

4

Parte experimental

Desenvolvimento do Método

O vanádio por suas características e baixos níveis no soro levou os experimentos a condições extremas. Conseqüentemente, foram obtidos resultados com maiores flutuações e na análise dos resultados levou-se em consideração que esta é a realidade do método escolhido.

4.1

Experimentos preliminares

Alguns experimentos preliminares foram realizados, de modo a melhor se conhecer o desempenho do sistema analítico utilizado. Foram investigadas quatro situações distintas, que envolveram a presença ou ausência de modificador e o número de injeções, de modo a se inferir, posteriormente, a situação mais promissora, ou seja, de melhor sensibilidade, considerando que o nível esperado de vanádio é muito baixo.

4.1.1

Determinação do limite de detecção (LD) sem o uso de modificador ou de múltipla injeção

4.1.1.1

Procedimento

Na determinação das temperaturas ótimas de pirólise e de atomização, utilizou-se uma solução de vanádio de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ e um volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. O programa de temperatura foi estabelecido utilizando o programa de desenvolvimento de métodos do equipamento.

Os valores encontrados para as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização foram de 1200 e 2400 °C, respectivamente. Foi feita a curva de calibração com soluções de calibração aquosas nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, em seguida, foram realizadas 10 determinações do ensaio branco.

4.1.1.2

Resultados

Com os resultados obtidos (10 determinações do ensaio branco) foram calculados a média (\bar{M}), o desvio padrão (s_0) e o limite de detecção (LD). O limite de detecção foi calculado como $3s_0$. Os resultados foram $\bar{M} = 0,079 \mu\text{g L}^{-1}$, $s_0 = 0,036 \mu\text{g L}^{-1}$ e $LD = 0,11 \mu\text{g L}^{-1}$

4.1.2

Determinação do limite de detecção com uso de modificador

4.1.2.1

Procedimento

Na determinação das temperaturas ótimas de pirólise e de atomização foram utilizados 20 μL de solução de vanádio $6 \mu\text{g L}^{-1}$ e um volume de injeção do modificador de 20 μL , contendo 0,0050mg Pd e 0,0030mg de Mg. O programa de temperatura foi estabelecido utilizando o programa de desenvolvimento de métodos do equipamento. Para definir a massa do modificador ótima foi feito um estudo univariado. As temperaturas ótimas de pirólise e de atomização encontradas foram de 1100 e 2400 °C, respectivamente. A massa do modificador ótima foi 0,002 mg de Pd / 0,001mg de Mg por 20 μL . Foi feita a curva de calibração com soluções de calibração aquosas nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, em seguida, foram realizadas 10 determinações do ensaio branco.

4.1.2.2

Resultados

Com os resultados obtidos foram calculados a média, o desvio padrão e o limite de detecção. Os resultados foram $\bar{M} = -0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, $s_0 = 0,26 \mu\text{g L}^{-1}$ e $LD = 0,79 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.1.3

Determinação do limite de detecção sem modificador com múltipla injeção

4.1.3.1

Procedimento

Na determinação das temperaturas ótimas de pirólise e de atomização se utilizou uma solução de vanádio de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ e um volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. O número máximo de injeções realizadas foi duas e só foi possível, após a primeira injeção, correr a etapa de secagem sem a pirólise; mesmo assim, houve danos no capilar do amostrador. O programa de temperatura foi estabelecido utilizando o programa de desenvolvimento de métodos do equipamento. Os valores encontrados para as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização foram de 1200 e 2500°C , respectivamente. Foi feita a curva analítica com soluções aquosas de calibração nas concentrações de $1, 2, 4, 6, 8$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e, em seguida foram realizadas 10 determinações do ensaio branco.

