposta para o Método Simplex.

4.2. Utilização do processo de reamostragem na zona dispersa, para a obtenção da curva concentração x tempo ($F(t)=C$)

A configuração do processo de reamostragem na zona dispersa utilizado para esta fase da presente pesquisa pode ser observada na figura 3.

Neste processo, uma solução A é aspirada enchendo a alça L1. Através da comutação do injetor, o volume contido em L1 é introduzido na solução carregadora C1, que o transporta até a alça L2. Este volume sofre dispersão durante a passagem na bobina de reação B1,

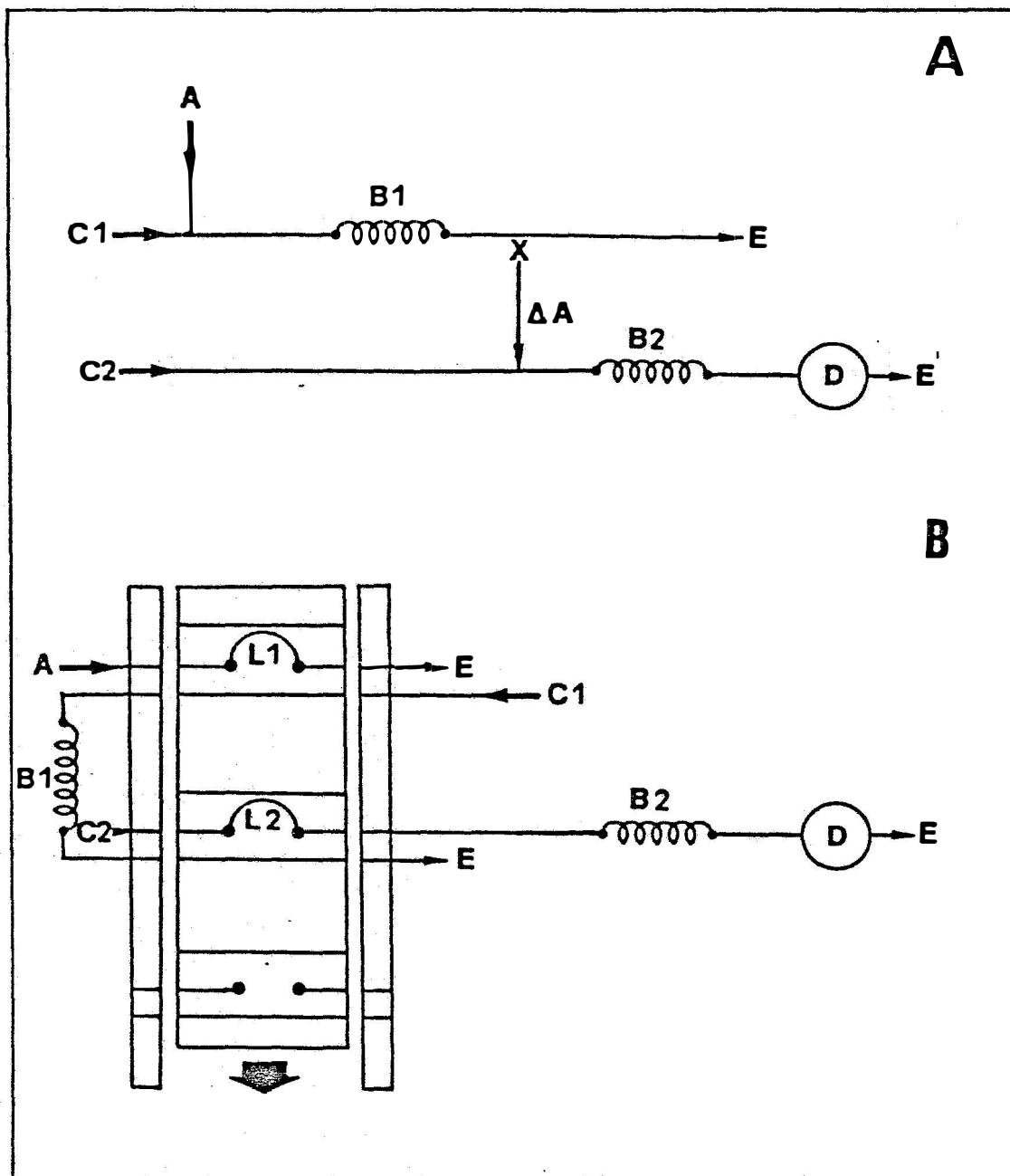


FIGURA 3 - Diagrama do processo de reamostragem na zona dispersa.

A) Esquema do sistema

B) Diagrama operacional do sistema

A-Amostra; A-Portção da zona dispersa; L1 e L2-Álças que definem os volumes injetados em C1 e C2 respectivamente; C1 e C2- Soluções carregadoras; B1 e B2-Bobinas de reacção; D - Unidade de detecção; E-Descarte.

formando uma zona dispersa e posteriormente descartada (E).

Numa segunda comutação do injetor após um intervalo de tempo definido, retira-se através da alça L2 uma porção ΔA da amostra no ponto x da figura 3-A a qual é injetada para ser transportada pela solução carregadora C2, passando pela bobina de reação B2 em direção a cela de fluxo "flow cell" do espectrofotômetro D e descartada (E).

A figura 3 mostra a primeira posição do injetor. O intervalo de tempo em que o injetor permanece nesta posição é chamado de tempo de amostragem, e é escolhido de forma que seja suficiente para encher a alça L1 com a solução A e esvaziar a alça L2 pela solução carregadora C2. Terminado o intervalo de tempo de amostragem, o injetor é comutado, e o volume da alça L1 é injetado na solução carregadora C1, que o transporta, formando a zona dispersa, através de B1 e L2, seguindo para o descarte (E). O intervalo de tempo em que o injetor permanecer nesta posição, chamado de tempo de inserção, é que irá determinar a alíquota que será retirada da zona dispersa.

Finalizando esse intervalo de tempo, o injetor será novamente comutado, voltando a primeira posição. A partir desse ponto um outro ciclo será iniciado.

Desse modo, observa-se que nestes sistemas, a variação do intervalo de permanência do injetor na posição de inserção, permite selecionar diferentes regiões da zona dispersa. Pode-se perceber também, que neste processo, diferentes concentrações da solução injetada através da alça L1 podem ser obtidas em função do tempo. Logo, existe a possibilidade de obter uma equação concentração x tempo ($F(t) = C$), de modo que o tempo calculado utilizando essa equação, permita definir as concentrações desejadas.

Para obter essa equação empírica, foi realizado um planejamento experimental, de forma a escolher os valores dos parâmetros do sistema, que levam a obtenção da melhor curva. O ajuste da melhor curva foi efetuada utilizando-se o método dos mínimos quadrados, minimizando-se os desvios entre os valores observados e os estimados pela equação.

3

Foi organizado um planejamento fatorial 2^3 , o qual teve como objetivo principal estudar o efeito de alguns fatores do sistema esquematizado na figura 3, nos desvios ocasionados, quando a curva é ajustada aos pontos obtidos experimentalmente.

Além disso, serviu para investigar o quanto cada parâmetro afeta a curva obtida experimentalmente, em

têrmos de faixas de concentrações (porcentagens da concentração inicial C_0), forma do gradiente de concentrações que pode ser explorado e curvaturas dos gráficos obtidos.

4.2.1. O planejamento fatorial 2^K

A escolha dos fatores que entraram nas combinações do planejamento fatorial foi feita tendo-se em vista que o sistema de reamostragem na zona dispersa nada mais é do que um sistema em linha única, onde L2 pode ser considerado como o detector.

Para o planejamento fatorial, os fatores considerados foram L1, L2 e B1 (figura 3-B). A vazão da solução carregadora C1 permaneceu constante em 4,5 ml/min de acetato de amônio e no lugar de A foi utilizada uma solução de cianina eriocromo R. Os valores do sistema secundário C2 e B2 foram mantidos constantes em 5 ml/min de acetato de amônio e 150 cm respectivamente.

Para cada um dos fatores foram escolhidos dois níveis:

L1 : 5 cm (-) e 20 cm (+)

L2 : 10 cm (-) e 40 cm (+)

B1 : 50 cm (-) e 100 cm (+)

Dado que temos três fatores e dois níveis, obtivemos um ensaio fatorial 2^3 , o qual levou-nos a oito combinações diferentes relacionadas na tabela 1.

A ordem de realização dos experimentos foram efetuados aleatoriamente, verificada pelo número da combinação.

³

Tabela - 1 Combinações do Fatorial 2^3

Combinação	L1	L2	B1
7	5 (-)	10 (-)	50 (-)
4	20 (+)	10 (-)	50 (-)
2	5 (-)	40 (+)	50 (-)
5	20 (+)	40 (+)	50 (-)
8	5 (-)	10 (-)	100 (+)
1	20 (+)	10 (-)	100 (+)
3	5 (-)	40 (+)	100 (+)
6	20 (+)	40 (+)	100 (+)

4.2.2. Escolha dos intervalos de tempos e ponto de máximo das curvas experimentais

O sinal analítico gerado com os sistemas FIA é caracterizado pelo processo de dispersão. Foi demonstrado por Zagatto et alii (1985), que a amostragem na região descendente da zona dispersa é mais reprodutível.

Tendo-se em vista esta consideração, foi

realizado o ajuste da curva aos pontos obtidos experimentalmente a partir do ponto de máximo ou ponto de inflexão, isto é na parte da curva posterior a este ponto.

A escolha do tempo de inserção inicial, para a obtenção da curva experimental, foi efetuada considerando-se que o ponto máximo da curva é dependente do percurso analítico. Desta forma, foram testados valores da bobina de reação B2 de 50, 100 e 200 cm, para determinar o tempo de inserção correspondente a concentração máxima para cada caso.

Tendo-se esse tempo inicial em mãos, a partir dele, efetuaram-se incrementos de tempos iguais de 0,5 s obtendo-se as alturas dos sinais em triplicata.

As oito combinações do planejamento fatorial originaram oito conjuntos de sinais diferentes entre si. Cada conjunto de sinais produziu uma curva tendo como coordenadas a concentração e o tempo. Para que se houvessem meios de comparação, mediram-se todos os sinais em unidades de absorbância e calculou-se a porcentagem destes, com relação ao sinal conseguido na situação de volume infinito.

Neste trabalho, a situação de volume infinito foi obtida quando a solução colorida inicial (C_0) era injetada através da alça L2.

4.2.3. Ajuste polinomial pelo método dos mínimos quadrados

Um estudo a priori foi realizado, para investigar quais eram os modelos de funções que mais se adaptavam a região de interesse de dispersão do sistema FIA. Verificou-se com isso, que aquelas que melhor se ajustavam foram os polinômios de grau 4.

Em algumas situações, as curvas logarítmicas e as curvas exponenciais também podem ser ajustadas, mas somente os polinômios foram utilizados.

Decidiu-se então neste estudo, verificar qual a curva, da família das funções polinomiais de grau 4, ajustado pelo método dos mínimos quadrados, que melhor se adaptava a cada conjunto de pontos experimentais, obtidos utilizando-se o processo de reamostragem para cada uma das combinações da tabela 1.

Dado que o planejamento experimental foi realizado em triplicata, para o fatorial completo temos informação de 24 conjuntos de pontos, ou seja, 24 curvas experimentais. Para cada ponto temos o desvio entre o valor observado e o estimado. Foi fornecido como respostas para o ensaio, o erro padrão estimado, calculado no momento do ajuste da equação $F(t)=C$, aos pontos das curvas obtidas experimentalmente.

Sendo assim, depois de calculados todos os desvios das vinte e quatro curvas ajustadas, as distribuições da média dos desvios das três repetições foram representadas graficamente.

Obtidas as respostas para cada uma das oito combinações do planejamento fatorial da tabela 1, foi realizada a análise de variância dos dados. A análise de variância pelo teste F é o método de análise mais utilizado. Esquematiza-se assim a análise a ser feita, com suas causas de variação e respectivos números de graus de liberdade (G.L.) e suas Somas de Quadrados (S.Q.).

Neste caso supôs-se que cada combinação diferente do planejamento fatorial fosse um tratamento. O Quadrado Médio de Tratamentos (QMT) mede ao mesmo tempo as diferenças entre tratamentos e o efeito do acaso. Assim, se não houvesse efeito nenhum de tratamentos, restaria apenas o efeito do acaso e QMT estimaria a variância.

O Quadrado Médio do Resíduo mede por sua vez, o efeito do acaso; é uma estimativa da variância, em média para todos os tratamentos, e sua raiz quadrada é uma estimativa do desvio padrão. Portanto, o quociente

$$F = \frac{\text{QMT}}{\text{QMR}} \quad (6)$$

deveria dar um valor próximo de 1. Mas, havendo efeito de

tratamentos, como geralmente há, espera-se que o valor de F seja maior do que 1.0, uma vez que o numerador encerra, além da variação do acaso, a variação dos tratamentos, ao passo que o denominador encerra apenas a variação do acaso.

Nesta pesquisa, utilizou-se para a comparação com esse valor de F , um F' encontrado em uma tabela relativa ao nível de 1% de probabilidade. Isto quer dizer que se não houvessem efeitos dos tratamentos, só em 1% dos casos, a análise de variância desse ensaio, daria valor de F acima de F' ; logo, em 95% dos casos, o valor de F obtido, deveria ser inferior a F' .

Depois de realizada a análise de variância do planejamento fatorial obtiveram-se os efeitos dos fatores segundo o método encontrado em Box et alii (1978).

4.2.4. Superfície de 2o. grau ajustada aos dados do planejamento fatorial

Com os resultados obtidos experimentalmente através do planejamento fatorial, ajustou-se um modelo da função resposta, no caso, os desvios dos ajustes, tendo como parâmetros L_2 e B_1 dado por uma superfície de segundo

grau. A equação desta superfície é dada por:

$$Y = H_0 + H_1 \cdot L_2 + H_2 \cdot B_1 + H_3 \cdot L_2^2 + H_4 \cdot B_1^2 + H_5 \cdot L_2 \cdot B_1 \quad (7)$$

Nesta equação, os H_i ($i=0,1,2,3,4,5$) são coeficientes a serem calculados através da equação matricial:

$$H = (X'X)^{-1} (X'Y) \quad (8)$$

onde:

X é a matriz cujas linhas são formadas pelos valores 1, L_2 , B_1 , L_2^2 , B_1^2 , $L_2 \cdot B_1$, sendo que L_2 e B_1 tomam diferentes valores de acordo a cada combinação da tabela 1, formando as colunas de X ;

X' é a matriz transposta de X ;

Y é a matriz resposta correspondente aos experimentos definidos na tabela 1.

O método do ajuste desta superfície pode ser encontrado em **Deming (1978)** citado por **Kowalski (1984)**. Ajustando-se essa equação aos dados, obtém-se uma superfície de resposta aproximada nas vizinhanças dos valores dos parâmetros considerados.

4.2.5. Testes de exatidão no cálculo das concentrações através da curva

Como meio de se comprovar que realmente seria possível obter concentrações desejadas de uma solução de maneira aleatória através da curva ajustada, observando logicamente a faixa de concentrações possíveis de serem obtidas através do processo de reamostragem na zona dispersa, foram realizados alguns experimentos descritos a seguir.

Usando-se a solução de cianina eriocromo R obteve-se uma curva através do processo de reamostragem na zona dispersa, esquematizado na figura 3. O incremento de tempo escolhido aqui, como anteriormente usado, foi de 0,5 s e B2 foi igual a 150 cm. Desse modo, ajustou-se uma curva polinomial ($F(t)=C$) aos pontos obtidos por esse sistema.

Foram preparadas de forma tradicional, soluções com concentrações conhecidas e a comparação das alturas de sinais permitiram obter uma medida da exatidão. Para isto foram preparadas soluções de 2, 5, 10, 15, 20 % da concentração inicial C_0 de cianina eriocromo R.

Essas soluções foram aspiradas, enchendo-se a alça L2 e injetadas na solução carregadora C2, sofrendo dispersão em B2, e seguindo assim até a unidade de

detecção (D) como esquematizado na figura 3.

O gráfico obtido pelas concentrações conhecidas foram comparadas com os valores obtidos pela equação.

Escolheram-se pontos aleatórios da curva $F(t)=C$ ajustada, para verificar a exatidão com que poderíamos obtê-las através do sistema automatizado.

Para isso, através da equação ajustada, foram calculados os tempos correspondentes a essas concentrações. Digitou-se esses diferentes tempos no Microcomputador SACI, e obtive-se as concentrações aleatórias desejadas.

Depois disso, foram calculadas essas concentrações através da curva de calibração com as soluções padrão preparadas manualmente e com as concentrações obtidas pela curva ajustada e plotadas em gráfico.

4.3. Aplicação do método simplex na determinação espectrofotométrica de fosfato utilizando sistema FIA

4.3.1. Procedimentos da otimização

Tomando-se como base o sistema FIA utilizado para a determinação espectrofotométrica de fosfato em amostras de plantas utilizado em Zagatto et alii (1981), foram planejadas duas experimentações para a aplicação do Método Simplex de otimização. Na primeira utilizou-se o polinômio de grau 4 definido no item 4.2.3 para o ajuste contínuo da concentração do redutor (ácido ascórbico) e na segunda, a do reagente (molibdato de amônio). Nestas duas experimentações considerou-se uma função resposta para minimizar o tempo de residência da amostra e maximizar a altura do sinal.

Estas otimizações foram realizadas aplicando-se pesos nas respostas, conforme a importância de cada uma dentro do sistema utilizando-se a equação 3, do item 2.

4.3.2. Procedimento da otimização experimental variando-se a concentração do ácido ascórbico

Otimizou-se a concentração da solução do redutor e o tempo de residência da amostra no percurso analítico. Para isso, organizou-se o sistema esquematizado na figura 4.

Observando-se esse sistema, nota-se que o processo de reamostragem na zona dispersa foi colocado justaposto ao sistema utilizado por Zagatto et alii (1981), para que se pudesse variar a concentração do redutor durante os experimentos realizados através do processo de otimização pelo Método Simplex.

Devido a concentração de P-PO₄ em plantas ser relativamente alto (de 0,1 a 0,5%), no processo de otimização foi dada menos importância a altura do sinal, em relação ao tempo de residência da amostra. Isso quer dizer que o principal objetivo da otimização, foi a maximização da velocidade analítica.