4.1.3.2

Resultados

Com os resultados obtidos foram calculados a média, o desvio padrão e o limite de detecção. Os resultados foram, $\bar{M} = -0,028 \mu\text{g L}^{-1}$, $s_0 = 0,079 \mu\text{g L}^{-1}$ e $LD = 0,24 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.1.4

Determinação do limite de detecção com modificador com múltipla injeção

4.1.4.1

Procedimento

Na determinação das temperaturas ótimas de pirólise e de atomização foram utilizados 20 μL de solução de vanádio $6 \mu\text{g L}^{-1}$ e um volume de injeção do modificador de 20 μL , contendo 0,0050mg Pd e 0,0030mg de Mg. O programa de temperatura então foi definido utilizando o programa de desenvolvimento de métodos do equipamento. Para definir a massa ótima de modificador, utilizando o programa de temperatura já definido, foi feito um estudo univariado. O número máximo de injeções realizadas foi duas e só foi possível após a primeira injeção, correr a etapa de secagem sem a pirólise; mesmo assim, houve danos no capilar do amostrador. Os valores encontrados para as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização foram de 1200 e 2500 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A massa do modificador ótima foi de 0,002 mg de Pd / 0,001mg de Mg por 20 μL . Foi feita a curva de calibração com soluções de calibração aquosas nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, em seguida, foram realizadas 10 determinações do ensaio branco.

4.1.4.2

Resultados

Com os resultados obtidos foram calculados a média, o desvio padrão e o limite de detecção. Os resultados foram $\bar{M} = 0,36 \mu\text{g L}^{-1}$, $s_0 = 0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ e $\text{LD} = 0,33 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.1.5

Testes na presença da matriz

É sabido que a presença da matriz pode influenciar no comportamento de um analito frente a um sistema analítico. Assim, valores ótimos obtidos a partir de processos de otimização com soluções de calibração foram verificados em relação à presença da matriz.

4.1.5.1

Procedimento

Para avaliar o comportamento da matriz, foi feita uma diluição 1+1, juntando-se soro com a solução de calibração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de vanádio. Usou-se o programa de desenvolvimento do equipamento, avaliando a temperatura de pirólise entre 1000 e 1400°C e a temperatura de atomização entre 2100 e 2500°C, verificando-se as situações já investigadas para o meio aquoso simples: sem modificador, com modificador, dupla injeção sem modificador e dupla injeção com modificador.

4.1.5.2

Resultados

Nos testes com mono injeção sem modificador, mono injeção com modificador e dupla injeção com modificador, as temperaturas que apresentaram melhor relação sinal / ruído foram 1400°C para pirólise e 2500°C para atomização. Nos testes com dupla injeção sem modificador, as temperaturas que apresentaram melhor relação sinal ruído foram 1000°C para pirólise e 2500°C para atomização.

4.1.6

Conclusões parciais

Analisando os resultados dos experimentos sem a matriz, foi observado que os melhores limites de detecção foram obtidos sem o modificador. Nos experimentos realizados com dupla injeção, foi obtido um bom limite de detecção; entretanto, o capilar do amostrador foi danificado várias vezes, pois derretia ao retornar ao forno de grafite para a segunda injeção. Sendo assim, por essa assim limitação do equipamento utilizado, foi eliminada a possibilidade da dupla injeção. A tabela 1 sumariza os resultados encontrados, e dela se depreende que a situação “mono injeção sem modificador” é aquela que apresenta os melhores LD. Entretanto, os experimentos com a matriz mostraram temperaturas ótimas de pirólise e de atomização acima dos valores observados para a solução aquosa simples.

Tabela 1. Resultados de experimentos preliminares.

Resultados	Mono injeção sem modificador	Mono injeção com modificador	Dupla injeção sem modificador	Dupla injeção com modificador
Média	0,079	-0,01	-0,028	-0,36
s_0	0,036	0,26	0,079	0,11
LD	0,11	0,79	0,24	0,33
$T_{\text{pirólise}}$	1200	1100	1200	1200
$T_{\text{atomização}}$	2400	2400	2500	2500
$T_{\text{pirólise}}^*$	1400	1400	1000	1400
$T_{\text{atomização}}^*$	2500	2500	2500	2500