O tempo de residência da amostra no sistema é diretamente proporcional ao percurso analítico e inversamente às vazões. O percurso analítico depende das vazões e do comprimento da bobina, dado que sempre foi injetado o mesmo volume de amostra. Portanto, neste caso,

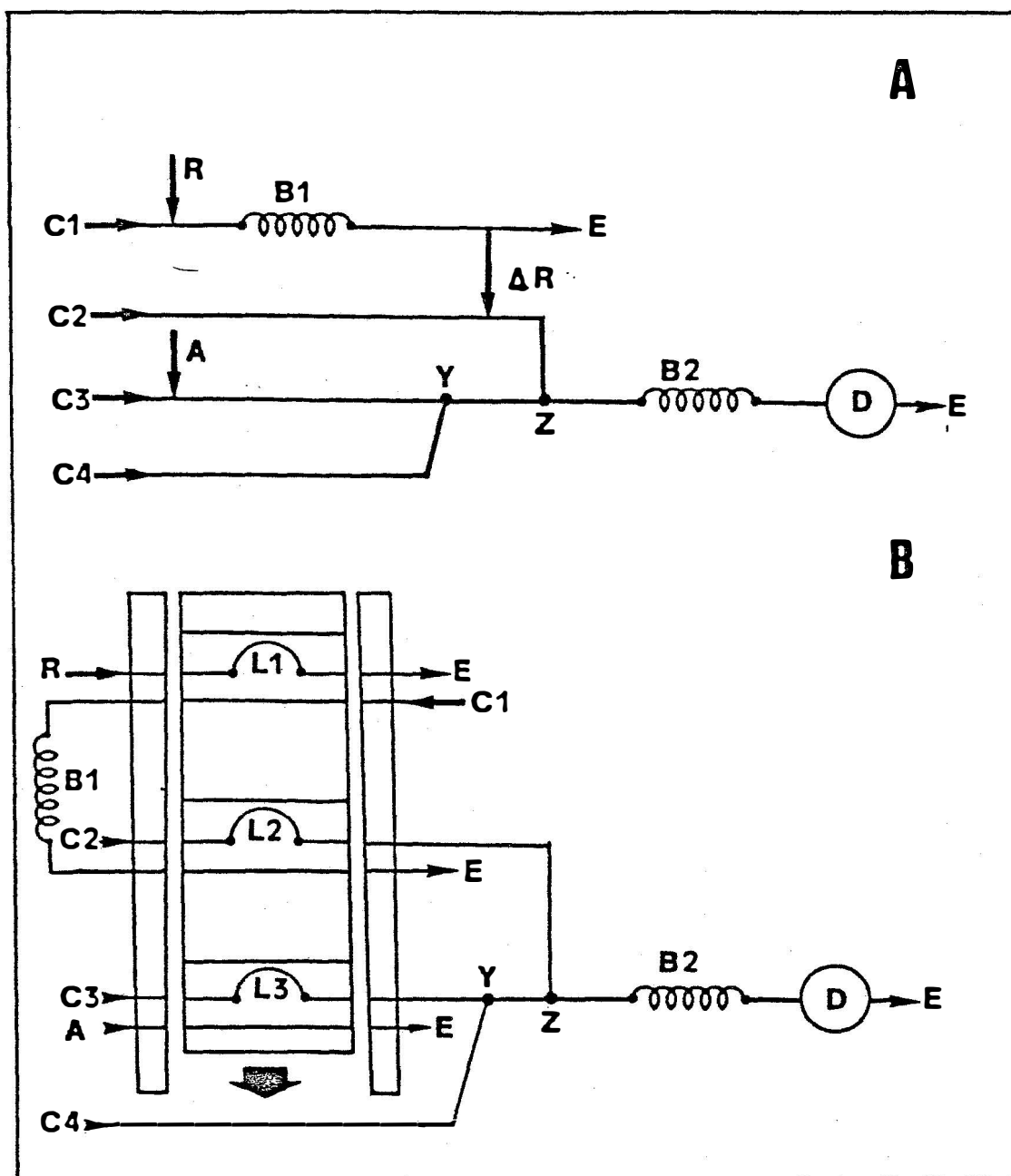


FIGURA 4 - Diagrama do sistema utilizado para a otimização da concentração do redutor e do tempo de residência da amostra.

A) Esquema do sistema

B) Diagrama operacional do sistema

A-Amostra; R-Redutor; ΔR -Porção retirada de redutor; B1 e B2 -Bobinas de reação (B1= 50 cm); C1 e C2- Solução carregadora (H₂O) do redutor; C3- Solução carregadora da amostra (HClO₄); C4-Fluxo do reagente; L1= 5 cm; L2= 40 cm; L3= 5 cm; Y-Ponto de encontro entre amostra e reagente; Z-Ponto de encontro entre amostra, reagente e redutor; D-Espectrofotômetro ajustado a 700 nm; E-Descarte.

minimizar o tempo de residência, significa minimizar apenas o comprimento da bobina de reação, devido a que os valores das vazões permaneceram constantes durante toda a experimentação. Desta forma, a função resposta proposta é uma soma da contribuição da altura do sinal e do comprimento da bobina de reação.

No sistema utilizado por Zagatto et alii (1981) utilizou-se uma bobina de reação de 100 cm, e considerando que o mínimo comprimento possível de se utilizar, devido às condições de reprodutibilidade ou instabilidade do sinal, é de 40 cm, segundo a montagem do sistema para esta pesquisa, os valores limites utilizados neste experimento foram os seguintes:

Resposta	Valores limites (cm)
Altura de pico	- 0 a 25
Compr. da bobina B2 (B)	- 40 a 100

A função resposta foi dada por:

$$FR = 0,1 * R_s + 0,9 * (1-R_t) \quad (9)$$

onde:

R_s é a componente dependente da relação sinal/ruído dada

pela relação:

$$R_s = \frac{S/r - 0}{25 - 0} \quad (10)$$

R_t é a componente dependente da frequência analítica, dada pela relação:

$$R_t = \frac{B - 40}{100 - 40} \quad (11)$$

e onde:

B é o comprimento da bobina de reação B_2 ;

S é o sinal medido em altura de pico e;

r é o ruído.

É fácil ver que a função resposta, após as substituições fica:

$$FR = 0,004 * (S/r) - 0,015 * B + 1,5 \quad (12)$$

Nesta fase experimental, utilizou-se

concentração inicial de 6% m/v de ácido ascórbico como redutor R (figura 4-a). Os parâmetros do sistema de amostragem (C1, L1, B1 e L2) foram os mesmos utilizados para o ajuste do polinômio utilizado para obter a concentração do redutor como $F(t)$.

A solução padrão injetada em A foi de 50 mg P-PO /1 sobre uma solução carregadora C3 com vazão de 5 ml/min. Uma solução de molibdato de amônio (1% m/v) foi bombeada continuamente por C4 com vazão de 2,5 ml/min (figura 4).

Os parâmetros utilizados foram o tempo como função da concentração de redutor e o comprimento da bobina de reação B2.

O redutor é aspirado, enchendo a alça L1. Na primeira comutação do injetor o volume da solução do redutor contido em L1 é injetado na solução carregadora C1 (4,3 ml/min), e transportado através de B1 formando a zona dispersa que enche a alça L2, enquanto o padrão de fósforo é aspirado enchendo a alça L3.

Na segunda comutação do injetor, uma porção da zona dispersa da solução do redutor (ácido ascórbico), é retirada através de L2, e injetada na solução carregadora C2 (2,5 ml/min). Simultaneamente o padrão de fósforo é injetado na solução carregadora C3 (5 ml/min), encontrando o reagente (solução de molibdato de amônio) no

ponto Y. Neste ponto, ocorre a primeira reação. Posteriormente, o composto formado de fósforo e do redutor coalescem no ponto Z, reagindo, e formando o complexo de fosfomolibdênio azul no seu transporte para o detector D ajustado a 700 nm. Posteriormente é descartado (E).

O fosfato na presença do molibdato forma um heteropoliácido amarelo, e na presença do redutor, o molibdênio passa de um número de oxidação 6 para 5, produzindo a cor azul (Pessenda (1981)). A primeira reação é rápida e a segunda é relativamente lenta, mas como em sistemas FIA, o tempo de medida do composto é constante, fica sempre assegurada a redução da mesma fração do heteropoliácido (Ruzicka & Hansen (1981)).

Esse experimento ocasiona um sinal no registrador, utilizado para a função resposta da equação (12), que é fornecida no Método Simplex.

Os dados de entrada para o programa computacional foram análogos aos do item 4.1.1.

4.3.3. Procedimento de otimização experimental variando-se a concentração de molibdato de amônio

De maneira análoga à experimentação realizada no item 4.3.2, otimizou-se a concentração do reagente (molibdato de amônio) e o tempo de residência da amostra no percurso analítico. Para isso, organizou-se o sistema esquematizado na figura 5.

Neste caso, também foi dada menos importância a altura do sinal, em relação ao tempo de residência da amostra até a detecção, por se tratar de análise de fosfato em plantas. O principal objetivo da otimização, também foi a maximização da frequência analítica.

Os valores das vazões, como no caso 4.3.2, permaneceram constantes durante o processo de otimização. Neste caso, também minimizamos o comprimento das bobinas de reação, pois desejamos minimizar o tempo de residência.

As condições de fronteira utilizadas neste experimento foram :

Resposta	Valores limites (cm)
Altura de pico	- 0 a 25
Compr. da bobina $B=(B2 + B3)$	- 40 a 100

A função resposta foi dada pela equação 9, onde R_s é análogo ao utilizado na equação 10. Substituindo B pela soma dos comprimentos das bobinas B2 e B3, R_t para este caso fica sendo:

$$R_t = \frac{R - 40}{100 - 40} = \frac{(B_2+B_3) - 40}{100 - 40} \quad (13)$$

É fácil ver que a função resposta, após as substituições fica:

$$FR = 0,004 * (S/r) - 0,015 * (B_2+B_3) + 1,5 \quad (14)$$

Utilizou-se neste experimento uma concentração de molibdato de amônio de 7% m/v, injetado através do processo de reamostragem na zona dispersa, e a concentração do redutor igual a 0,26% m/v, como encontrada na otimização organizada no item 4.3.2, colocado continuamente no fluxo C4 (2,5 ml/min). O padrão de fósforo foi de 50 mg P-PO⁴/l injetado em C3.

Os parâmetros utilizados foram o tempo como função da concentração do reagente e os comprimentos das bobinas de reação B2 e B3.

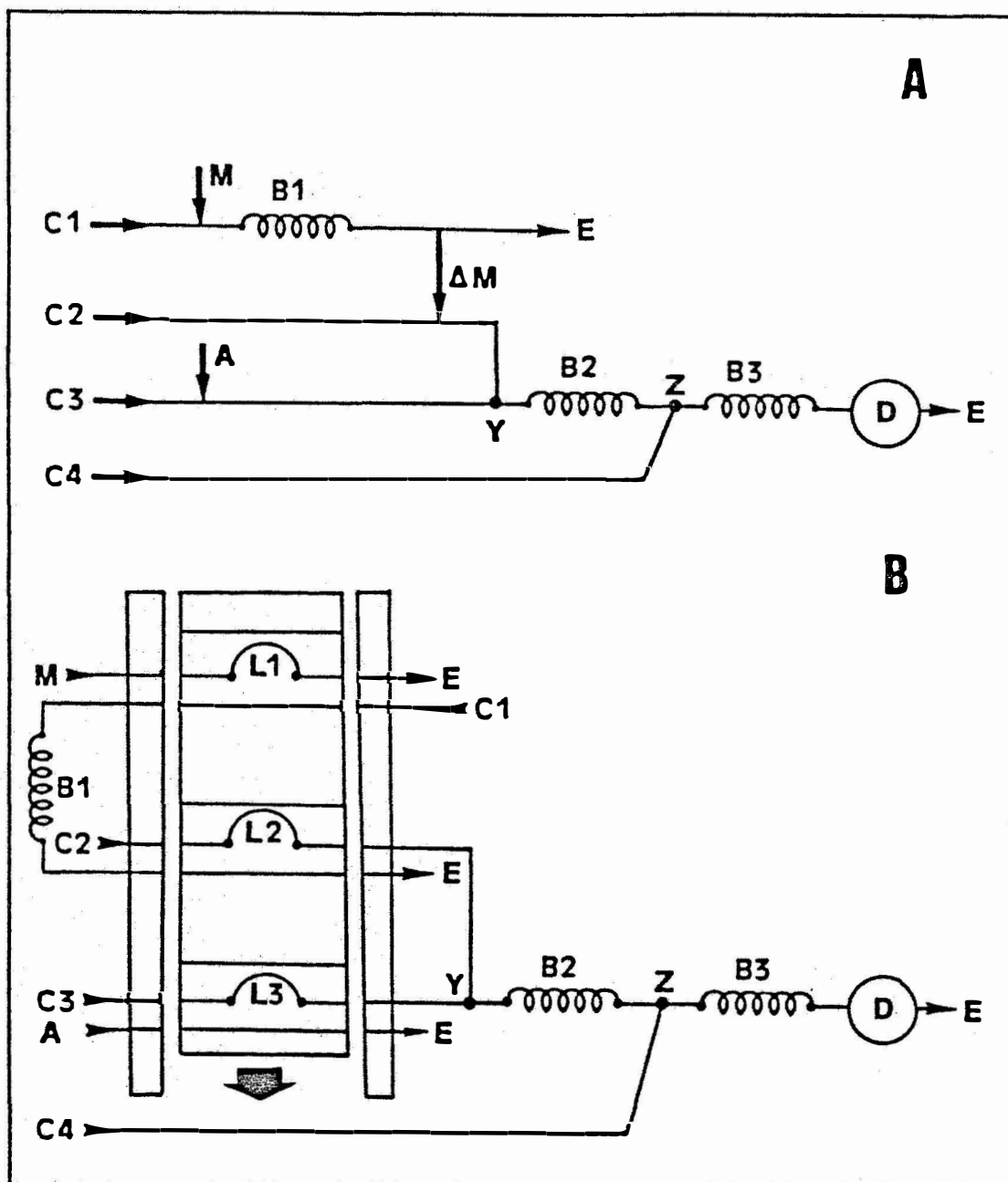


FIGURA 5 - Diagrama do sistema utilizado para a otimização da concentração do reagente e do tempo de residência da amostra.

A) Esquema do sistema

B) Diagrama operacional do sistema

A-Amostra; M-Reagente; Δ M-Forção retirada de reagente; L1=5 cm, L2=40 cm, L3= 5cm C1 e C2- Solução carregadora do reagente (HNO₃); C3- Carregador da amostra (HC10₄); C4-Fluxo de redutor (ácido ascórbico); B1(50 cm). B2 e B3- Bobinas de reação; Y-Ponto de encontro entre amostra e reagente; Z-Ponto de encontro entre amostra, reagente e redutor; D- Espectrofotômetro ajustado a 700 nm.

O reagente é aspirado, enchendo a alça L1. Na primeira comutação do injetor o volume da solução do reagente contido em L1 é injetado na solução carregadora C1 (4,3 ml/min), e transportado através de B1 formando a zona dispersa que enche a alça L2, enquanto o padrão de fósforo é aspirado enchendo a alça L3.

Na segunda comutação do injetor, uma porção da zona dispersa da solução do reagente, é retirada através de L2, e injetada na solução carregadora C2 (2,5 ml/min). Simultaneamente o padrão de fósforo é injetado na solução carregadora C3 (5 ml/min), encontrando o reagente no ponto Y. Neste ponto, ocorre a primeira reação. Posteriormente, as zonas dispersas da solução de fósforo e do redutor coalescem no ponto Z, reagindo, e formando o complexo de fosfomolibdênio azul, que segue diretamente para o detector (D) ajustado em 700 nm e depois é descartada (E). Esse experimento ocasiona um sinal transiente no registrador completando os dados necessários para a função resposta considerada, que é fornecida no Método Simplex.

Os dados de entrada para o programa computacional foram análogos aos do item 4.1.1.

4.3.4. Superfície ajustada aos pontos observados durante a aplicação do método simplex

Uma superfície de segundo grau dada pela equação (7) pode ser ajustada aos pontos obtidos durante a otimização pelo Método Simplex, descrita em 4.3.2. Esse ajuste normalmente é realizado com dados adquiridos por um planejamento fatorial, mas desde que na equação 8, a inversa da matriz $(X'X)$ exista, é possível calcular os parâmetros H_i 's ($i=0, \dots, 5$) e obter a superfície desejada. Essa superfície foi ajustada em função do tempo t , parâmetro este que define a concentração do redutor, e da bobina de reação B2. O método de ajuste foi análogo ao realizado no item 4.2.4.

4.3.5. Sistema FIA otimizado para determinação de fosfato em amostra de extratos vegetais

Depois de otimizar a concentração de reagente, do redutor e o tempo de residência nos sistemas FIA para a determinação de fosfato em plantas nos itens 4.3.2. e 4.3.3, foram calculadas as concentrações realmente efetivas do reagente e do redutor. O sistema otimizado foi

então modificado, fazendo-se uso do processo de coalescência de zonas, para a introdução do reagente e do redutor. A amostra, o reagente e a solução redutora seriam injetados nas respectivas soluções carregadoras como mostra a figura 6-A, minimizando o consumo dessas soluções.

Utilizou-se nesta análise uma concentração do reagente igual aquela utilizada em Zagatto *et alii* (1981), ou seja 1% em 0,5 M de ácido nítrico. A concentração do redutor foi de 0,26% como obtido pela otimização feita no item 4.3.3, e os demais parâmetros podem ser visto na figura 6-B.

A zona da amostra encontra a zona do reagente no ponto Y e segue pela bobina de reação B1, encontrando a zona do redutor no ponto Z e seguindo para a unidade de detecção D, através da bobina B2. Depois da passagem pelo detector (D), é descartada.

Este sistema foi previamente sincronizado para assegurar a coalescência das três espécies injetadas. Para efetuar o sincronismo, foi utilizada uma solução colorida de cianina eriocromo R, injetada em sequencia via L1 e L2. Através do ajuste das distâncias entre o injetor e o ponto Y, foi conseguida a coalescência de L1 e L2. A distância entre o ponto de injeção de L1 e Y foi de 8 cm e entre L2 e Y foi mínimo (5 cm). Para efetuar o sincronismo

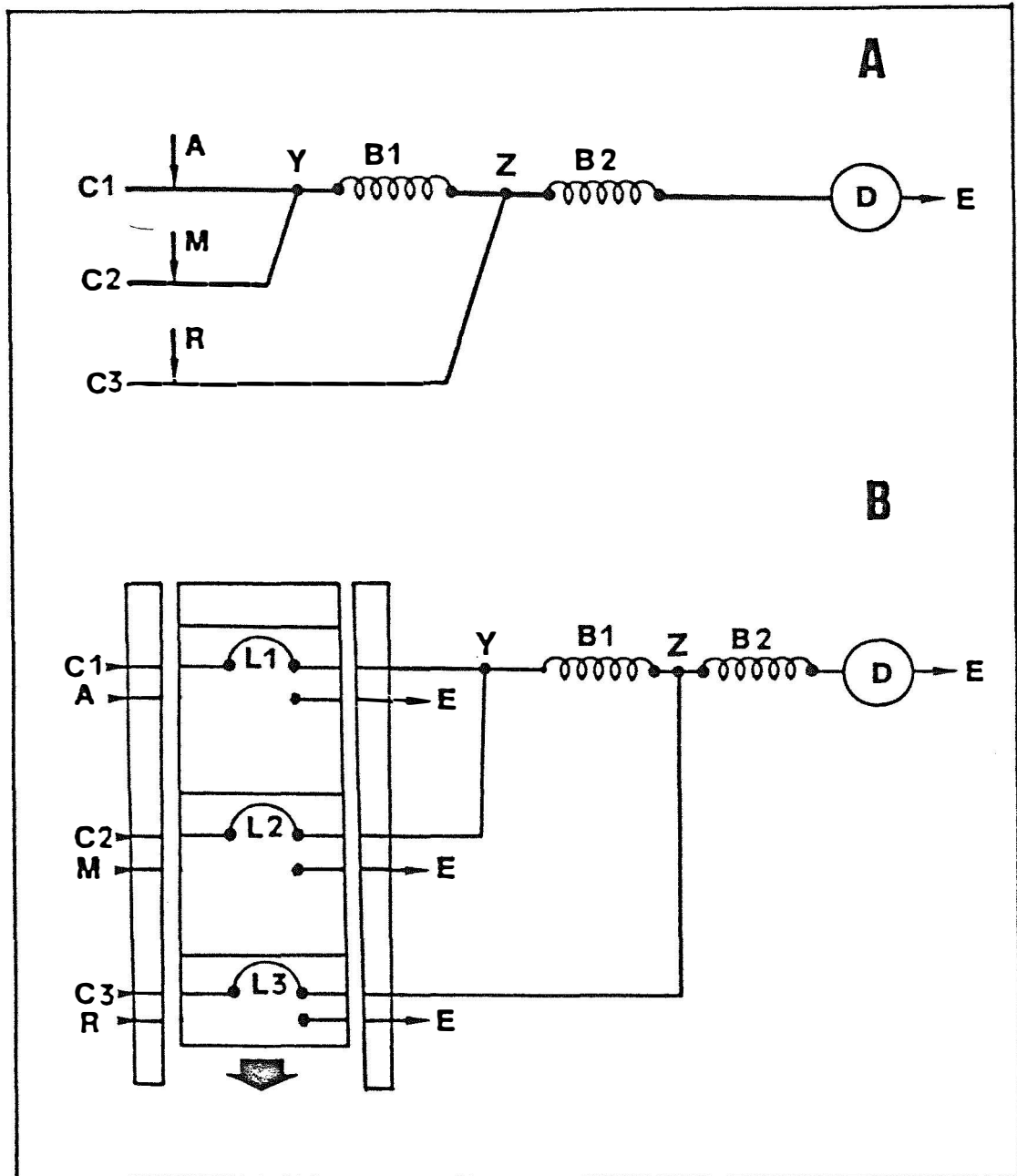


FIGURA 6 - Diagrama do sistema utilizado para a determinação espectrofotométrica de fosfato em material vegetal.

A-Amostra; M-Reagente (molibdato de amônio); R-Redutor (ácido ascórbico); C1, C2 e C3-Soluções carregadoras da amostra, reagente e redutor de 5; 2,5 e 2,5 ml/min respectivamente; B1=15 cm, B2=70 cm; Y-Ponto de encontro entre amostra e reagente; Z-Ponto de encontro entre amostra, reagente e redutor; L1= 2,5 cm; L2= 50 cm; L3= 25 cm; D - Espectrofotômetro ajustado a 700 nm; E-descarte.

entre L1 e L3, foi necessário ajustar as distâncias de Y a Z e entre o ponto de injeção de L3 a Z. Desta forma, as distâncias YZ foi de 15 cm e entre L3 e Z de 15 cm.

Com o sistema proposto, fez-se a análise de rotina em 27 amostras de extratos vegetais e 3 amostras de materiais certificados, totalizando 30 amostras. Para isso foi obtida a curva de calibração com soluções padrão de 10, 20, 30, 40 e 50 mg P-PO /l.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização utilizando o Método Simplex em sistemas FIA em linha única sem reação química

Os resultados da primeira aplicação da otimização pelo Método Simplex no sistema FIA em linha única, conforme o procedimento descrito em 4.1.1., foram obtidos utilizando-se uma solução colorida para a maximização da altura de sinal. Estes resultados são mostrados na tabela 2 e representados graficamente na figura 7. Nesta figura, observa-se que o simplex caminhou sobre a superfície formada pelos parâmetros L e B, em direção à região dos menores valores da bobina de reação e aos valores maiores de volume injetado. O maior sinal obtido ocorre, como era esperado, quando o volume injetado tende ao volume infinito. Para isto, chegou-se a um valor de L de aproximadamente quatro vezes o valor do comprimento da bobina de reação B, considerando que a vazão do fluxo da solução carregadora foi de 2 ml/min. A resposta no ponto de ótimo (simplex de número 22) foi 4,6

cm maior que a resposta inicial, o que corresponde a 67 % em aumento de sinal.

A figura 7 mostra o caminho percorrido pelo simplex, correspondendo aos valores de L e B pedidos pelo método e aos valores das respostas (H) observadas para os mesmos. A figura 7-A, mostra uma tendência crescente para L, e decrescente para B, no processo sequencial em direção ao ótimo. Estas considerações são válidas devido a que foi otimizada apenas a altura do sinal. Provavelmente, ocorrem variações na localização do ótimo, quando no processo de otimização, considera-se além das alturas de sinais, a precisão dessas medidas.

A figura 8 mostra uma superfície de resposta obtida para valores discretos de L e B. Nesta figura podem-se visualizar os valores que esses dois parâmetros podem assumir, de forma a atingir a região de máximo. Esta região é atingida quando o volume injetado tende ao volume infinito, representado pelo plano $B \times L$ quando $H = 15$ cm.

Observando-se os planos $H \times L$ (figura 8), para diferentes valores de B, verifica-se que as curvas para os valores maiores de B não atingem a região de máximo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos através da otimização simplex, onde o ótimo foi conseguido para um valor L de quatro vezes o de B (tabela 2).

TABELA - 2 Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em linha única com solução colorida.

No.do Simplex	Alca de amost. L (cm)	Bobina B (cm)	Resposta (cm)
1	48,0	100,0	6,9
2	53,0	100,0	7,2
3	48,0	105,0	6,2
4	53,0	95,0	7,5
5	55,5	90,0	7,5
6	58,0	95,0	7,7
7	63,0	92,5	8,4
8	63,0	87,5	8,7
9	68,0	81,2	9,0
10	78,0	78,7	9,6
11	90,5	70,6	10,0
12	83,0	67,5	9,7
13	93,0	55,0	10,0
14	93,0	65,0	10,3
15	105,5	56,8	10,5
16	110,5	45,6	11,0
17	86,1	70,4	10,3
18	108,6	59,8	11,0
19	89,4	65,5	10,4
20	108,7	51,9	10,8
21	120,1	42,7	11,1
22	136,2	34,0	11,5

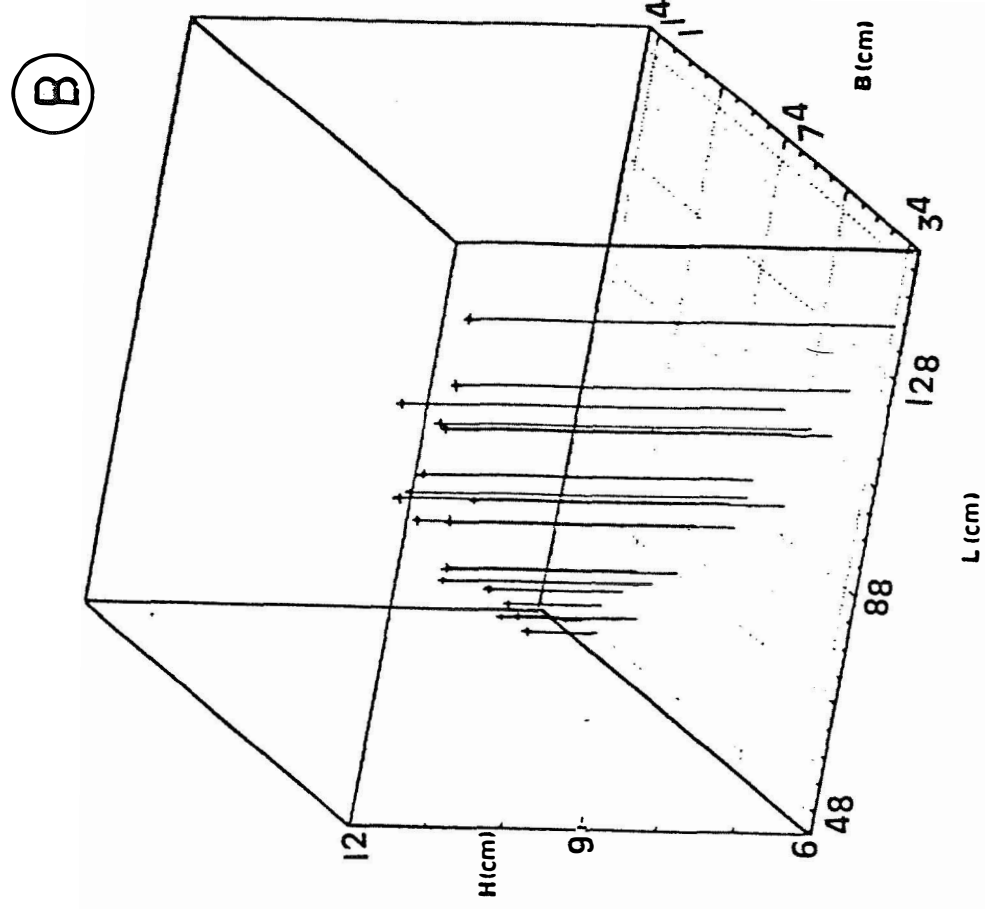
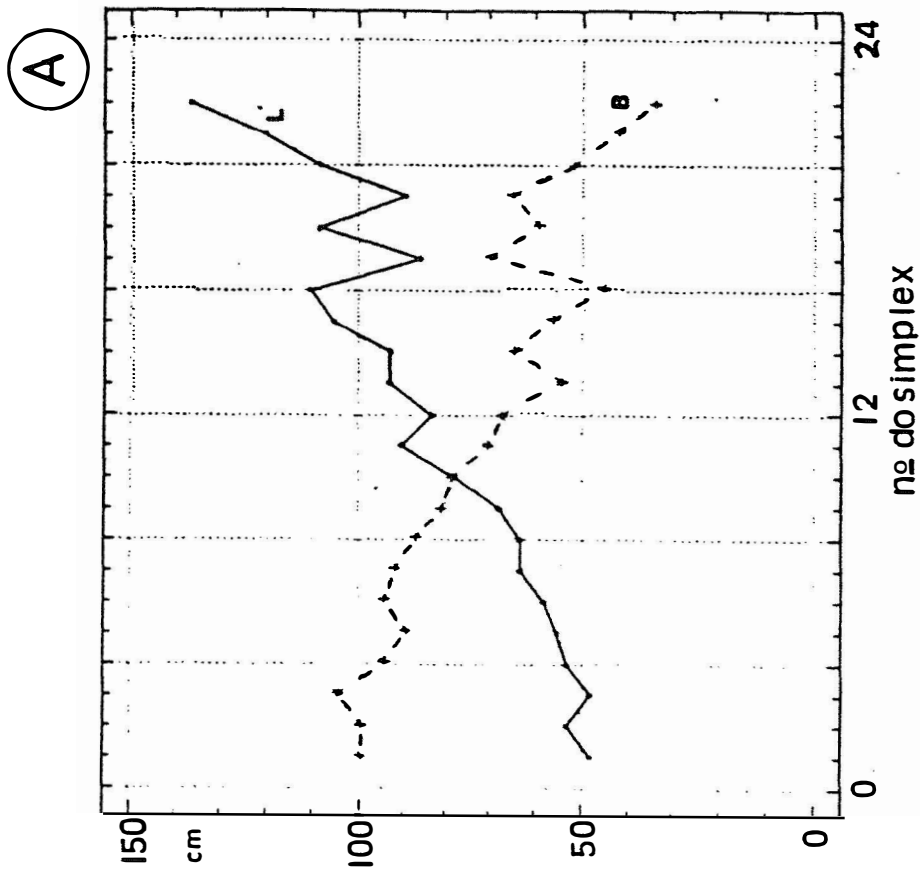


FIGURA 7 - Caminho do simplex na otimização do sistema FIA em linha única sem reação química.

A) Tendência de L e B (alça de amostragem e bobina de reação) no desenvolvimento do simplex.

B) Vista tridimensional das variações conjuntas de L e B na altura da resposta H.

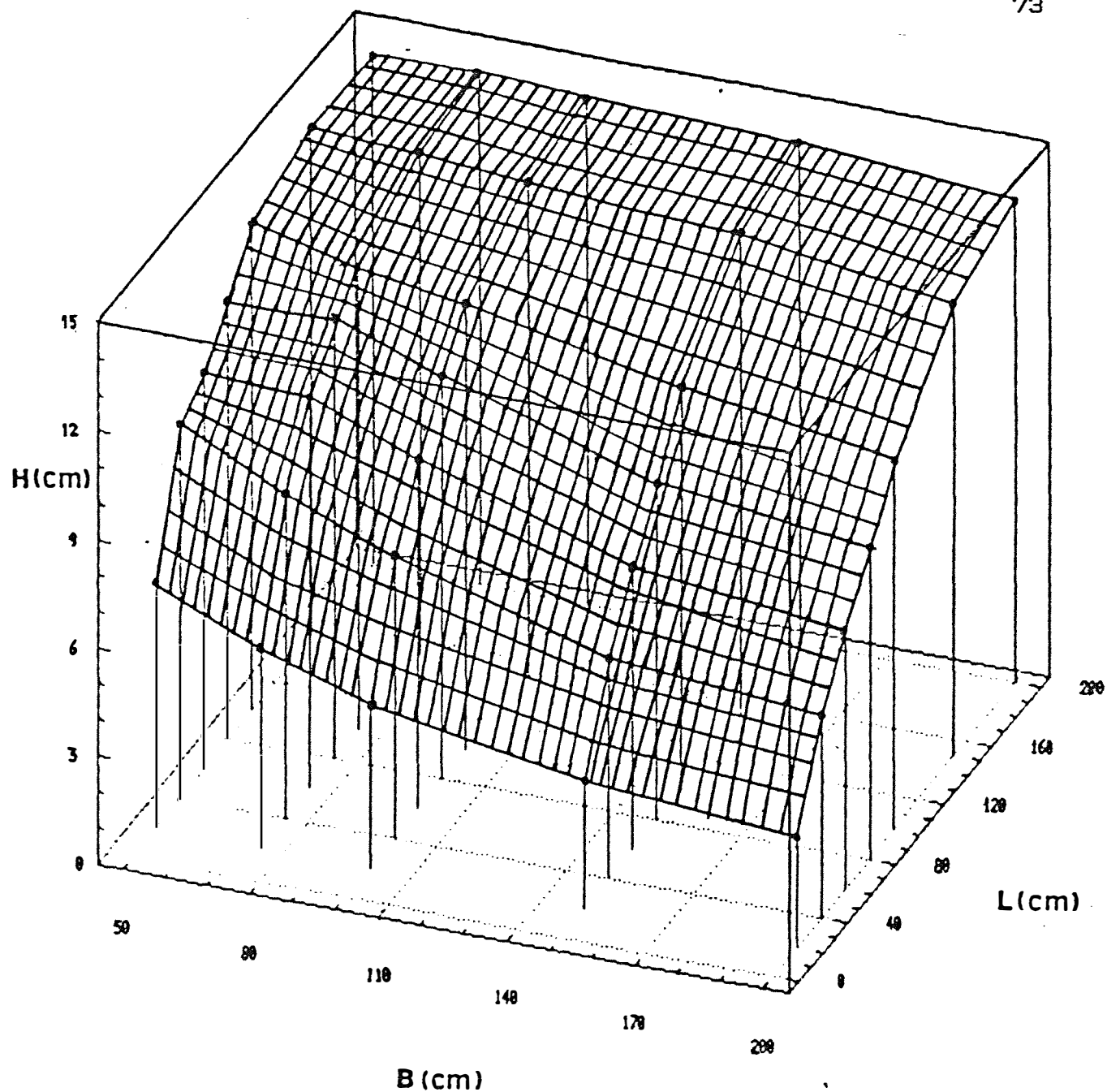


FIGURA 8 - Superfície de resposta do sistema FIA em linha única obtida experimentalmente. L e B correspondem aos comprimentos da alça de amostragem e bobina de reação respectivamente; H é a resposta expressa em altura de sinal.

5.2. Otimização utilizando o método simplex em sistemas FIA em linha única com reação química

5.2.1. Reação espectrofotométrica para determinação de nitrito

Os resultados da aplicação do Método Simplex ao sistema FIA em linha única para determinação espectrofotométrica de nitrito, conforme o procedimento descrito em 4.1.2., podem ser vistos na tabela 3.

Comparando-se os resultados dos casos A, B e C, caracterizados por vazões de 2, 3 e 4 ml/min apresentados na tabela 3, pode-se observar que há um efeito significativo da vazão da solução carregadora no número de experimentos necessários para atingir a situação de ótimo. Assim, os simplexes correspondentes ao ótimo foram os de números 9; 15 e 25 respectivamente.

Neste estudo, observou-se que o platô da região ótima da superfície de resposta é atingido com menor número de experimentos, quando a zona dispersa apresenta um sinal tendendo a uma curva gaussiana. Nos casos em que os sinais são estreitos, caracterizando os processos de baixa dispersão (caso C), observou-se que o processo de otimização exige variações dos parâmetros cada

TABELA - 3 Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em linha única com reação de nitrito.

No.do Simplex	A) VAZAO 2 ml/min		B) VAZAO 3 ml/min		C) VAZAO 4 ml/min	
	Alca de Amost.L (cm)	Bobina B Resposta (cm)	Alca de amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)	Alca de amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)
1	10,0	50,0	10,0	50,0	10,0	50,0
2	15,0	50,0	15,0	50,0	20,0	50,0
3	10,0	55,0	10,0	55,0	10,0	60,0
4	15,0	55,0	15,0	55,0	20,0	60,0
5	20,0	50,0	17,5	57,5	25,0	65,0
6	25,0	47,5	22,5	52,5	35,0	55,0
7	25,0	42,5	28,7	51,2	40,0	70,0
8	35,0	40,0	31,2	58,7	50,0	80,0
9	35,0	45,0	39,3	63,1	40,0	90,0
10	40,0	46,2	50,6	56,8	42,5	107,5
11	25,0	52,5	42,3	57,0	67,5	122,5
12	27,5	49,3	25,7	57,3	35,6	79,3
13	37,5	46,8	36,4	69,2	28,1	106,8
14	28,1	47,3	40,2	78,2	44,5	86,7
15	34,3	47,0	53,8	83,9	51,4	114,8
16	29,6	47,2	67,8	97,3	59,2	132,5
17	32,8	47,1	54,6	99,0	57,2	153,3
18	40,3	42,7	54,6	99,0	63,6	186,6
19	30,7	47,7			74,0	178,4
20					89,8	213,9
21					87,8	234,2
22					120,3	295,2
23					73,0	188,8
24					72,5	194,0
25					88,8	224,2
26					104,1	264,9
27					103,0	275,3

vez menores para atingir o ótimo.

Os tempos de residência calculados para os casos A, B e C, com os valores dos parâmetros no ponto do ótimo, foram de 12,0; 13,7 e 23,5 s respectivamente. A otimização no caso C atingiu uma altura de sinal 18,0 % maior que em A e 6,9% maior que em B. No entanto, apesar do ganho em sinal, conseguido na situação de ótimo para o caso C, o tempo de residência da amostra aumentou consideravelmente em relação aos outros dois casos. Este fato está de acordo com o reportado na literatura (Giné et alii (1980)), atribuído a cinética que caracteriza a formação do complexo colorido do nitrito.

As razões L/B nos três casos estudados A, B e C foram de 0,78; 0,64 e 0,4 respectivamente no ponto de ótimo. Isto significa que a dispersão devida aos parâmetros L e B, aumentou do caso A para o caso C. Entretanto, a altura de sinal obtida foi maior para o caso C, atribuída à compensação devida ao efeito da vazão na dispersão, a qual diminui de A para C.