*na presença da matriz

4.2

Otimização multivariada

Com base no conhecimento adquirido nos experimentos preliminares, foram definidas as variáveis a serem estudadas e foi construída a matriz do planejamento multifatorial. A amostra utilizada para os testes foi fortificada com $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanádio. Foram fixadas duas variáveis: o volume do modificador (em $10 \mu\text{L}$) e a temperatura de atomização (em 2500°C), uma temperatura suficientemente alta, mas que não atinge o limite do equipamento, que é de 2600°C . Esta temperatura também é a recomendada pelo fabricante como temperatura de atomização máxima nos programas de atomização sugeridos pelo manual do equipamento. Os valores de absorvância encontrados foram sempre normalizados para uma mesma massa de vanádio e, para experimentos realizados em dias diferentes, frente a uma curva analítica aquosa tomada sempre nas mesmas condições. Os níveis do experimento foram estabelecidos conforme a tabela 2.

Tabela 2. Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento fatorial.

	Descrição	Variável	Níveis		
			-1	0	+1
A	Temperatura de pirólise ($^\circ\text{C}$)	T_p	1125	1250	1375
B	Massa de modificador Pd +Mg ($\mu\text{g}/10\mu\text{L}$)	M_{mod}	5	10	15
C	Volume de amostra injetado (μL)	V_{am}	25	30	35
D	Fator de diluição da amostra	F_{dil}	1+3	1+2	1+1
E	Concentração do diluente (HNO_3 , %)	C_{HNO_3}	1,25	2,5	3,75

No planejamento composto central foram considerados cinco fatores, em dois níveis, o que resultou em um total de 47 rodadas de experimentos sendo 32 corridas, 10 axiais e 5 centrais. Na tabela 3, temos a matriz de experimentos, sendo que os ensaios foram realizados na ordem proposta pelo software.

Em relação ao fator de diluição da amostra, os resultados foram devidamente normalizados em relação à massa final de analito dispensada no forno.

Tabela 3. Combinação entre as variáveis (valores reais).

Ensaio	A	B	C	D	E
27	1375	15,0	25	0,50	1,25
32	1375	15,0	35	0,50	3,75
43	1250	10,0	30	0,33	2,50
11	1125	15,0	25	0,50	1,25
19	1375	5,0	25	0,50	1,25
8	1125	5,0	35	0,50	3,75
21	1375	5,0	35	0,25	1,25
26	1375	15,0	25	0,25	3,75
22	1375	5,0	35	0,25	3,75
36	1250	21,9	30	0,33	2,50
41	1250	10,0	30	0,33	0,47
5	1125	5,0	35	0,25	1,25
7	1125	5,0	35	0,50	1,25
13	1125	15,0	35	0,25	1,25
16	1125	15,0	35	0,50	3,75
14	1125	15,0	35	0,25	3,75
39	1250	10,0	30	0,036	2,50
29	1375	15,0	35	0,25	1,25
25	1375	15,0	25	0,25	1,25
24	1375	5,0	35	0,50	3,75
38	1250	10,0	42	0,33	2,50
12	1125	15,0	25	0,50	3,75
44	1250	10,0	30	0,33	2,50
40	1250	10,0	30	0,63	2,50
33	953	10,0	30	0,33	2,50
42	1250	10,0	30	0,33	5,47
31	1375	15,0	35	0,50	1,25
4	1125	5,0	25	0,50	3,75
18	1375	5,0	25	0,25	3,75
30	1375	15,0	35	0,25	3,75
1	1125	5,0	25	0,25	1,25
20	1375	5,0	25	0,50	3,75
9	1125	15,0	25	0,25	1,25
37	1250	10,0	18	0,33	2,50
35	1250	1,9	30	0,33	2,50
6	1125	5,0	35	0,25	3,75
23	1375	5,0	35	0,50	1,25
17	1375	5,0	25	0,25	1,25
10	1125	15,0	25	0,25	3,75
3	1125	5,0	25	0,50	1,25
28	1375	15,0	25	0,50	3,75
15	1125	15,0	35	0,50	1,25
34	1547	10,0	30	0,33	2,50
2	1125	5,0	25	0,25	3,75

Tabela 4. Combinação entre as variáveis (valores codificados) com os respectivos resultados.