A figura 9 mostra graficamente as variações dos valores de L e B para o caso C da tabela 3, onde foi utilizada uma vazão de 4 ml/min. Neste caso, ambos os parâmetros foram direcionados pela otimização, a valores crescentes, sendo que a partir do simplex de número 15, os valores de B tiveram incrementos maiores que os de L,

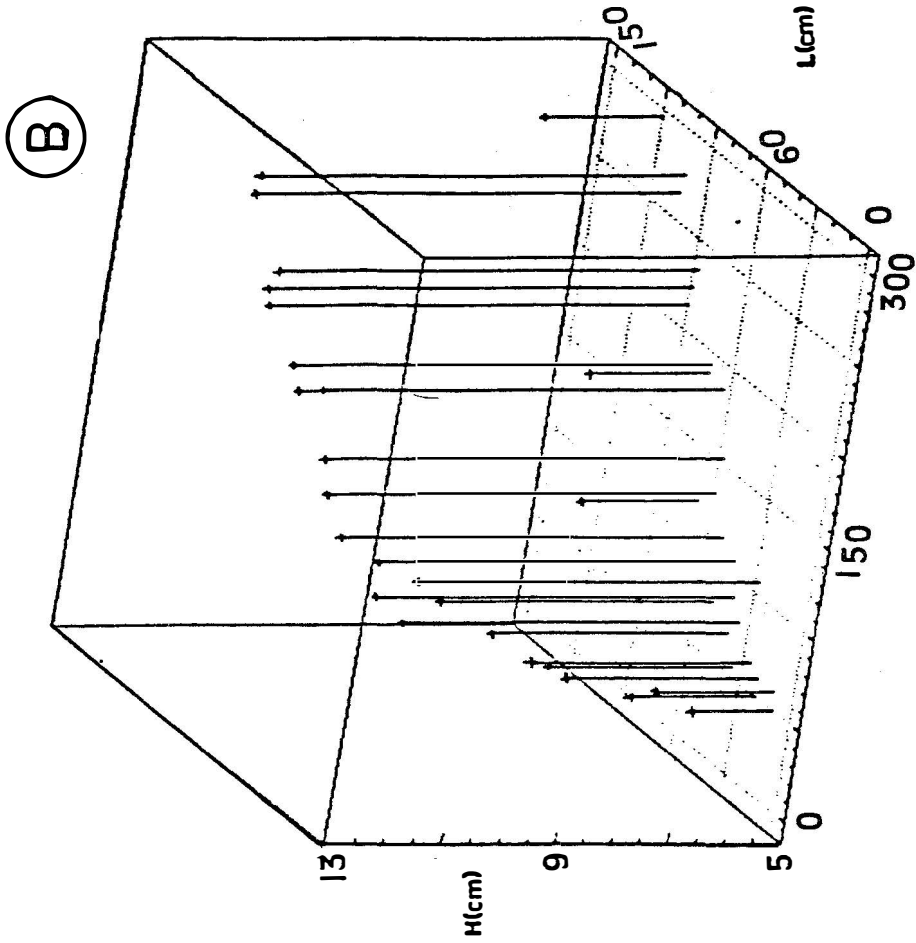
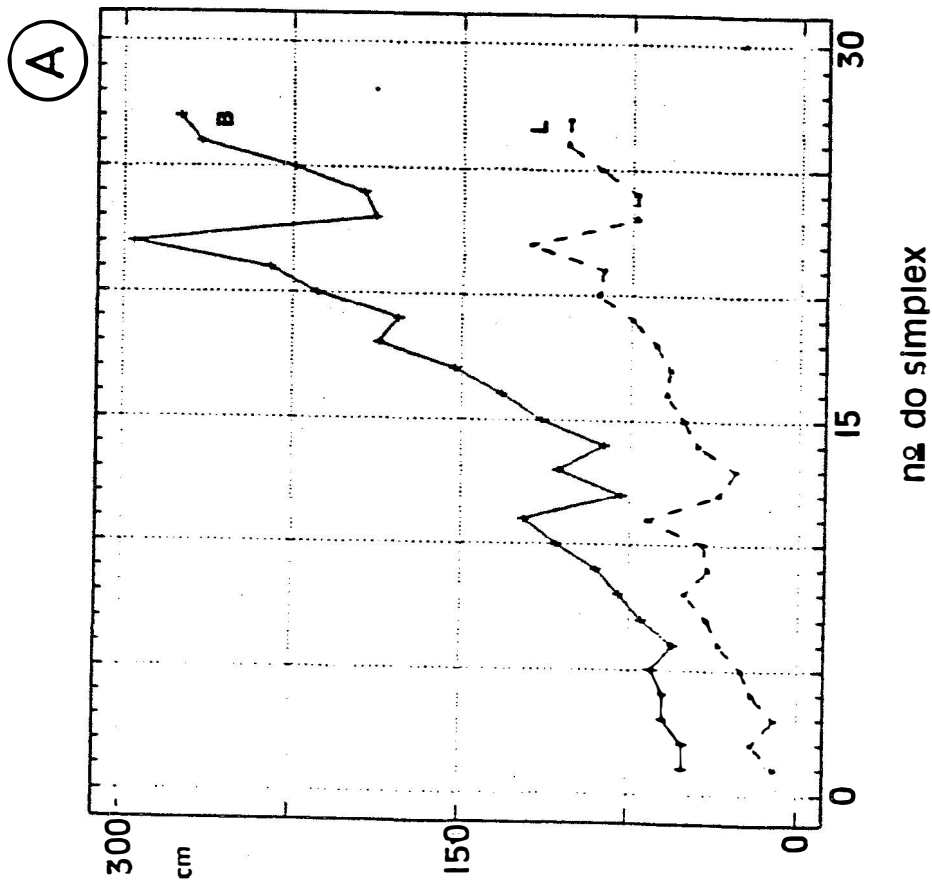


FIGURA 7 - Caminho do simplex na otimização realizada com a reação de nitrato no sistema FIA em linha única.

- A) Tendência de L e B (alça de amostragem e bobina de reação)
- B) Efeito de L e B na resposta expressa em altura de sinal H.

favorecendo situações de maior dispersão. Na figura 9-B, observa-se a variação de L, B e da altura de sinal (H) correspondente, podendo-se visualizar o caminho percorrido pelo simplex nesta situação. Nesta figura os simpleses de números 11, 22 e 23 mostram que para pequenas variações dos parâmetros, a resposta é fortemente afetada.

5.2.2. Reação espectrofotométrica para determinação de cloreto

Os resultados obtidos para a otimização do sistema FIA em linha única para a determinação espectrofotométrica de cloreto encontram-se na tabela 4.

As respostas que possuem um "f", indicam que as condições impostas aos limites para a resposta, foram extrapolados, e nestes casos utilizou-se uma resposta nula. Em várias situações foram fornecidas respostas nulas, pelo fato de ocorrerem sinais duplos (Ruzicka & Hansen (1988)). Este problema ocorre principalmente nos sistemas FIA em linha única, devido a falta de dispersão da solução da amostra incolor injetada sobre um reagente carregador colorido, como este utilizado para o cloreto. Como esta reação apresenta cinética

TABELA - 4 Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em linha única com reação de cloreto.

No.do Simplex	A) VAZAO 2 ml/min		B) VAZAO 3 ml/min		C) VAZAO 4 ml/min	
	Alca de Amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)	Alca de Amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)	Alca de Amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)
1	10,0	80,0	10,0	80,0	10,0	80,0
2	40,0	80,0	40,0	80,0	40,0	80,0
3	10,0	110,0	10,0	110,0	10,0	110,0
4	40,0	50,0	40,0	50,0	40,0	50,0
5	17,5	95,0	17,5	95,0	17,5	95,0
6	47,5	95,0	32,5	65,0	47,5	95,0
7	70,0	80,0	62,5	65,0	66,2	102,5
8	30,6	91,2	23,1	76,2	88,7	87,5
9	56,8	83,7	49,4	68,8	35,3	93,1
10	37,1	89,3	42,8	70,6	70,9	89,3
11	50,3	85,6	50,3	85,6	44,2	92,1
12	42,8	70,6	59,2	95,9	62,0	90,3
13	40,4	58,4	47,5	95,0	48,6	91,7
14	32,5	65,0	57,8	100,6	74,9	114,2
15	36,9	70,1	44,4	85,1	48,7	88,6
16	41,4	75,3	53,3	95,4	53,1	91,2
17	46,5	78,1	46,6	87,7	57,4	97,1
18	37,6	67,8	47,3	85,3	44,3	85,8

rápida, o efeito da dispersão deve ser o mínimo necessário para assegurar o encontro do reagente com os íons Cl da solução injetada. Na tabela 4, pode-se observar que a vazão da solução carregadora não refletiu no valor da resposta no ponto de ótimo (simplexes de números 12, 11 e 7). Apenas houve diferença no tempo de residência, os quais foram aproximadamente de 17,0; 13,6 e 12,6 para os casos A, B e C respectivamente. Adotando o critério de escolher o ótimo, considerando-se a situação de maior frequência analítica, o caso C seria escolhido.

A razão L/B permaneceu relativamente constante de aproximadamente 0,6 nos três casos estudados.

Comparando-se os resultados da otimização realizadas para as reações de nitrito e cloreto com aquelas realizadas com a solução colorida (item 5.1), verifica-se que quando ocorre reação química, há uma forte influência da cinética da reação sobre a otimização dos parâmetros.

5.3. Otimização pelo método simplex em sistemas FIA em confluência

5.3.1. Reação espectrofotométrica para determinação de nitrito

Os resultados do processo de otimização pelo Método Simplex em sistemas FIA em confluência, nas três situações descritas no item 4.1.3., quando ocorre reação espectrofotométrica de nitrito, podem ser vistos na tabela 5.

No caso 1, ocorre um alto grau de dispersão devido a baixa vazão da solução carregadora (1 ml/min) e uma grande diluição a partir do ponto de confluência. Neste caso, houve reagente em excesso (4 ml/min), não contribuindo em nada para a melhoria do sinal. O ponto de ótimo foi dado pelo simplex de número 11.

Já o caso 2 forneceu a melhor situação no simplex de número 14, quando tanto a dispersão, como a diluição foram baixas, e não ocorreu falta de reagente. A resposta no ponto de ótimo foi 87,8% maior que no caso 1, e o tempo de residência é de aproximadamente 28 s.

No caso 3, a dispersão e a diluição apresentam uma situação intermediária e a resposta no ponto de ótimo (simplex de número 12) é 22,7% menor que no

TABELA - 5 Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em confluência com reação de nitrito..

No.do Simplex	CASO 1 (C1=1;C2=4)		CASO 2 (C1=4;C2=1)		CASO 3 (C1=2,5;C2=2,5)	
	Alca de Amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)	Alca de Amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)	Alca de Amost. (cm)	L Bobina B Resposta (cm)
1	10,0	100,0	10,0	100,0	50,0	100,0
2	30,0	100,0	10,0	120,0	70,0	100,0
3	10,0	120,0	30,0	100,0	50,0	120,0
4	30,0	80,0	30,0	120,0	70,0	120,0
5	50,0	80,0	40,0	130,0	90,0	100,0
6	70,0	70,0	60,0	110,0	110,0	90,0
7	70,0	90,0	85,0	105,0	90,0	80,0
8	90,0	95,0	95,0	135,0	110,0	80,0
9	130,0	65,0	127,5	152,5	110,0	100,0
10	55,0	91,2	172,5	127,5	120,0	110,0
11	75,0	116,2	73,1	129,3	90,0	120,0
12	77,5	139,3	115,6	176,8	110,0	120,0
13	112,5	143,1	130,9	212,8	120,0	130,0
14	69,3	104,2	185,3	235,9	130,0	100,0
15	98,1	130,1	241,4	289,2	110,0	100,0
16			188,7	296,2		
17			197,1	211,5		
18				15,3		
19						

caso 2, entretanto o tempo de residência diminuiu para 20,4 s.

Se considerarmos a otimização da altura do sinal, a situação de ótimo ocorreu no caso 2.

O sistema em confluência utilizado no caso 3 pode ser comparado com a situação de ótimo (caso C), obtido com o sistema FIA em linha única no item 5.2. O tempo de residência em ambos os casos é de aproximadamente 20 s e a altura de sinal de 12 cm. Contudo, o consumo do reagente no sistema em linha única é 60% maior que no caso em confluência.

5.3.2. Reação espectrofotométrica para determinação de cloreto

Para as situações onde se utilizou a reação de cloreto, os resultados são dados na tabela 6, e representados graficamente na figura 10. Esta figura mostra os valores do comprimento da alça L que define o volume injetado e da bobina de reação B, para os quais foram realizados os experimentos pedidos pelo Método Simplex.

TABELA - 6 Valores obtidos através da aplicação do Método Simplex em sistemas em confluência com reação de cloreto.

No.do Simplex	CASO 1 (C1=1;C2=4)		CASO 2 (C1=4;C2=1)		CASO 3 (C1=2,5;C2=2,5)	
	Alca de Amost. (cm)	L. Bobina B Resposta (cm)	Alca de Amost. (cm)	L. Bobina B Resposta (cm)	Alca de Amost. (cm)	L. Bobina B Resposta (cm)
1	30,0	100,0	30,0	200,0	30,0	200,0
2	10,0	120,0	50,0	200,0	50,0	200,0
3	10,0	100,0	30,0	220,0	30,0	220,0
4	30,0	80,0	50,0	180,0	50,0	180,0
5	40,0	60,0	70,0	180,0	60,0	160,0
6	60,0	60,0	90,0	170,0	80,0	160,0
7	47,5	70,0	90,0	190,0	105,0	140,0
8	57,5	30,0	130,0	160,0	115,0	100,0
9	36,8	82,5	170,0	140,0	160,0	80,0
10	44,3	92,5	170,0	120,0	85,0	140,0
11	55,0	80,0	210,0	85,0	95,0	100,0
12	41,4	81,8	290,0	55,0	90,0	80,0
13	44,5	59,3	140,0	141,2	120,0	40,0
14			240,0	83,7	137,5	-10,0
15			165,0	126,8	95,0	20,0
16			205,0	71,8	110,0	80,0
17			178,7	122,9	140,0	40,0
18			223,7	81,0	0,0	0,0
19			179,6	115,4	0,0	0,0
20			209,0	92,5	110,0	80,0
21			179,6	115,4	140,0	40,0
22			201,7	98,2	102,5	70,0
23			193,9	107,7		
24			209,5	88,7		
25			194,3	103,9		

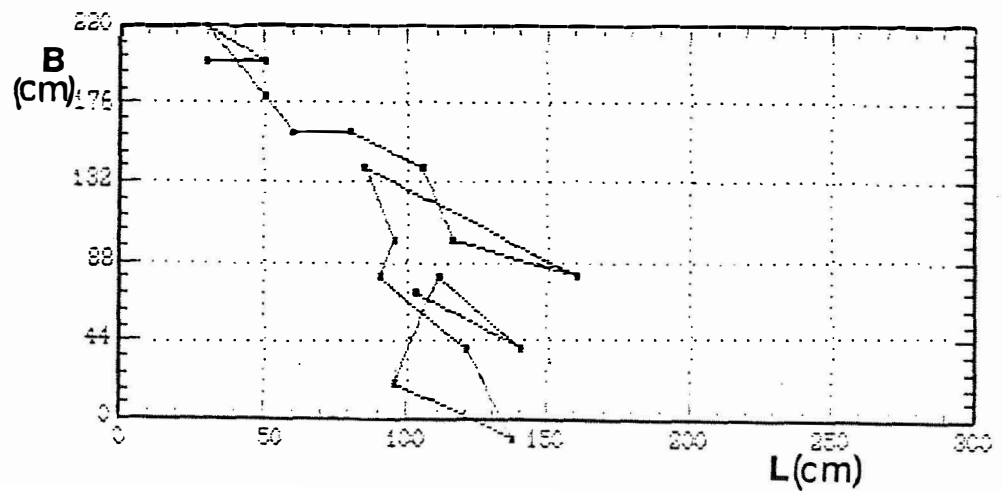
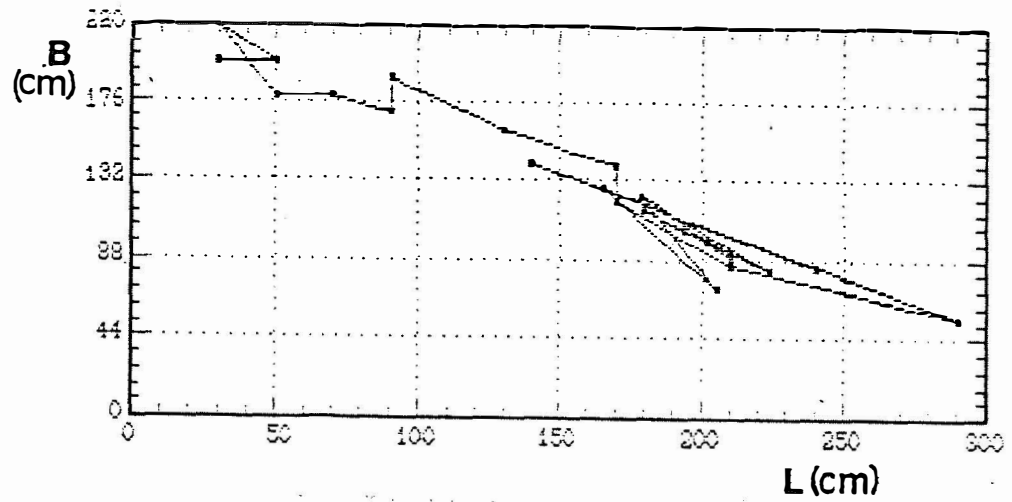
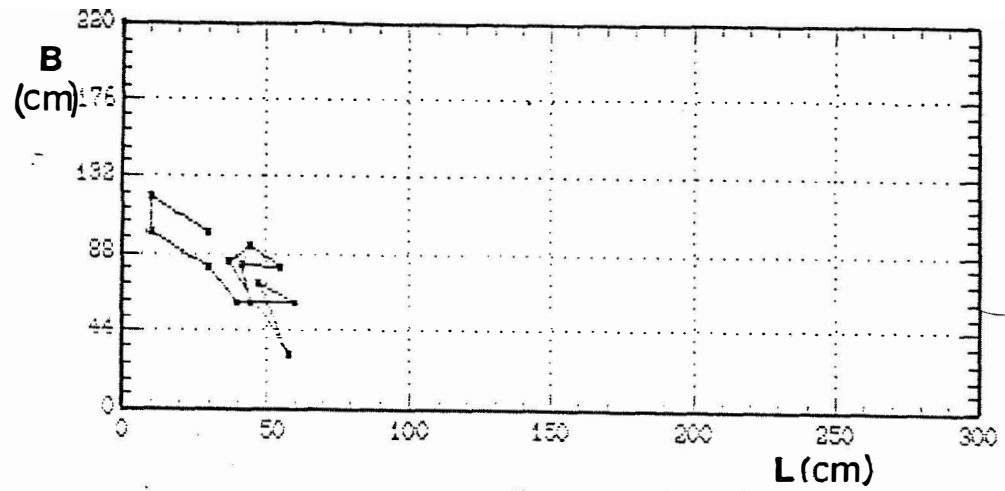


FIGURA 10 - Caminho do simplex na otimização realizada com a reação de cloreto no sistema FIA em confluência.
L e B correspondem aos comprimentos da alça de amostragem e bobina de reação respectivamente. De cima para baixo tem-se os casos 1, 2 e 3 respectivamente.

No caso 1, a baixa vazão no carregador (1 ml/min), provoca um alto grau de dispersão da amostra, a qual encontra o reagente em excesso no ponto de confluência. Neste caso o ponto de ótimo foi dado pelo simplex de número 7. No caso 2, a dispersão da amostra é baixa, e no ponto de confluência, pode ter ocorrido falta de reagente. Neste caso o sinal não aumentou, devido provavelmente a este fato. O ponto de ótimo neste caso foi dado pelo simplex de número 17. O caso 3, caracterizado pela simetria dos fluxos na confluência, forneceu a melhor situação. A altura do sinal no ponto ótimo (simplex número 16) foi 20% maior que no caso 2, sendo que o tempo de residência foi somente de 18,0 s.