Ensaio	A	B	C	D	E	Relação sinal / ruído
27	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	26,7
32	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	14,6
43	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	31,5
11	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	31,5
19	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	22,7
8	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	10,1
21	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	6,7
26	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	9,5
22	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	50,0
36	0,00000	2,37841	0,00000	0,00000	0,00000	19,7
41	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	-2,37841	13,6
5	-1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	17,7
7	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	14,2
13	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	10,2
16	-1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	12,7
14	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	19,0
39	0,00000	0,00000	0,00000	-2,37841	0,00000	3,2
29	1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,6
25	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	6,6
24	1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	5,8
38	0,00000	0,00000	2,37841	0,00000	0,00000	12,9
12	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	4,3
44	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	21,7
40	0,00000	0,00000	0,00000	2,37841	0,00000	21,7
33	-2,37841	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	6,3
42	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	2,37841	28,5
31	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	8,5
4	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	22,7
18	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	16,3
30	1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	63,0
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	19,7
20	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	7,3
9	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	7,8
37	0,00000	0,00000	-2,37841	0,00000	0,00000	19,0
35	0,00000	-2,37841	0,00000	0,00000	0,00000	13,0
6	-1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	42,0
23	1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	3,4
17	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	4,8
10	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	5,6
3	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	38,5
28	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	24,8
15	-1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	8,7
34	2,37841	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	13,2
2	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	12,8

Os resultados dos experimentos foram analisados usando a relação sinal (absorbância integrada) / ruído (desvio padrão das três replicatas), por meio do planejamento do composto central. Foram estimados os efeitos principais individuais e de interação para este experimento. Esses resultados estão na tabela 5, e fornecem a estimativa dos efeitos e coeficientes, a probabilidade (*p-value*), indicando quais os efeitos e interações são estatisticamente significantes, com 95% de confiança. Os efeitos e interações que apresentam $p < 0,05$ são estatisticamente significantes. No presente estudo nenhum efeito apresentou $p < 0,05$. Logo nenhum efeito tem maior significância que os outros.

Tabela 5. Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento do composto central.

	Efeito	Desvio padrão	t(1)	p	-95.%	+95.%	Coeficiente	Desvio padrão	-95.%	+95.%
Média / Interação	28,6277	4,653414	6,15197	0,102585	-30,4996	87,75489	28,62766	4,653414	-30,4996	87,75489
(1) A (L)	0,2223	2,123543	0,10469	0,933593	-26,7599	27,20448	0,11116	1,061771	-13,3799	13,60224
A (Q)	-6,4408	2,419756	-2,66176	0,228786	-37,1867	24,30511	-3,2204	1,209878	-18,5934	12,15255
(2) B (L)	-0,8483	2,123543	-0,39949	0,758043	-27,8305	26,13384	-0,42417	1,061771	-13,9152	13,06692
B (Q)	-4,1072	2,419756	-1,69738	0,338936	-34,8532	26,63868	-2,05362	1,209878	-17,4266	13,31934
(3) C (L)	-0,6121	2,123543	-0,28822	0,821354	-27,5942	26,37012	-0,30603	1,061771	-13,7971	13,18506
C (Q)	-4,2472	2,419756	-1,75521	0,329684	-34,9931	26,49873	-2,12359	1,209878	-17,4966	13,24937
(4) D (L)	-0,6353	2,12534	-0,2989	0,815094	-27,6403	26,36974	-0,31763	1,06267	-13,8201	13,18487
D (Q)	-6,0004	2,322909	-2,58312	0,235143	-35,5157	23,515	-3,00018	1,161454	-17,7579	11,7575
(5) E (L)	4,813	2,123543	2,26648	0,26453	-22,1692	31,79513	2,40648	1,061771	-11,0846	15,89757
E(Q)	-2,4396	2,419756	-1,00822	0,497394	-33,1856	28,30627	-1,21982	1,209878	-16,5928	14,15314
1L e 2L	7,2684	2,458333	2,95663	0,20763	-23,9677	38,50447	3,63419	1,229167	-11,9838	19,25224
1L e 3L	2,7024	2,458333	1,09929	0,469913	-28,5337	33,9385	1,35121	1,229167	-14,2668	16,96925
1L e 4L	-3,4672	2,423363	-1,43074	0,388346	-34,259	27,32453	-1,73361	1,211682	-17,1295	13,66227
1L e 5L	8,0959	2,458333	3,29325	0,187677	-23,1402	39,332	4,04796	1,229167	-11,5701	19,666
2L e 3L	1,0288	2,458333	0,4185	0,747676	-30,2073	32,26489	0,5144	1,229167	-15,1036	16,13245
2L e 4L	2,8084	2,423363	1,15887	0,453236	-27,9834	33,60011	1,40418	1,211682	-13,9917	16,80005
2L e 5L	0,7654	2,458333	0,31133	0,807854	-30,4707	32,00145	0,38268	1,229167	-15,2354	16,00072
3L e 4L	-13,4675	2,423363	-5,55736	0,113341	-44,2593	17,32424	-6,73375	1,211682	-22,1296	8,66212
3L e 5L	12,573	2,458333	5,11444	0,122924	-18,6631	43,80909	6,2865	1,229167	-9,3315	21,90454
4L e 5L	-11,8967	2,423363	-4,90916	0,12793	-42,6884	18,89508	-5,94834	1,211682	-21,3442	9,44754

O diagrama de Pareto mostra de forma rápida e clara a importância e significado estatístico dos efeitos (figura 2).

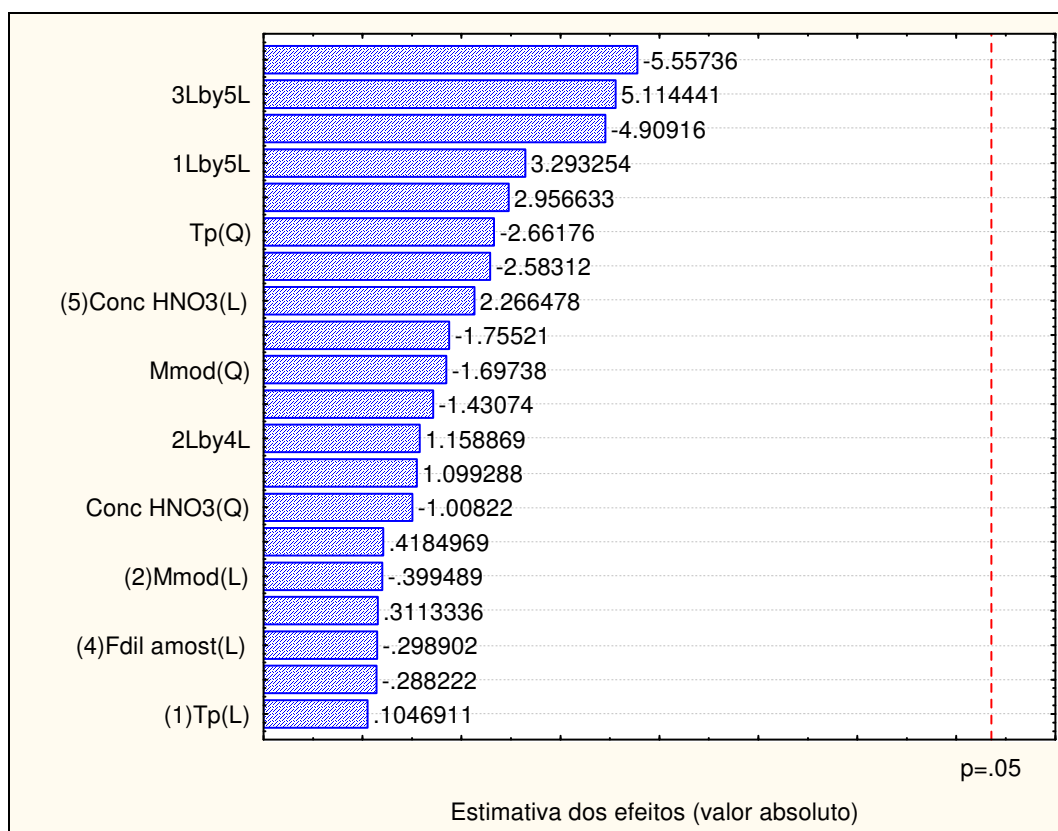


Figura 2. Diagrama de Pareto do experimento.