Durante a otimização do caso 1, houve dificuldade para estabilizar a linha de base, provavelmente devido a problemas de mistura do reagente colorido com a solução da amostra.

5.4. Pontos de máximo das curvas experimentais

A figura 11 mostra as três curvas obtidas experimentalmente pelo sistema em linha única esquematizado na figura 1, para as diferentes bobinas de

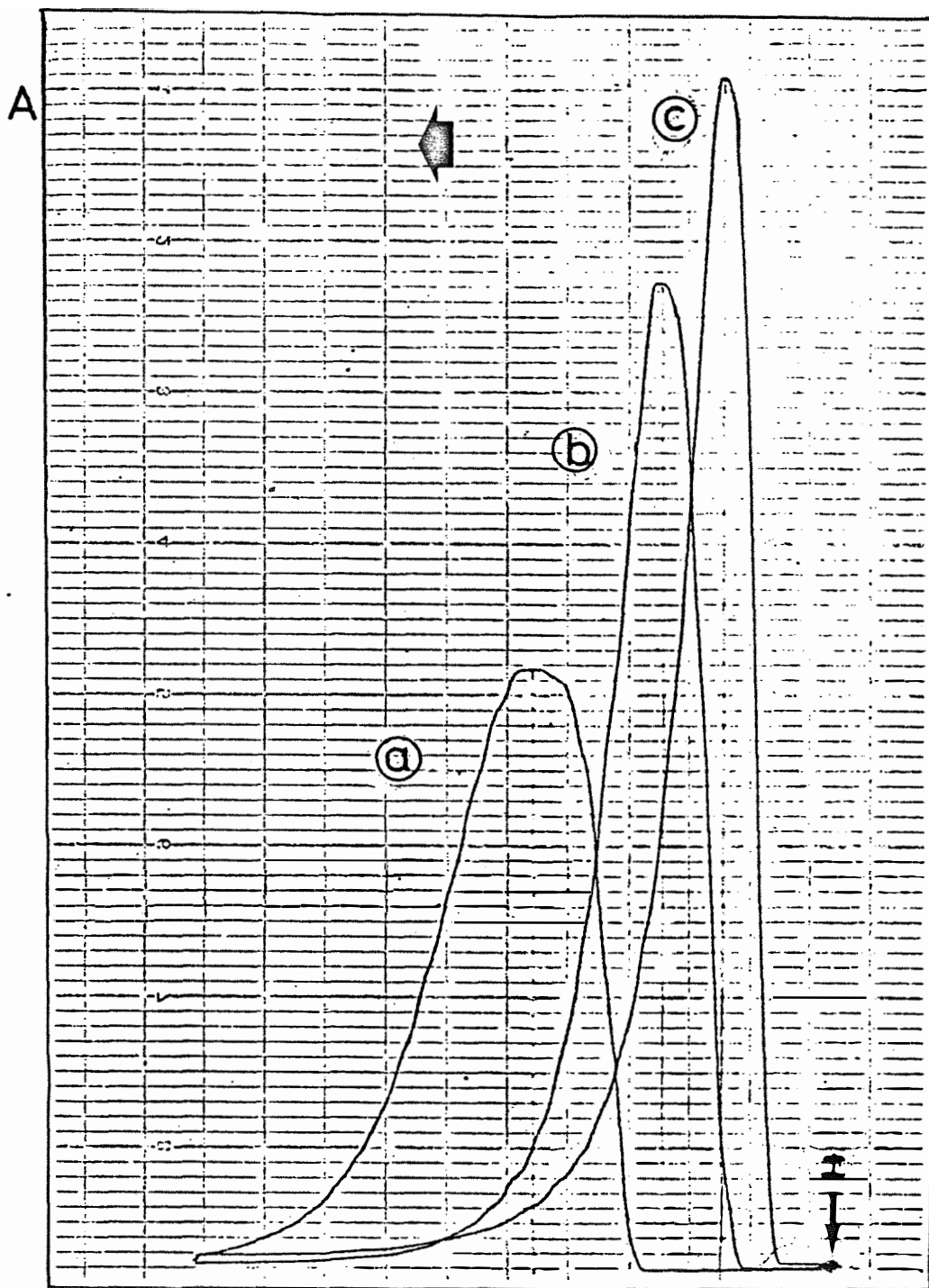


FIGURA 11 - Efeito do comprimento da bobina de reação no deslocamento temporal do maximo de sinal.
a) $B = 200$ cm; b) $B = 100$ cm; c) $B = 50$ cm.
Velocidade do registrador = 15 cm/min; Vazão = 4.5 ml/min; $L = 20$ cm.

reação consideradas, conforme o procedimento descrito em 4.2.2.

Constatou-se que para uma bobina de reação B, de 50 cm, o ponto de máximo da curva, ocorria depois de 7 s da injeção do volume contido na alga L. Para as bobinas de 100 e 200 cm os máximos ocorriam nos tempos 10 e 19 s respectivamente. Os intervalos de tempo de 7 s e de 10 s após a injeção, foram considerados, como sendo os correspondentes à mínima dispersão para serem utilizados no processo de reamostragem na zona dispersa, através dos valores dos fatores utilizados nas combinações do planejamento fatorial (tabela 1).

As curvas experimentais, relativas à essas combinações foram obtidas iniciando-as nesses pontos.

5.5 Resultados da análise fatorial

Através das oito combinações da análise fatorial, obtiveram-se oito conjunto de dados em triplicata e ajustou-se uma curva a cada conjunto de resultados obtidos.

O modelo ajustado é o polinômio de grau 4,

e sua equação é dada por:

$$C(t) = A(0) + A(1) \cdot t + A(2) \cdot t^2 + A(3) \cdot t^3 + A(4) \cdot t^4 \quad (15)$$

onde:

$C(t)$ é a porcentagem da concentração inicial (C_0),

t é o intervalo de tempo de inserção,

$A(i)$, ($i=0, \dots, 4$) são os coeficientes a serem determinados pelo método dos mínimos quadrados.

Os resultados dos coeficientes $A(i)$, os coeficientes de determinação e os erros padrão estimados nos ajustes realizados são dados no Apêndice 1.

O quadro dos desvios obtidos pelo ajuste em cada conjunto de dados experimentais às curvas polinomiais é dado na tabela 7.

TABELA - 7 Quadro dos desvios dos pontos experimentais às curvas polinomiais ajustadas através do planejamento fatorial. Unidade: % C_0 .

Comb	L1	L2	B1	Rep1	Rep2	Rep3	!	Total
7	-	-	-	0,1994388	0,2756122	0,1537396	!	0,6287906
4	+	-	-	0,4858597	0,5043754	0,5675555	!	1,5577906
2	-	+	-	0,1109579	0,1025557	0,1145823	!	0,3280959
5	+	+	-	0,4206838	0,4493678	0,3939787	!	1,2640303
8	-	-	+	0,3112368	0,1984688	0,2977056	!	0,8074112
1	+	-	+	0,6521450	0,6134950	0,5568490	!	1,8224890
3	-	+	+	0,2759755	0,3600798	0,2110265	!	0,8470818
6	+	+	+	0,6591269	0,6402575	0,6482156	!	1,9476000
Total				3,1154244	3,1442122	2,9436528	!	9,2032894

As colunas L1, L2 e B1 da tabela 7, apresentam os níveis (+) ou (-) dos fatores conforme descrito na tabela 1 do item 4.2.1. As linhas dos resultados obtidos com cada combinação correspondem aos oito tratamentos T_i 's ($i=1...8$) considerados.

Apenas observando a tabela 7, pode-se observar que a combinação 2 apresentou os menores desvios e a melhor reprodutibilidade entre os 3 ajustes efetuados.

Através desses resultados, obteve-se a análise de variância e os efeitos dos fatores considerados.

5.5.1. Análise da variância do planejamento fatorial

A partir dos resultados da tabela 7, foi efetuada a análise de variância para o planejamento fatorial com o intuito de estudar os efeitos dos fatores utilizados.

Considerando-se oito tratamentos correspondendo as oito combinações da tabela 1 com três repetições para cada tratamento, a análise de variância foi realizada como sendo inteiramente casualizada, segundo ~~Box~~ (1976). Posteriormente foi aplicado o teste F.

Sendo X_i 's os elementos da tabela 7, começamos calculando N , que é o número de X_i 's obtidos e G que é a soma dos X_i 's dados por:

$$N = 24 \quad (8 \text{ tratamentos} \times 3 \text{ repetições})$$

$$G = \sum X = 0,1994388 + \dots + 0,6482156 = 9,2032894$$

A correção C , é dada por:

$$C = G^2 / N = (9,2032894)^2 / 24 = 3,5291889$$

Assim, podemos calcular as Somas dos Quadrados de Totais e de Tratamentos, dados por:

$$\begin{aligned} \text{SQTOTAL} &= \left(\sum X^2 - C \right) = 4,3735804 - 3,5291889 \\ &= 0,8443913 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{SQTRATAMENTO} &= (T_1^2 + \dots + T_8^2) / 3 - C \\ &= (3,3214661^2 + \dots + 0,6519128^2) / 3 \\ &\quad - 3,5291889 \\ &= 0,8080044 \end{aligned}$$

Com esses resultados, pode-se montar o quadro da análise de variância correspondente as causas de variação (C.V), com os correspondentes graus de liberdade (G.L.) e Quadrados Médios para tratamentos, resíduos, totais, e finalmente calcular o valor de F.

C.V.	G.L.	S.Q.	QM.	F
TRATAMENTO	7	0.8080044	0.1154292	50,76 **
RESIDUO	16	0.0363869	0.0022741	
TOTAL	23	0,8443913		

Pela tabela encontrada em ~~Foxes~~ (1976) obtem-se o valor de $F'(7,16)$ como sendo de 4,03 ao nível de 1%. Logo, através do teste F, houve diferença significativa entre os tratamentos realizados, ao nível de 1% de probabilidade.

Portanto a análise prossegue com o intuito de procurar os fatores significativos:

	!	L1-	L1+	!	
L2-	!	1,4362018 (6)	3,3802796 (6)	!	4,8164814
L2+	!	1,1751777 (6)	3,2116303 (6)	!	4,3868080
	!	2,6113795	6,5919099	!	9,2032894

	L1-	L1+	
B1-	0,9568865 (6)	2,8218209 (6)	3,7787074
B1+	1,6544930 (6)	3,7700890 (6)	5,4245820
	2,6113795	6,5919099	9,2032894

	L2-	L2+	
B1-	2,1865812 (6)	1,5921262 (6)	3,7787074
B1+	2,6299002 (6)	2,7946818 (6)	5,4245820
	4,8164814	4,3868080	9,2032894

Os cálculos para a Soma dos Quadrados dos efeitos são dados por:

a) Efeitos Principais:

$$SQL1 = \left((2,6113795)^2 + (6,5919099)^2 \right) / 12 - C$$

$$= 0,5436453$$

Analogamente,

$$SQL2 = 0,0076925 \text{ e } SQB1 = 0,1128709$$

b) Efeitos de interações bifatoriais:

$$SQL1L2 = \frac{(1,4362018+3,2116303)^2 + (1,1751777+3,3802796)^2}{12} - C$$

$$= 0,0003556$$

Analogamente,

$SQL1B1 = 0.002618$ e $SQL2B1 = 0.0240183$

O quadro da análise de variância, agora é dado por:

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
L1	1	0,6601926	0,6601926	290,31 **
L2	1	0,0076925	0,0076925	3,38
B1	1	0,1128709	0,1128709	49,63 **
L1L2	1	0,0003556	0,0003556	0,16
L1B1	1	0,0026180	0,0026180	1,15
L2B1	1	0,0240183	0,0240183	10,56 **
L1L2B1	1	0,0002565	0,0002565	0,11
RESIDUO	16	0,0363869	0,0022741	
TOTAL	23	0,8443913	0,8102785	

Podemos verificar portanto que apenas os parâmetros L1 e B1, além da interação L2xB1, influenciaram significativamente ao nível de 1% de probabilidade. Na tabela (Gomes (1976)) encontramos $F'(1,16) = 8,53$. Isso mostra que L1 e B1 são os principais responsáveis nos desvios ocasionados pelo ajuste do modelo aos pontos obtidos experimentalmente. O efeito de L2 não foi significativo.

Os efeitos foram estimados utilizando o método descrito por Box et alii (1978) a partir do quadro

dos sinais dado pela tabela 8 a seguir:

TABELA - 8 Quadro dos sinais para o cálculo dos efeitos dos fatores.

Comb	m	L1	L2	B1	L1xL2	L1xB1	L2xB1	L1xL2xB1	Media dos Desvios
7	+	-	-	-	+	+	+	-	0,2095968
4	+	+	-	-	-	-	+	+	0,5192635
2	+	-	+	-	-	+	-	+	0,1093653
5	+	+	+	-	+	-	-	-	0,4213434
8	+	-	-	+	+	-	-	+	0,2691370
1	+	+	-	+	-	+	-	-	0,6074963
3	+	-	+	+	-	-	+	-	0,2823606
6	+	+	+	+	+	+	+	+	0,6492000

a) Efeitos Principais:

$$L1 = \frac{(0,5192635 + \dots + 0,6492) - (0,2095968 + \dots + 0,2823606)}{4}$$

$$L1 = 0,3317109$$

Analogamente,

$$L2 = -0,035806 \text{ e } B1 = 0,1371562$$

b) Efeitos das interações bifatoriais:

$$L1 \times L2 = \frac{(0,2095968 + \dots + 0,6492000) - (0,5192635 + \dots + 0,2823606)}{4}$$

$$= -0,0076978$$

Analogamente,

$$L1 \times B1 = 0,0208884 \text{ e } L2 \times B1 = 0,0632697$$

c) Efeito da interação trifatorial:

$$L1 \times L2 \times B1 = \frac{(0,5192635 + \dots + 0,6492000) - (0,2095968 + \dots + 0,2823606)}{4} \\ = 0,0261687$$

O Desvio Padrão dos efeitos (S^2) é dado por:

$$S^2 = \frac{\sum D^2}{N}$$

A Soma dos Quadrados dos desvios é dada por:

$$\sum D^2 = \sum (X - \bar{m})^2 = 0,8443911$$

onde \bar{m} é a média aritmética dos X_i 's.

$$S^2 = \frac{\sum D^2}{N} = \frac{\sum (X - \bar{m})^2}{N} = \frac{0,8443911}{24} = 0,0351829$$

A variância de um efeito é dado por:

$$V(\text{efeito}) = V(\bar{y}(+) - \bar{y}(-)) = \\ = (1/12 + 1/12) * S^2 = 1/6 * S^2 = 0,0058638$$

$$\begin{aligned} \text{Logo, o erro padr}\tilde{\text{a}}\text{o estimado} &= (0,0058638)^{1/2} = \\ &= 0,0765754 \end{aligned}$$

Finalmente obtemos as estimativas dos efeitos dos fatores principais e suas interações, dado na tabela 10.

TABELA - 9 Quadro das estimativas dos efeitos dos fatores

EFEITO	ESTIMATIVA
Média	0,3834703 ± 0,04
L1	0,3317109 ± 0,08 *
L2	-0,0358060 ± 0,08
B1	0,1371562 ± 0,08 *
L1xL2	-0,0076978 ± 0,08
L1xB1	0,0208884 ± 0,08
L2xB1	0,0632697 ± 0,08 *
L1xL2xB1	0,0261687 ± 0,08

Podemos verificar pela tabela 10 que os fatores L1 e B1 e a interação L2xB1 foram significativos, como já verificado na análise de variância feita anteriormente.

Como as interações envolvendo o fator L1 (L1xL2; L1xB1 e L1xL2xB1) não foram significativas, pode-

se afirmar que o efeito desse fator, quando se passa do nível baixo (-) para o nível alto (+), foi de aumentar o desvio no ajuste da curva aos dados experimentais em $0,33 \pm 0,08$. O efeito do fator L2 não foi significativa, esse fator sozinho portanto, não influencia significativamente no desvio quando se ajusta uma curva aos pontos obtidos pelo processo de reamostragem na zona dispersa. No entanto a interação L2xB1 foi significativa. Isso quer dizer que esses dois fatores não podem ser estudados separadamente, isto é, a consequência do efeito total desses dois parâmetros só pode ser explicado como uma resultante desses dois efeitos. Enquanto o efeito de B1 é de aumentar o desvio em $0,13 \pm 0,08$, o efeito de L2 é de diminuir esse desvio em $0,03 \pm 0,08$. Contudo o efeito total ainda será um aumento de $0,06 \pm 0,08$ no desvio como resultante, valor este que não atinge nem a metade do efeito ocasionado pelo fator L1.

5.5.2. Curvas obtidas pela análise fatorial

Os coeficientes das curvas polinomiais de grau 4 ajustadas aos pontos das oito combinações da tabela 1, conforme o procedimento descrito em 4.2.2. e 4.2.3.,

são dados no Apêndice , e as curvas obtidas com a média das 3 repetições através das oito combinações da análise fatorial podem ser visualizadas graficamente na figura 12.

Nesta figura pode-se observar que os tempos iniciais correspondentes aos pontos de máximos das curvas, obtidas pelo processo de reamostragem na zona dispersa (figura 3), depende principalmente das bobinas de reação B1, como já havíamos observado na figura 11.

O efeito de aumentar o valor de L1 pode ser observado, comparando-se a combinação 2 com a 5, onde obteve-se a maior porcentagem de Co. O mesmo resultado foi observado para o parâmetro L2, comparando-se as combinações 4 e 5.

Ao comparar os gráficos referentes as combinações 1 e 4, onde L1 e L2 assumem valores correspondentes, evidencia-se o efeito do parâmetro B1 sobre o valor da porcentagem de Co. Comparativamente, o caso da combinação 1 (B1 (+)), apresenta uma faixa de concentração mais ampla, sendo que os desvios para esses casos (tabela 7), foram da mesma ordem de grandeza.

No caso da combinação 5 (L2 (+)), a maior porcentagem de Co foi conseguida. Isto significa que a medida que se aumenta o volume injetado da concentração inicial e se diminui o percurso analítico, e logo se amostra também volumes maiores, obtem-se as maiores taxas

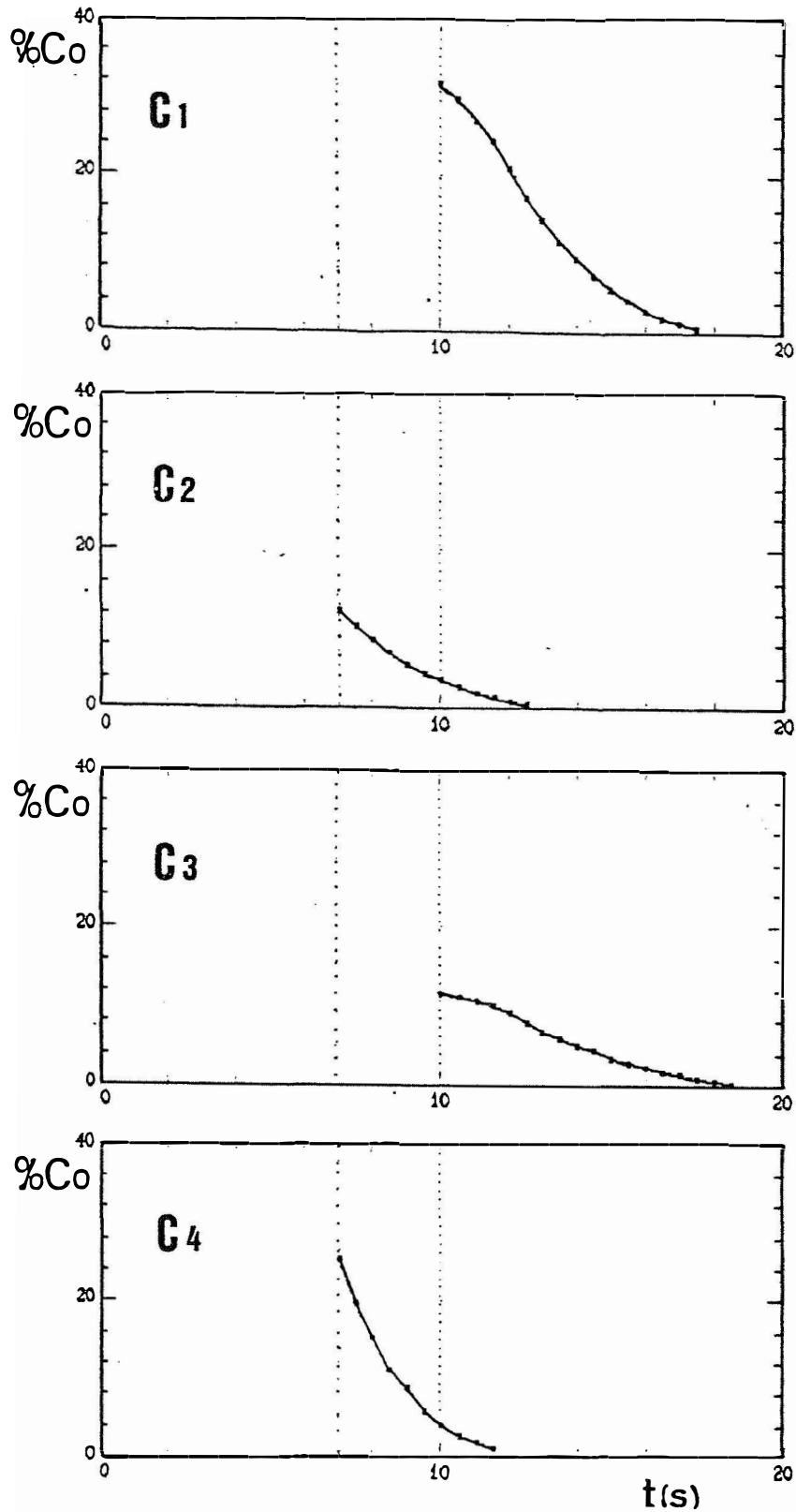


FIGURA 12 - Curvas obtidas através das oito combinações do planejamento fatorial;
 C_i corresponde a combinação i ($i=1...8$);
 $t(s)$ é o tempo de inserção em segundos;
 $\%C_o$ corresponde à porcentagem da concentração inicial (C_o).

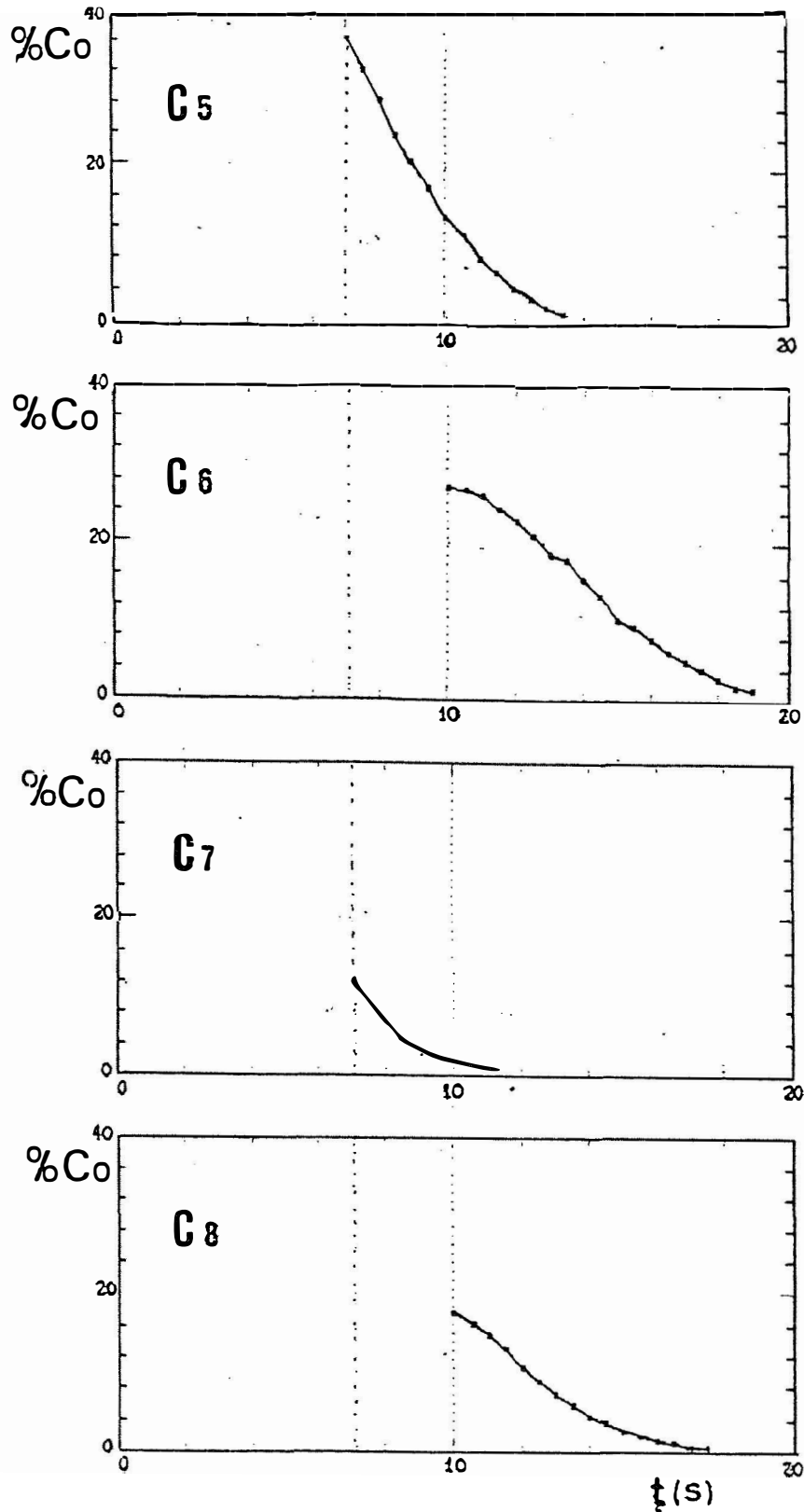


FIGURA 12 - Curvas obtidas através das oito combinações do planejamento fatorial - Continuação.
 C_i corresponde a combinação i ($i=1\dots 8$);
 $t(s)$ é o tempo de inserção em segundos;
 $\%C_0$ corresponde à porcentagem da concentração inicial (C_0).

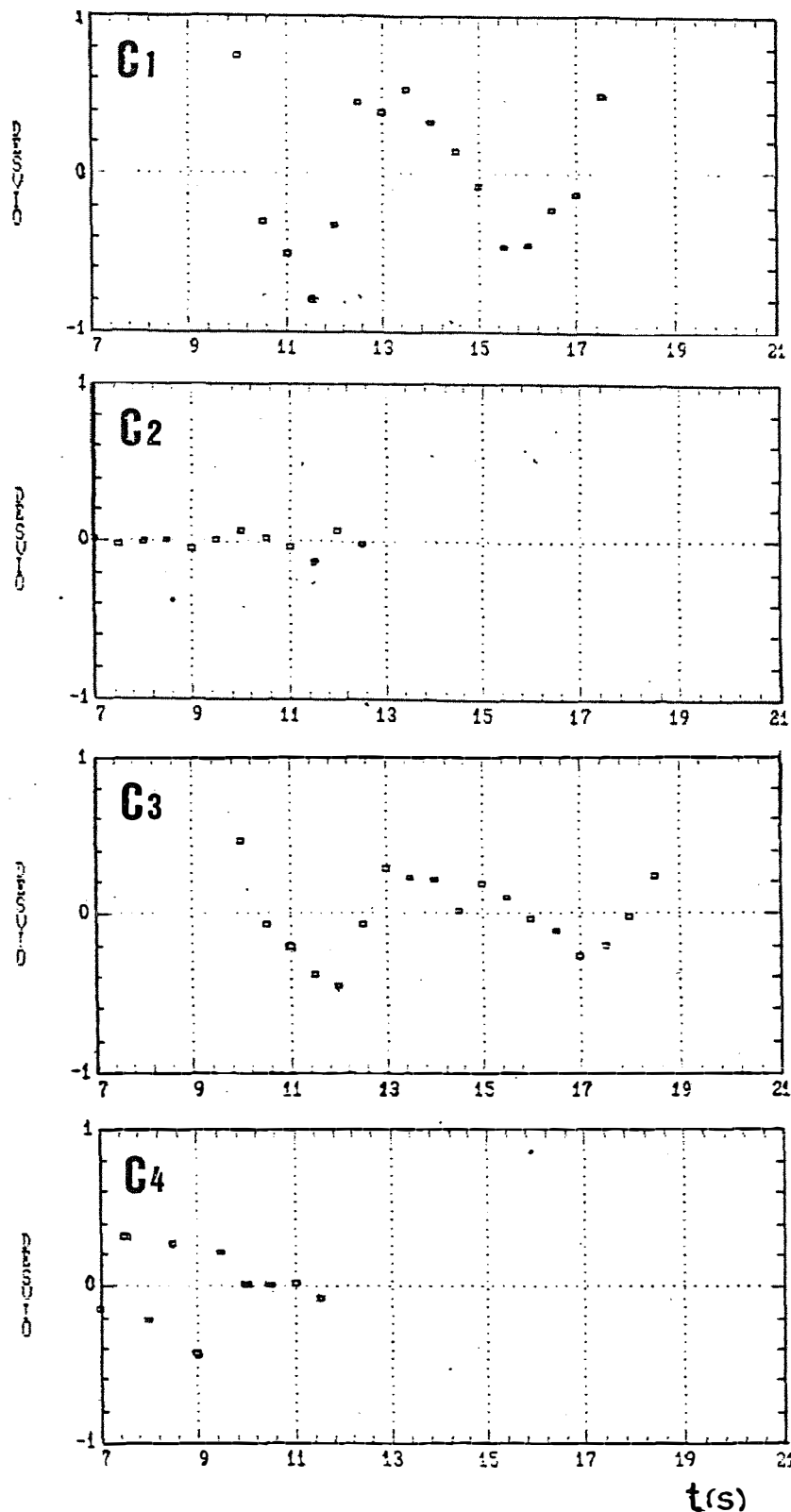


FIGURA 13 - Gráfico das distribuições dos desvios das curvas ajustadas em cada combinação do planejamento fatorial.
 C_i corresponde a combinação i ($i=1...8$);
 $t(s)$ é o tempo de inserção em segundos;
 O desvio corresponde à diferença entre os valores observados e os estimados através da curva ajustada.

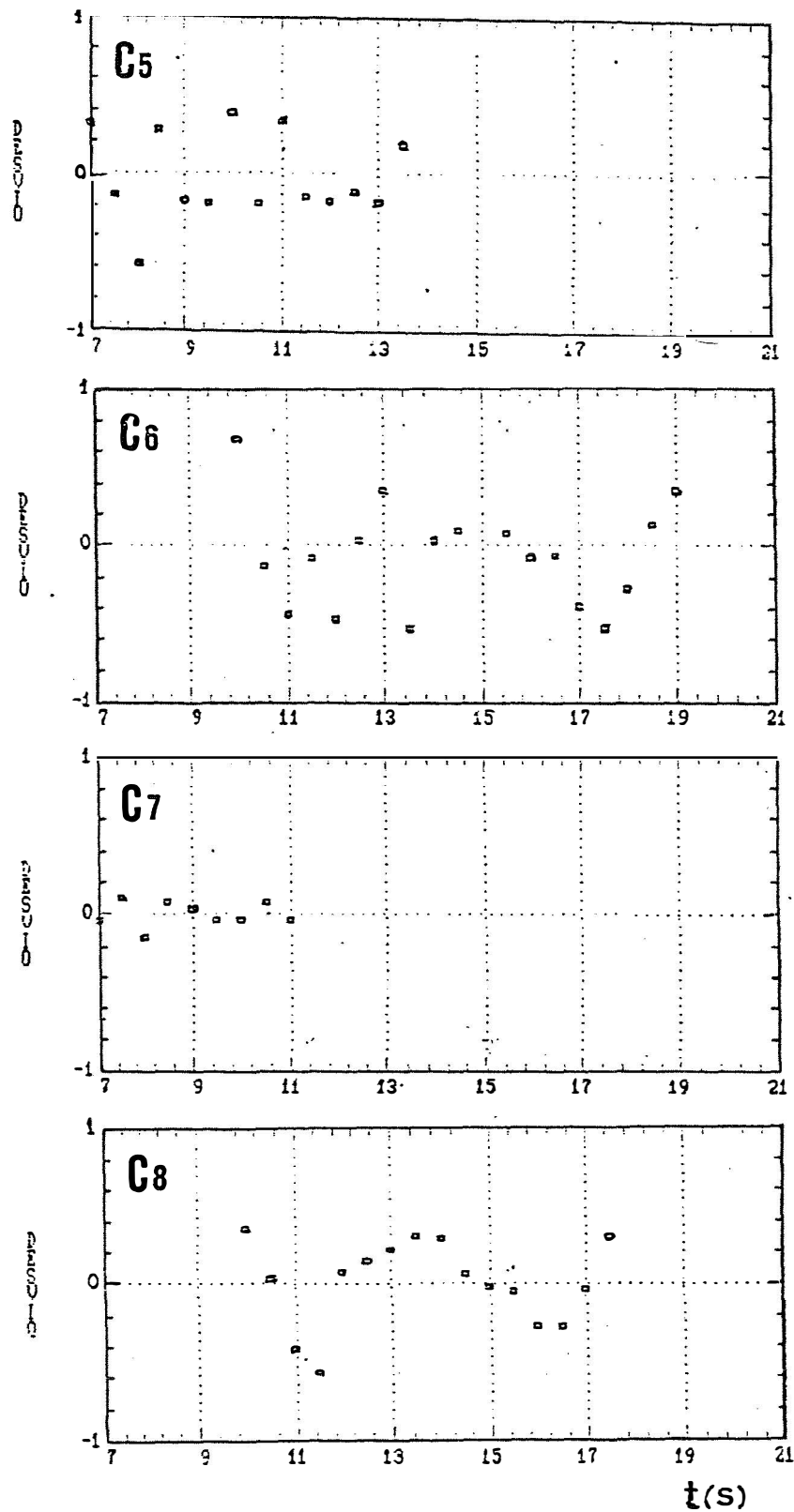


FIGURA 13 - Gráfico das distribuições dos desvios das curvas ajustadas em cada combinação do planejamento fatorial - Continuação.

C_i corresponde a combinação i ($i=1...8$);

$t(s)$ é o tempo de inserção em segundos;

O desvio corresponde à diferença entre os valores observados e os estimados através da curva ajustada.

de concentrações. Contudo, comparando-se os desvios (tabela 7) do caso 2 e 5, observa-se que a combinação que proporcionou melhores desvios, devido ao volume injetado ser menor, foi a 2. Obteve-se com essa combinação coeficiente de correlação de 0.9997. A figura 13 mostra a distribuição uniforme dos desvios dos pontos observados com os estimados através da curva ajustada aos dados desta combinação.

Comparando-se a distribuição dos desvios da combinação 2 com a da 3, 5 e 7 pode-se observar o efeito que ocasiona B1, L1 e L2 respectivamente, nos desvios dos ajustes realizados.

As condições utilizadas na combinação 2 do fatorial foram as escolhidas para simular as concentrações de uma solução, utilizando-se temporizador, juntamente com a curva ajustada. Desta forma, na aplicação do Método de otimização Simplex, a concentração pode ser um parâmetro de ajustes contínuos.

5.5.3. Superfície de 2o grau ajustada aos dados do planejamento fatorial

A figura 14 mostra a superfície dos desvios dada pela equação 7, segundo o procedimento descrito em 4.2.4., quando as equações polinomiais foram ajustadas aos pontos obtidos pelas combinações do fatorial (tabela 1). A equação do modelo ajustado foi dado por:

$$D = 0.326722 + 2,3E-13 * L2^2 - 9,0E-15 * B1 - 0,06016 * L2 + 0,001691 * B1 + 0,033743 * L2 * B1 \quad (16)$$

Nesta equação a unidade de L2 e de B1 devem ser em $\mu l \times 100$.

Pode-se notar pela figura 14, que os menores desvios de ajustes ocorrem, quando se usa valores pequenos de B1 (figura 3-B), que é o caso das combinações 2 e 7 (tabela 7), e que esses desvios tendem a aumentar com o aumento desses dois parâmetros. Podemos verificar também, que aumentando B1 do nível (-) para (+), o efeito no desvio será maior quando L2 for maior.

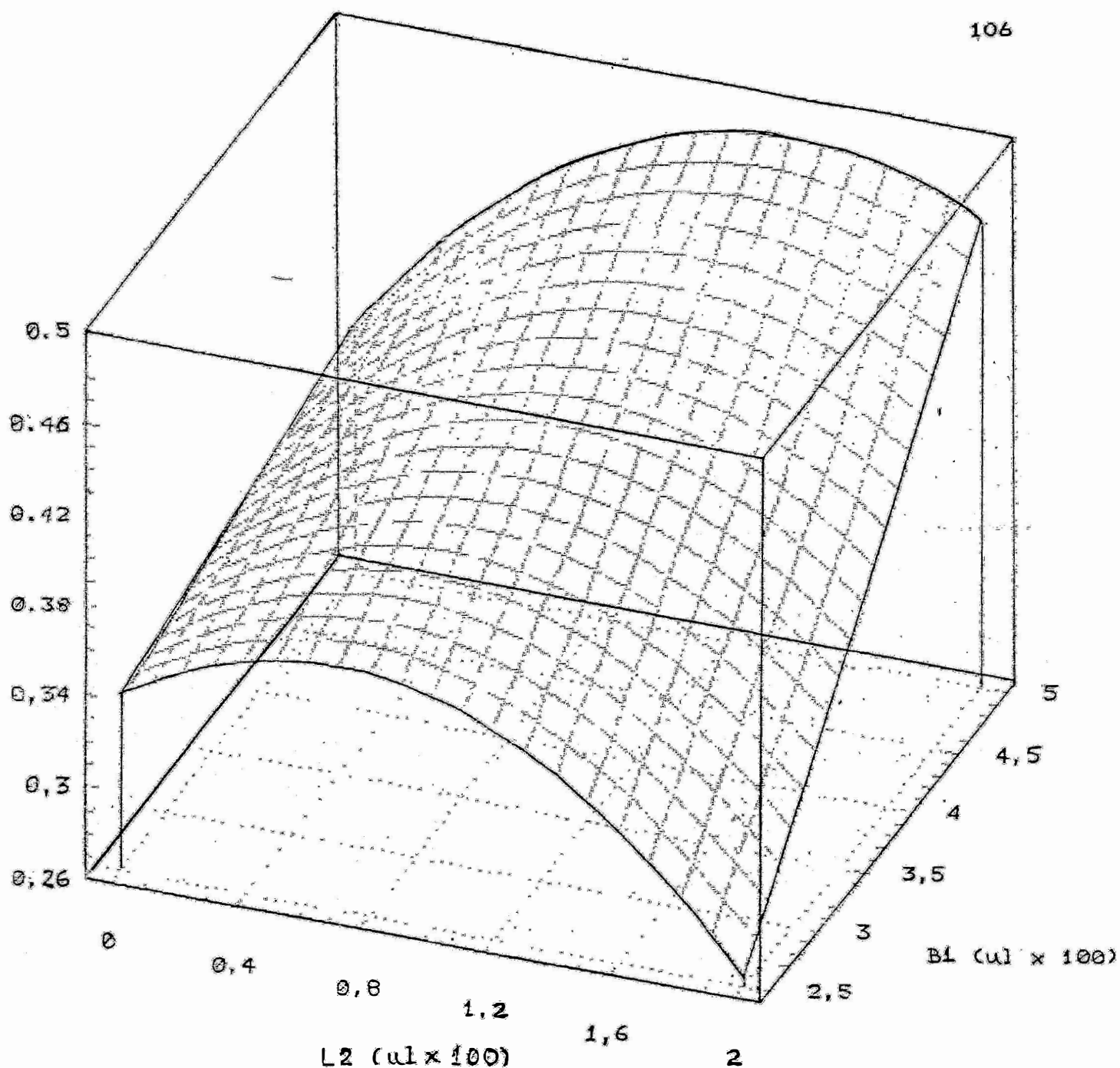


FIGURA 14 - Superfície ajustada aos dados obtidos pelo planejamento fatorial.
 L2-Alça que define o volume injetado em C2 (figura 3)
 B1-Bobina de reação
 D-Desvios no ajuste da curva aos dados experimentais.