Os efeitos da interação entre os fatores 3 (volume de amostra) e 4, 3 (volume de amostra) e 5 e 4 (fator de diluição) e 5 (concentração do HNO₃) apresentaram maior significado estatístico embora todos tenham $p < 0,05$.

A tabela 6 mostra a variação dos resultados experimentais através da ferramenta de análise de variância (ANOVA).

Tabela 6. Tabela ANOVA

	SS	df	MS	F	p
(1) A (L)	0,530	1	0,530	0,01096	0,933593
A (Q)	342,538	1	342,538	7,08496	0,228786
(2) B (L)	7,716	1	7,716	0,15959	0,758043
B (Q)	139,293	1	139,293	2,88109	0,338936
(3) C (L)	4,016	1	4,016	0,08307	0,821354
C (Q)	148,947	1	148,947	3,08077	0,329684
(4) D (L)	4,319	1	4,319	0,08934	0,815094
D (Q)	322,598	1	322,598	6,67253	0,235143
(5) E (L)	248,356	1	248,356	5,13692	0,264530
E (Q)	49,145	1	49,145	1,01651	0,497394
1L e 2L	422,636	1	422,636	8,74168	0,207630
1L e 3L	58,424	1	58,424	1,20843	0,469913
1L e 4L	98,968	1	98,968	2,04703	0,388346
1L e 5L	524,351	1	524,351	10,84553	0,187677
2L e 3L	8,468	1	8,468	0,17514	0,747676
2L e 4L	64,929	1	64,929	1,34298	0,453236
2L e 5L	4,686	1	4,686	0,09693	0,807854
3L e 4L	1493,169	1	1493,169	30,88427	0,113341
3L e 5L	1264,643	1	1264,643	26,15751	0,122924
4L e 5L	1165,160	1	1165,160	24,09983	0,127930
Lack of Fit	1184,996	22	53,863	1,11410	0,646280
Pure Error	48,347	1	48,347		
Total SS	7219,513	43			

A análise de variância confirma os dados encontrados na tabela de estimativa dos efeitos.

O termo de falta de ajuste não tem significância estatística ($<0,05$) e o coeficiente de ajuste do modelo ($R^2 = 0,83$) foi considerado satisfatório. A figura 3 apresenta o gráfico dos valores observados versus valores previstos pelo modelo obtido. Os valores devem variar aleatoriamente em torno da reta e, quanto maior a proximidade da reta, melhor o ajuste do modelo.