5.3.4. Resultados dos testes de precisão

A tabela 10 mostra o resultado das absorvâncias correspondentes as concentrações obtidas através das soluções padrão, bem como os desvios em relação as obtidas pela curva ajustada, conforme o procedimento descrito no ítem 4.2.5. A figura 15 mostra da esquerda para a direita, os picos relativos aos padrões preparados manualmente nas concentrações de 20, 15, 10, 5 e 2 % da concentração inicial C_0 , seguidos da curva obtida pelo processo de reamostragem na zona dispersa (figura 3).

TABELA - 10 Comparação da porcentagem de C_0 para procedimento manual e através da curva

$\%C_0$	Absorbância	desvio
20	0,550	0,026
15	0,370	0,023
10	0,220	0,030
5	0,100	0,040
2	0,030	0,029

Para efetuar estes testes uma equação polinomial de absorvância, que corresponde a porcentagem de C_0 , em função das alturas de sinal obtidas através do processo de reamostragem na zona dispersa, que corresponde um tempo t ; foi ajustada e aplicada aos valores obtidos

pelo método manual e pela curva. A equação foi dada por:

$$A = 9,21749E-3 * H_0 + 4,48969E-2 * H_1 - 2,98271E-3 * H_2 + 1,84723E-4 * H_3 - 3,82968E-6 * H_4 \quad (17)$$

onde os H_i 's são alturas de sinais.

A figura 16 mostra as duas curvas de calibração obtidas para o procedimento manual e através das concentrações obtidas pela curva ajustada.

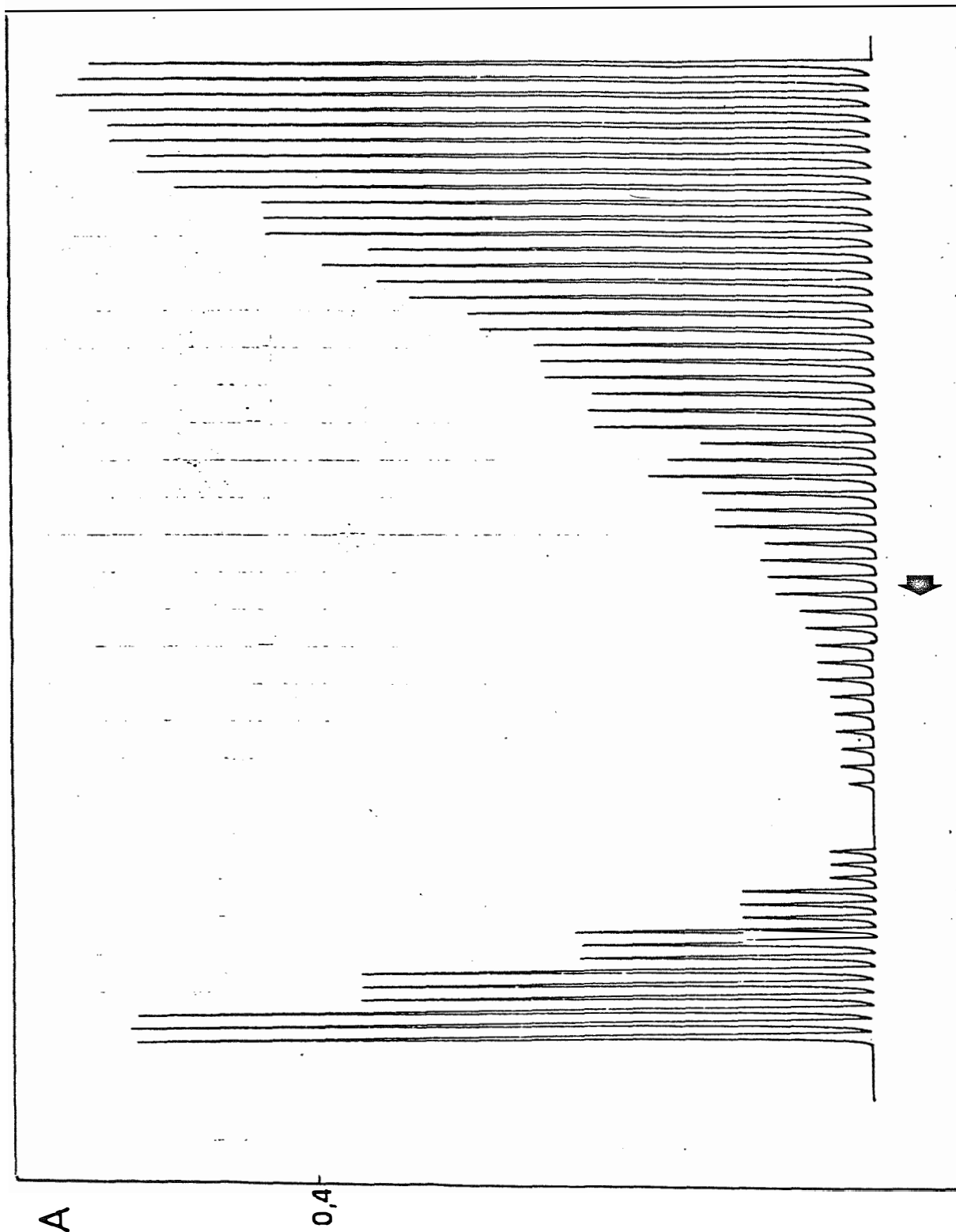


FIGURA 15 - Gráfico de precisão na obtenção de concentrações aleatórias. Da direita para a esquerda tem-se em triplicata, os picos obtidos pelo processo de amostragem na zona dispersa. seguido pelos picos obtidos com os padrões preparados manualmente, correspondentes a 2, 5, 10, 15 e 20 %Co; A- Absorbância medida no espectrofotômetro.

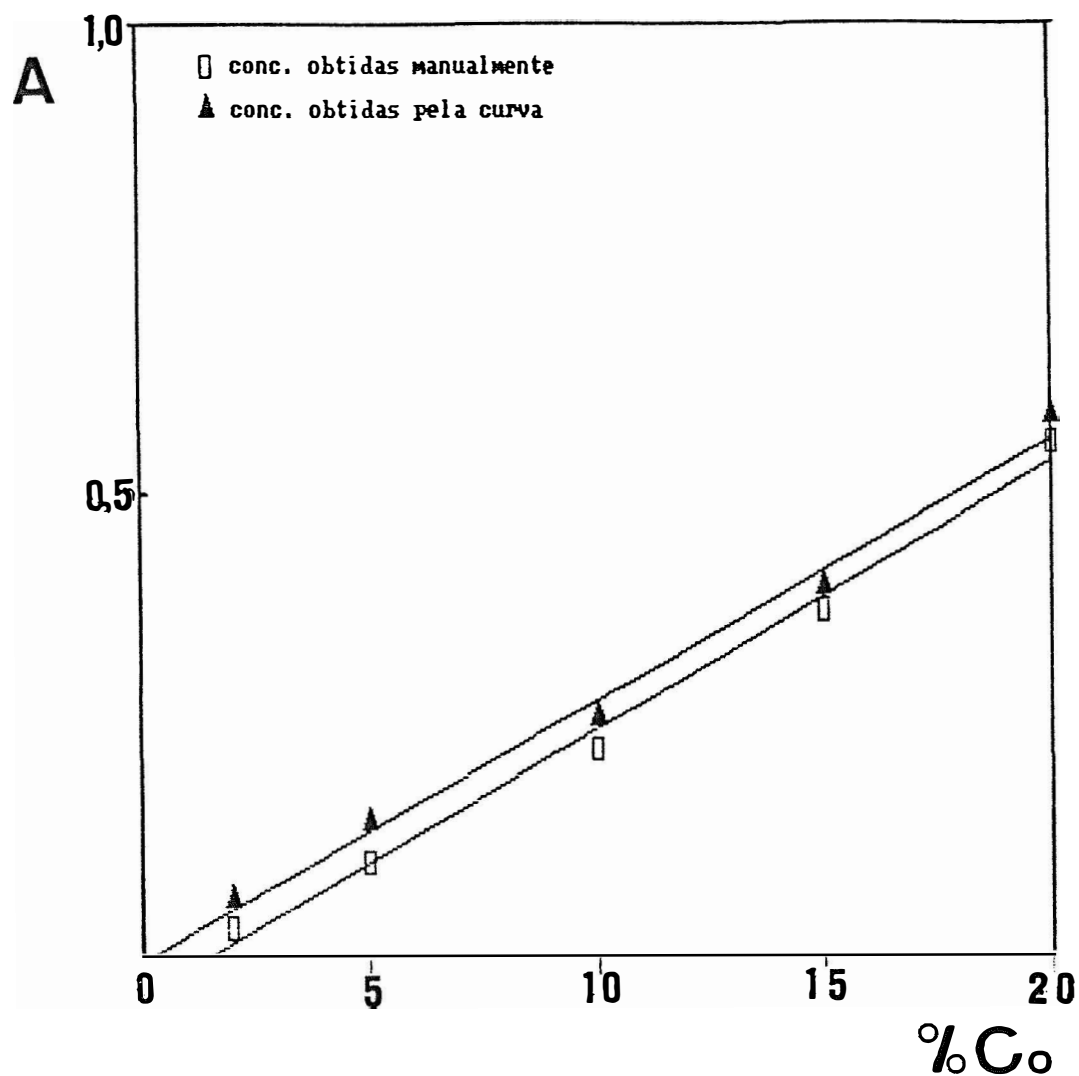


FIGURA 16 - Curvas de concentração para procedimento manual de diluição e através da curva.
A- Absorbância;
% Co- porcentagem da concentração inicial Co.

5.6. Resultados da otimização do sistema FIA para determinação espectrofotométrica de fosfato em amostras de plantas

A otimização do sistema FIA para a determinação de fosfato em plantas, foi realizada visando estudar os efeitos da concentração do redutor, concentração do reagente e o tempo de reação, conforme o procedimento descrito em 4.3.2 e 4.3.3.

5.6.1. Resultados da otimização realizada variando-se a concentração do ácido ascórbico

A aplicação do Método Simplex realizado com a função resposta dada pela eq. 10, conforme o procedimento descrito no item 4.3.2., teve como resultado um comprimento de bobina B2 de 70 cm e um tempo de inserção de 10 s. Pela equação $F(t)=C$ para esse sistema obtemos $C = 4,43\%$ de C_0 . Como a concentração inicial do ácido ascórbico foi de 6% m/v, obtem-se que a concentração otimizada do redutor é de 0.26% m/v.

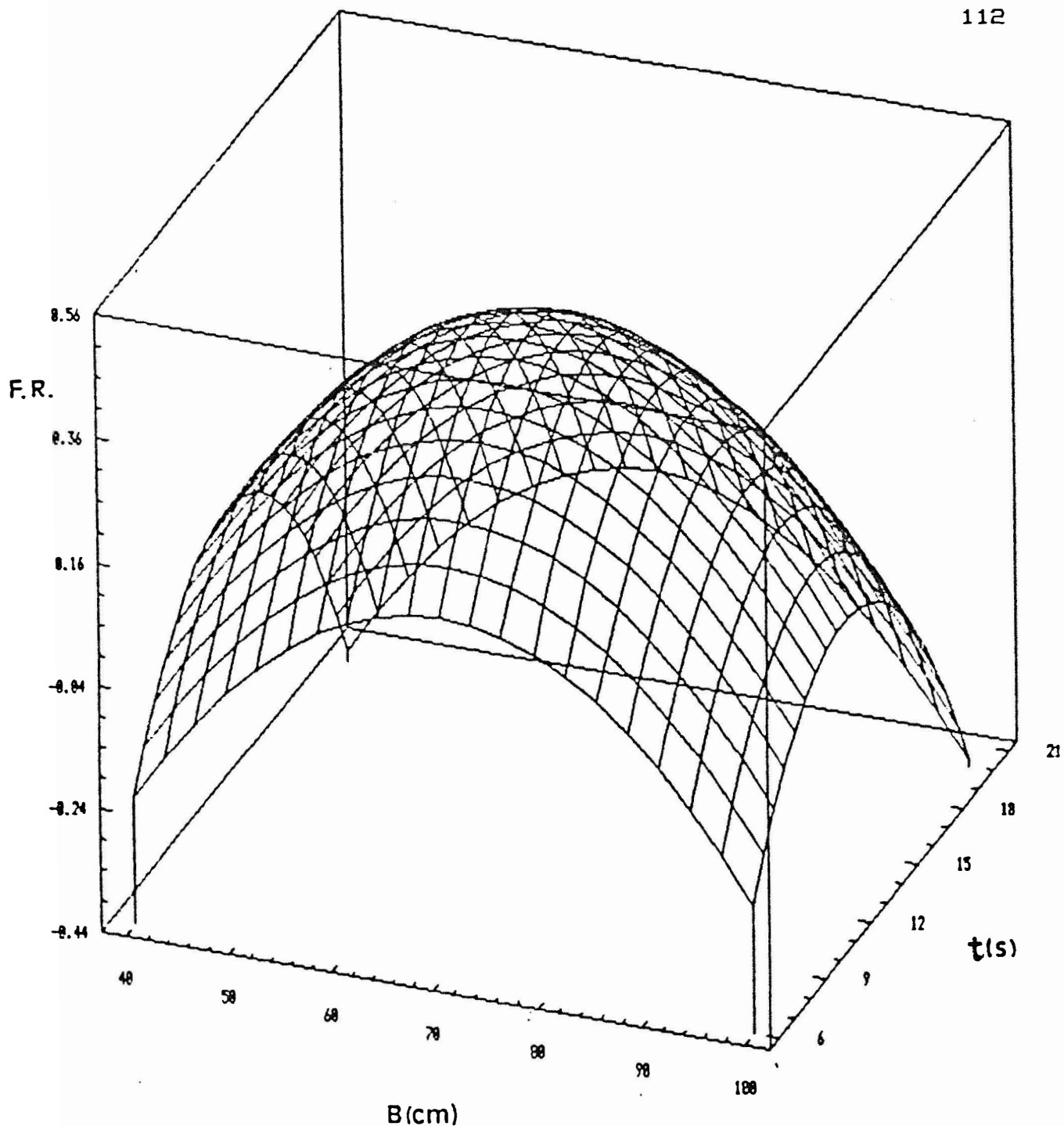


FIGURA 17 - Superfície ajustada da resposta em função do tempo ($t=F(C)$) e da bobina de reação B2. t- Tempo de inserção que define a porcentagem da concentração inicial. F.R.- Função resposta utilizada na otimização da concentração do redutor e do tempo de residência.

A figura 17 mostra a superfície ajustada aos pontos obtidos por essa otimização. Como a matriz $(X'X)$ da equação 2 possui inversa, foi possível a realização desse ajuste. Esta figura mostra que realmente a faixa da concentração do redutor que deu as maiores respostas foi quando o intervalo de tempo ($t=F(C)$) variou em torno de 10 s para uma bobina de reação em torno de 70 cm.

A equação da superfície ajustada foi dada por:

$$FR = -2,75544E+0 + 5,94455E-2*B^2 + 1,82208E-1*T - 4,24546E-4*B^2 - 7,51294E-3*T - 6,80484E-6*B*T \quad (18)$$

O método proposto por Zagatto et alii (1981) utiliza uma bobina de reação de 100 cm e a concentração do redutor de 1% m/v. Logo, com a otimização conseguiu-se um aumento na frequência analítica e uma diminuição da concentração da solução redutora.

5.6.2. Resultado das otimizações realizadas variando-se a concentração do molibdato de amônio

A aplicação do Método Simplex realizada com a função resposta dada pela eq. 14, conforme descrito no item 4.3.3., teve como resultado um comprimento de bobina B1 de 25 cm e B2 de 85 cm, e um tempo de inserção de 8 s. Pela equação $F(t)=C$ para esse sistema obtemos no ótimo, uma concentração $C = 10,7\%$ de C_0 . Como a concentração inicial de molibdato de amônio foi de 7% m/v, obtem-se que a concentração otimizada do molibdato de amônio é de $0,75\%$ m/v.

5.6.3. Resultado da determinação de fosfato em amostras vegetais

O sistema FIA otimizado proposto para a determinação de fosfato em plantas, esquematizado na figura 6, utiliza a injeção da amostra (12,5 ul), simultaneamente com a injeção de 250 ul de solução de molibdato de amônio (1 % m/v), e injeção de 125 ul de solução de ácido ascórbico 0,26 % m/v conforme o procedimento descrito em 4.3.5.

O gráfico de rotina para a determinação de fosfato em extratos nitroperclóricos de materiais vegetais, é mostrado na figura 18.

Os resultados em altura de pico são caracterizados por precisão de 99% e frequência analítica de 300 amostras/hora. O consumo de molibdato de amônio por determinação é de 2,5 ug e do ácido ascórbico por determinação é de 0,33 ug.

A otimização permitiu obter uma frequência analítica em cerca de 300 determinações por hora e reduzir drasticamente o consumo de reagentes.