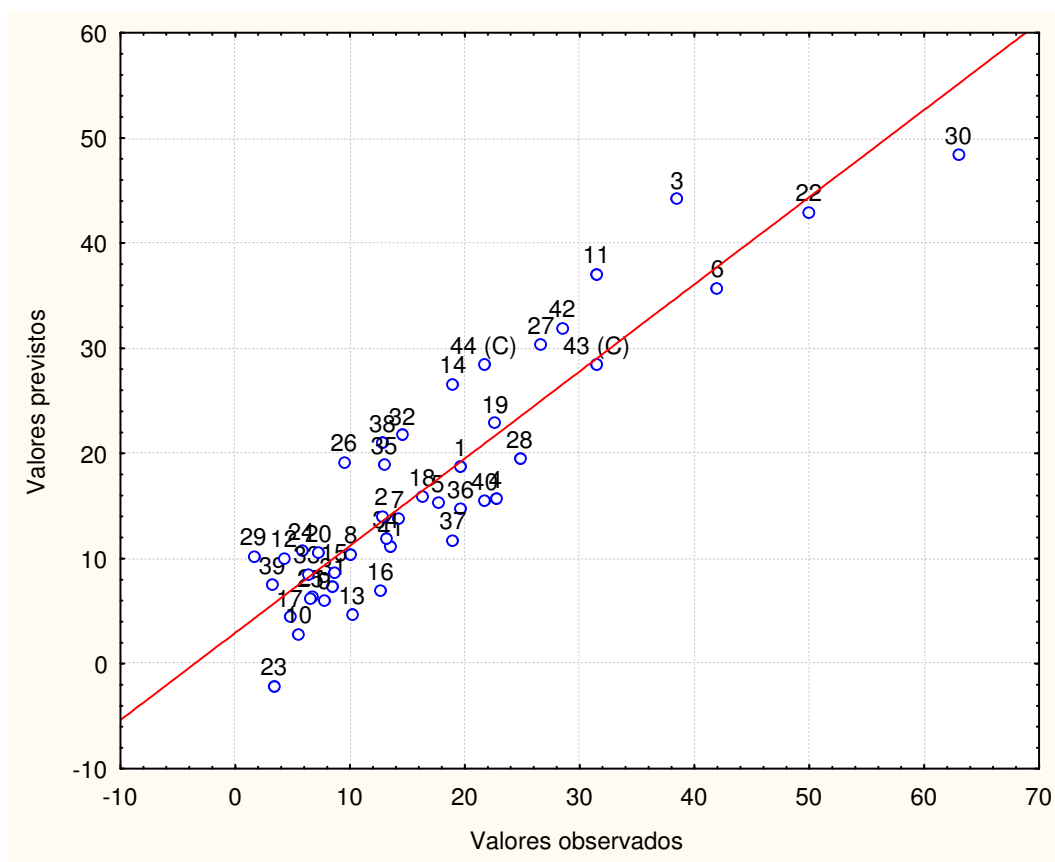


Figura 3. Valores observados *versus* previstos.