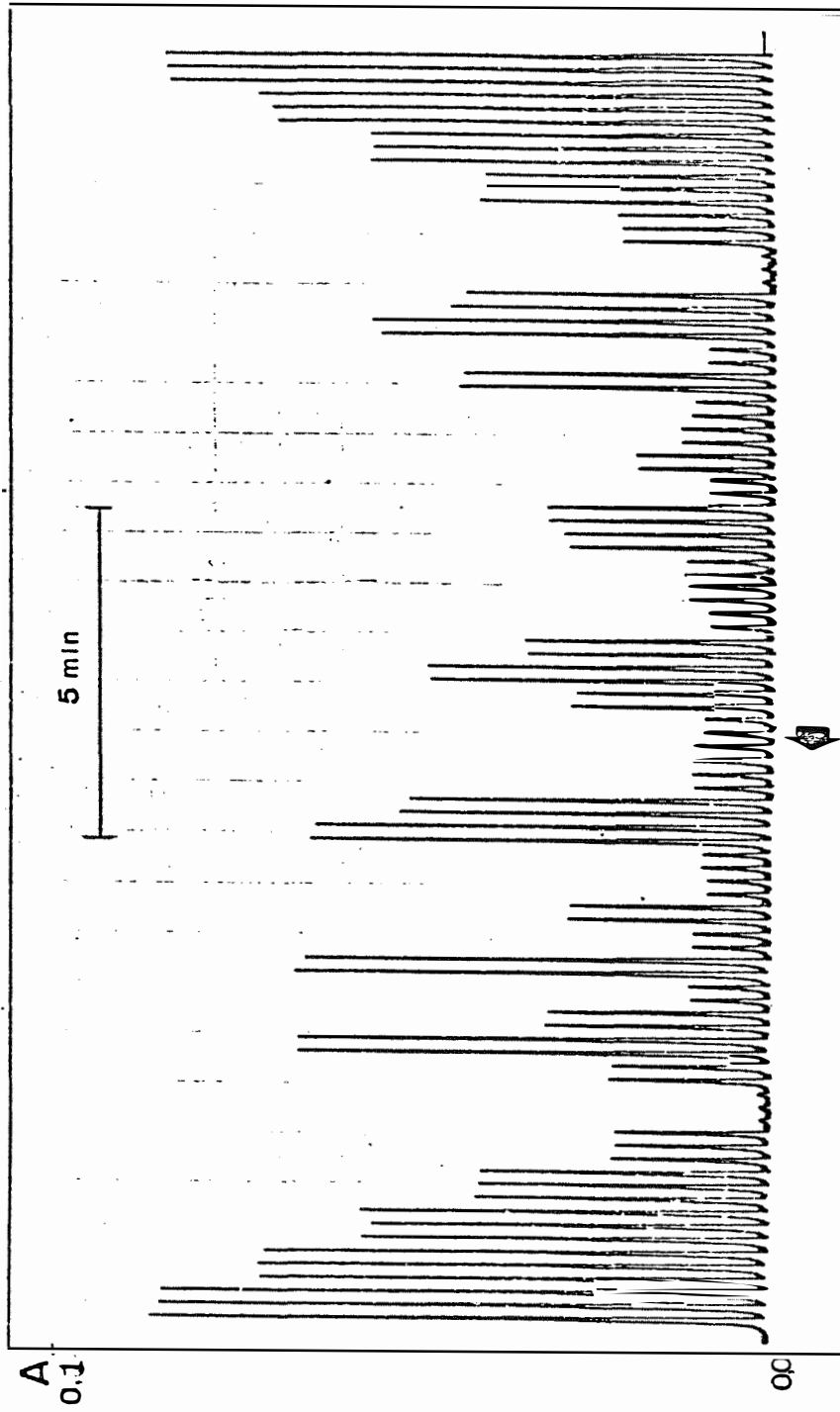


FIGURA 18 - Gráfico de rotina para a determinação espectrofotométrica de fosfato em amostras de plantas.

Da direita para a esquerda tem-se em triplicata, os picos correspondentes aos padrões de fósforo de 50, 40, 30, 20 e 10 mg/l, seguido de picos em duplicata correspondentes às amostras de extratos nitroperclóricos de material vegetal, e finalmente repete-se a curva analítica com os padrões.

6. CONCLUSÃO

Esse trabalho mostrou as vantagens do processo de otimização sequencial simplex nos procedimentos onde as variáveis interagem entre si. O fato da dispersão em um sistema FIA, ser uma função complexa onde existe um compromisso entre as variáveis, um processo de otimização univariado apresenta resultados parciais. Contudo, a análise fatorial efetuada previamente a aplicação do Método Simplex, mostrou ser uma ferramenta útil para observar os efeitos principais e de interações das variáveis no ajuste da curva de dispersão no sistema FIA.

Na otimização simplex em sistemas FIA, a dispersão pode ser abordada em função dos efeitos complexos entre as variáveis que a afetam, e é de se esperar uma complexidade nas superfícies de respostas que envolvam tais variáveis.

Quando aplicamos o método de otimização simplex ao sistema FIA para a determinação de fosfato em plantas, na função resposta a ser otimizada foi dada

ênfase a maximizar a velocidade analítica. Dado as concentrações de P-P₀ em plantas serem relativamente altas (de 0,1 a 0,5%),⁴ não houve necessidade de dar maior importância a sensibilidade do método.

A mudança nos parâmetros quando aplica-se o Método Simplex, deve ser feita rapidamente, e de modo que não afete as condições de estabilidade do sistema.

A automatização de sistemas vem ajudar nas mudanças constantes dos parâmetros, sem que seja necessário quebrar a estrutura do mesmo a cada nova mudança, isso é muito importante na aplicação do Método Simplex, já que a cada resposta é necessária uma nova observação.

O fato de se transformar variáveis de ajustes discretos em ajustes contínuos, além de tornar mais fácil suas mudanças nas rotinas de trabalho, beneficia enormemente a aplicação dos processos de otimização. A facilidade com que foi possível o ajuste contínuo da concentração de soluções e reagentes neste trabalho, vem mostrar a grande vantagem deste processo.

Outro fator importante foi a atribuição dos pesos para as respostas a serem otimizadas pelo Método Simplex, conforme a sua importância dentro do sistema. Em FIA, isso é de grande ajuda, já que os resultados das análises depende da otimização de muitas respostas, desde

sensibilidade, até faixas lineares amplas de calibração.

Os processos de otimização em sistemas FIA, como análise univariada, superfícies de resposta e finalmente o Método Simplex, trazem uma grande economia, funcionando em condições otimizadas, isto é, condições suficientes para determinado trabalho, sem excessos de material e de tempo.

7. BIBLIOGRAFIA

ALONSO, J.; BARTROLI, J.; COELHO, J.; VALLE, M. Simultaneous optimization of variables in FIA systems by means of the simplex method. *Anal. Letters*, Spain, 20(8): 1247-1263. 1987.

BERGAMIN Fo., H.; REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; ZAGATTO, E.A.G. Ion exchange in flow injection analysis. Determination of ammonium ions at the $\mu\text{g/l}$ level in natural waters with pulsed reagent. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, 117:81-89. 1980.

BETTERIDGE, D.; SLY, T.J.; WADE, A.P.; TILLMAN, J.E.W. Computer-assisted optimization for flow injection analysis of isoprenaline. *Anal. Chem.*, Washington, 55: 1292-1299. 1983

BETTERIDGE, D.; WADE, A.P.; HOWARD, A.G. Reflections on the modified simplex - I. *Talanta*, London, 32, no. 8B: 709-722. 1985-a.

BETTERIDGE, D.; WADE, A.P.; HOWARD, A.G. Reflections on

the modified simplex -II. *Talanta*, London, 32, no. 8B: 723-734. 1985-b.

BETTERIDGE, D.; SLY, T.J.; WADE, A.P. Versatile Automatic Development System for Flow Injection Analysis. *Anal. Chem.*, Washington, 58:2258-2265. 1986.

BOX, G.E.P. & JEHNKEN, D.W. Simplex-Sum Designs: A class of second order designs derivable from those of first order. *Ann. Math. Stat.*, 31. p:838-864. 1955. Apud: SPENDLEY, W.; HEXT, G.R.; HIMSWORTH, F.R., ed., *Sequential Application of simplex designs in optimization and evolutionary operation.* Technometrics, Richmond, 4, no. 4: 441- 461. 1962.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. *Statistics for experimenters.*, New York, John Wiley e Sons, Inc. 1978. p:307-323.

DEMING, S.N. *Experimental Design: Response Surfaces.* Apud: KOWALSKI, B. R., ed. 1978. *Chemometrics. Mathematics and Statistics in Chemistry.* NATO ASI Series. Serie C: Mathematical and Phisical Sciences. Dordrecht, Holland. D.Reidel Publishing Company. 133, p: 251-266. 1984.

FRIEDMAN, M. & SAVAGE, L.J. *Techniques of statistical*

- analysis. 1947. Apude: DEMING, S.N. Experimental Design: Response Surfaces. Apude: KOWALSKI, B. R., ed. Chemometrics. Mathematics and Statistics in Chemistry. NATO ASI Series. Serie C: Mathematical and Physical Sciences. Dordrecht, Holland. D.Reidel Publishing Company. 138, p: 251-304. 1984.
- GINÉ, M.F.; BERGAMIN Fo.,H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 114:191-197. 1980.
- GINÉ, M.F.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; JACINTHO, A.O. A simple procedure for standard additions in flow injection analysis. Spectrophotometric Determination of Nitrate in Plant Extracts. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 155:131-138. 1983.
- GINÉ, M.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN Fo., H.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; BRUNS, R.E. Flow injection calibration of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using the the generalised standard additions method. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 3:673-678. 1988.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. Piracicaba S.P. Livraria Nobel S.A. Ed. Distribuidora. 6a.

edici~~o~~o. 1976. p:131-167.

HOTELLING, H. Ann. Math. Statist. 1941. Apud: DEMING, S.N. Experimental Design: Response Surfaces. Apud: KOWALSKI, B. R., ed. Chemometrics. Mathematics and Statistics in Chemistry. NATO ASI Series. Serie C: Mathematical and Phisical Sciences. Dordrecht, Holland.D.Reidel Publishing Company. 138, p: 251-304. 1984.

JANSE, T. A. H. M.; VAN DER WIEL, P. F. A.; KATEMAN, G. Exeepimental optimization procedures in the determination of phosphate by flow-Injection analisis. Anal. Chim. Acta, Amsterdam,155: 89-102. 1983.

KOWALSKI, B. R., ed. 1978. Chemometrics. Mathematics and Statistics in Chemistry. NATO ASI Series. Serie C: Mathematical and Phisical Sciences. Dordrecht, Holland. D.Reidel Publishing Company. 138, p: 251-266. 1984.

KRUG, F.J.; BERGAMIN Fo.,H.; ZAGATTO, E.A.G.; JØRGENSEN, S.S. Rapid determination of sulphate in natural waters and plant disests by continuous flow injection turbidimetry. Analyst, London,102: 503-508. 1977.

- LONG, D.E. Simplex optimization of the response from chemical system. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, **46**: 193-206. 1969.
- MASSART, D. L.; DIJKSTRA, A.; KAUFMAN, L. Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. (A survey of statistical and mathematical techniques). Elsevier Scientific Publishing Company, 257-277. 1978.
- MORGAN, S.L. & DEMING, S.N. Simplex optimization of analytical chemical methods. *Anal. Chem.*, Washington, **46** no. 9: 1170-1181. 1974.
- MURRAY, R.S. Estatística. Ed. Mc. Graw-Hill do Brasil, Ltda. Brasilia, INL. 1974. p:362-400.
- NELDER, J.A. & MEAD, R. A simplex method for function minimization. *Computer J.* New York. **7**:308-313. 1965.
- NETER, J. & WASSERMAN, W. Applied Linear Statistical Models. Regression, Analysis of Variance and Experimental Designs. Ed. Richard D. Irwin, Inc., Homewood, Illinois. Vol I. 1974. p:97-121.

- PARKER Jr., L.R.; CAVE, M.R.; BARNES, R.M. Comparison of simplex algorithms. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 175: 231-237. 1985.
- PESSENDA, L.C.R. Determinação de baixas concentrações de octofosfato em águas naturais com emprego de resina de troca iônica em sistema de injeção em fluxo. Piracicaba, 1981, 73 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; MORTATTI, J.; KRUG, F.J.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN Fo., H.; PESSENDA, L.C.R. Zone-Sampling processes in flow injection analysis. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 123: 221-228. 1981.
- ROUTH, M.W.; SCHWARTZ, P.A.; DENTON, M.B. In: PARKER Jr.; L.R.; CAVE, M.R.; BARNES, R.M., ed. Comparison of simplex algorithms. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 175: 231-237. 1977.
- RUZICKA, J. & HANSEN, E.H. Flow Injection Analysis. New York John Wiley & Sons. 1981. Vol 62. p:133-132.
- RUZICKA, J. & HANSEN, E.H. Flow Injection Analysis. John Wiley & Sons. Segunda edição. 1988. 498p.
- SPENDLEY, W.; HEXT, G.R.; HIMSWORTH, F.R. Sequential

Application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation. *Technometrics*, Richmond, 4, no. 4: 441-461. 1962.

VAN DER WIEL, P.F.A. Improvement of the super-modified simplex optimization procedure. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, 122: 421-433. 1980.

VERGILI Jr., R. Aplicação do método simplex de otimização experimental em química analítica. Campinas, 1988, 96p. (Mestrado-Universidade Estadual de Campinas "UNICAMP").

YATES, F. The Designs and Analysis of Factorial Experiments. Imperial Bureau of Soil Science. Harpenden, Inglaterra. 1937. Apud: GOMES, F.P., ed. Curso de Estatística Experimental. Piracicaba S.P. Livraria Nobel S.A. Ed. Distribuidora. 6a. edição. 1976. p:131-167.

WADE, A.P. Optimisation of flow injection analysis and polarography by the modified simplex method. *Anal. Proc.*, 20: 523-527. 1983.

ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN Fo., H.; PESSENDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GINÉ, M.F. Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo. USP/CENA. Gráfica CENA. Piracicaba -SP, junho. 1981.

ZAGATTO, E.A.G.; GINÉ, M.F.; FERNANDES, E.A.N.; REIS, B.F.; KRUG, F.J. Sequential injections in flow systems as an alternative to gradient exploitation. Anal. Quim. Acta, Amsterdam, 173: 289-297. 1985.

ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; MARTINELLI, M.; KRUG, F.J.; BERGAMIN Fo., H.; GINÉ, M.F. Confluent streams in flow injection analysis. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 198: 153-163. 1987.

APENDICE
=====

APENDICE

Neste apêndice, encontram-se os resultados dos ajustes das curvas polinomiais aos dados obtidos pelo processo de reamostragem na zona dispersa esquematizado na figura 3. As tabelas a seguir mostram os coeficientes $A(i)$ $i=1,\dots,4$ do polinômio; os coeficientes de determinação, correlação e o erro padrão estimado para o ajuste aos dados das três repetições (REP. i) das oito combinações (COMB. i) do planejamento fatorial (tabela 7).

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 1 - REP. 1

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	95.08458
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-8.782425
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.7321691
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-7.009405E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	2.249705E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9973926		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9986955		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.652145		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 1 - REP. 2

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	102.3294
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-9.664122
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.6685943
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-5.859261E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	1.886642E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9976505		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9988246		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.613495		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 1 - REP. 3

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	70.30289
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-3.852507
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.4358042
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-6.631147E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	2.34718E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9980691		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9990341		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.556849		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 2 - REP. 1

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 67.09091
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -11.08734
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = .3840925
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = 1.951365E-02
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = -1.067164E-03

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .999488
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9997439
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .1109579

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 2 - REP. 2

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 54.85231
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -8.528049
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = .3503193
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -4.114921E-04
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = -6.68826E-05

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9995454
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9997728
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .1025557

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 2 - REP. 3

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 57.03536
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -9.611537
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = .5444555
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -1.525212E-02
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 3.466132E-04

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9994274
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9997137
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .1145823

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 3 - REP. 1

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	22.9545
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-1.871254
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.2903913
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-2.982221E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	8.68363E-04
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9963398		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9981682		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.2759755		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 3 - REP. 2

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	18.00599
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-2.555996
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.5690856
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-5.170639E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	1.388683E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9934114		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9967003		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.3600798		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 3 - REP. 3

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	16.52101
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-.5498495
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.1942546
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-2.693081E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	8.393103E-04
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9977879		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9988934		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.2110265		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 4 - REP. 1

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	212.1921
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-38.74177
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	.9176826
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	.1754533
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	-8.781646E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9979789		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9989889		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.4858597		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 4 - REP. 2

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	198.1952
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-36.52187
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	1.286523
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	9.604713E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	-5.337748E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9979986		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.9989988		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.5043754		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 4 - REP. 3

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	187.1693
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-33.7935
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	1.01841
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	.1106126
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	-5.744865E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=	.9972399		
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=	.998619		
ERROR STANDARD ESTIMADO	=	.5675551		

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 5 - REP. 1

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	134.6726
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-21.22433
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	1.513232
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-8.779679E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	2.822904E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=			.9991156
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=			.9995577
ERROR STANDARD ESTIMADO	=			.4206838

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 5 - REP. 2

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	147.4977
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-24.23157
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	1.628322
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-7.474826E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	2.057247E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=			.9989823
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=			.9994911
ERROR STANDARD ESTIMADO	=			.4493678

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 5 - REP. 3

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0)	=	159.2083
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1)	=	-32.33621
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2)	=	3.332914
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3)	=	-.2167182
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4)	=	6.164776E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=			.9992209
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=			.9996104
ERROR STANDARD ESTIMADO	=			.3939787

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 6 - REP. 1

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 542.8366
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -149.7367
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = 16.46932
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -.8108636
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 1.474046E-02

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9959666
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9979812
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .6591269

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 6 - REP. 2

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 585.2195
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -163.4396
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = 18.05655
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -.8897622
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 1.616974E-02

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9960869
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9980415
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .6402575

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 6 - REP. 3

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 300.2724
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -81.45517
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = 9.379001
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -.4883471
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 9.310231E-03

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9961709
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9980836
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .6482156

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 7 - REP. 1

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0) =	201.6662
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1) =	-50.19919
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2) =	3.661809
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3) =	-1.513881E-02
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4) =	-4.902606E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=		.9988192
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=		.9994094
ERROR STANDARD ESTIMADO	=		.1994388

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 7 - REP. 2

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0) =	155.7864
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1) =	-40.72133
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2) =	3.7766
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3) =	-.1382444
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4) =	1.357425E-03
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=		.9973535
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=		.9986759
ERROR STANDARD ESTIMADO	=		.2756122

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 7 - REP. 3

COEFICIENTE DE 0 GRAU	:	A(0) =	179.6188
COEFICIENTE DE 1 GRAU	:	A(1) =	-47.12908
COEFICIENTE DE 2 GRAU	:	A(2) =	4.14215
COEFICIENTE DE 3 GRAU	:	A(3) =	-.114962
COEFICIENTE DE 4 GRAU	:	A(4) =	-5.94391E-04
COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2)	=		.9991844
COEFICIENTE DE CORRELACAO	=		.9995921
ERROR STANDARD ESTIMADO	=		.1537396

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 8 - REP. 1

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 64.27307
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -6.813376
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = .4549423
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -3.451641E-02
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 1.081088E-03

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9979441
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9989715
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .3112368

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 8 - REP. 2

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 73.24913
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -7.55068
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = .3185145
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -1.753327E-02
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 5.967386E-04

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9991546
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .9995772
 ERROR STANDARD ESTIMADO = 1984688

COEFICIENTES DA EQUACAO - COMB. 8 - REP. 3

 COEFICIENTE DE 0 GRAU : A(0) = 82.21225
 COEFICIENTE DE 1 GRAU : A(1) = -9.892798
 COEFICIENTE DE 2 GRAU : A(2) = .5538497
 COEFICIENTE DE 3 GRAU : A(3) = -2.841555E-02
 COEFICIENTE DE 4 GRAU : A(4) = 7.919348E-04

COEFICIENTE DE DETERMINACAO (R^2) = .9981289
 COEFICIENTE DE CORRELACAO = .999064
 ERROR STANDARD ESTIMADO = .2977056