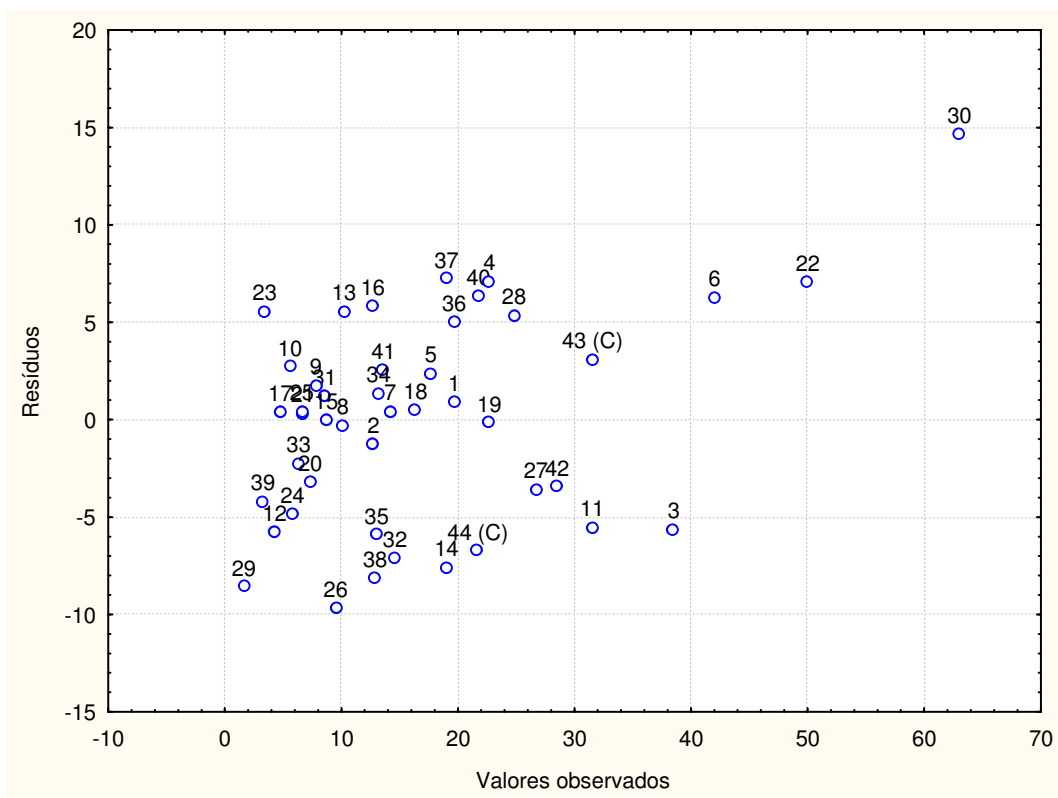


Figura 4. Valores observados *versus* resíduos.

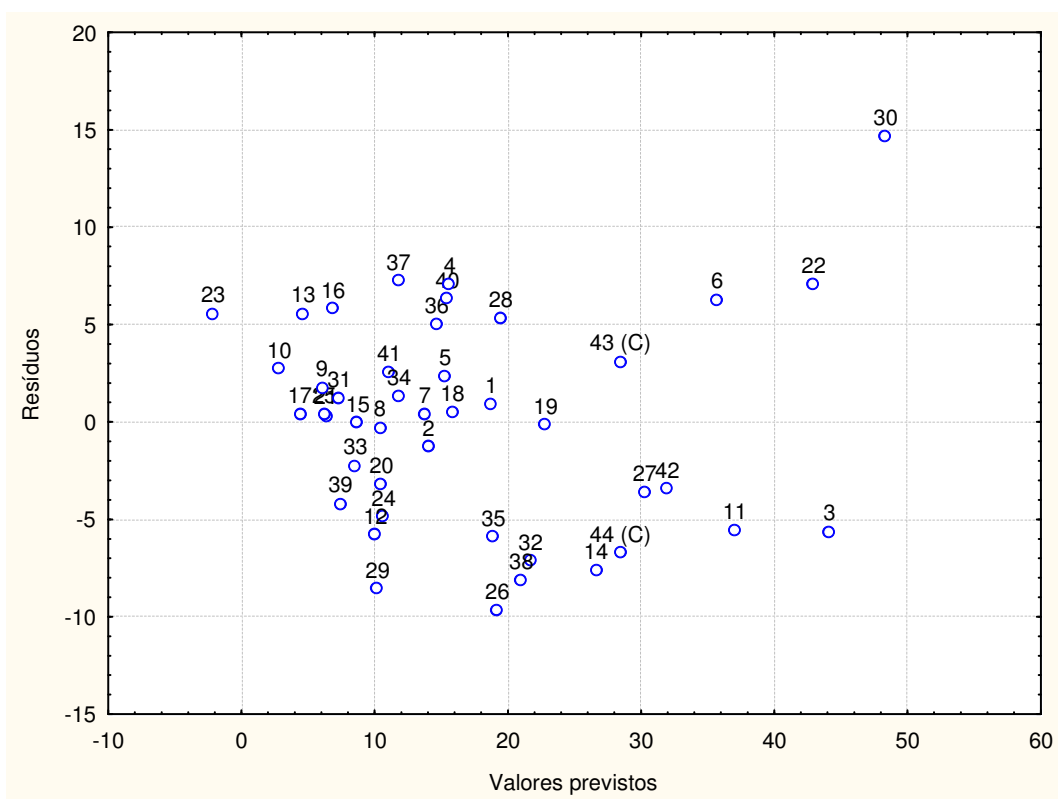


Figura 5. Valores previstos *versus* resíduos.

As figuras 4 e 5 apresentam a variação dos resíduos de acordo com o modelo desenvolvido, mostrando que os resíduos variam aleatoriamente em torno do valor zero sem tendências que possam acusar uma falta de ajuste no modelo proposto.

As figuras 6 a 15 representam as superfícies de resposta tridimensional, geradas a partir do modelo proposto. Os valores de três variáveis foram fixados nos valores críticos obtido pelo modelo proposto, as outras duas variáveis formam a superfície de resposta. Os valores críticos de cada variável são os que o modelo propõe como ótimos para a obtenção da melhor resposta.

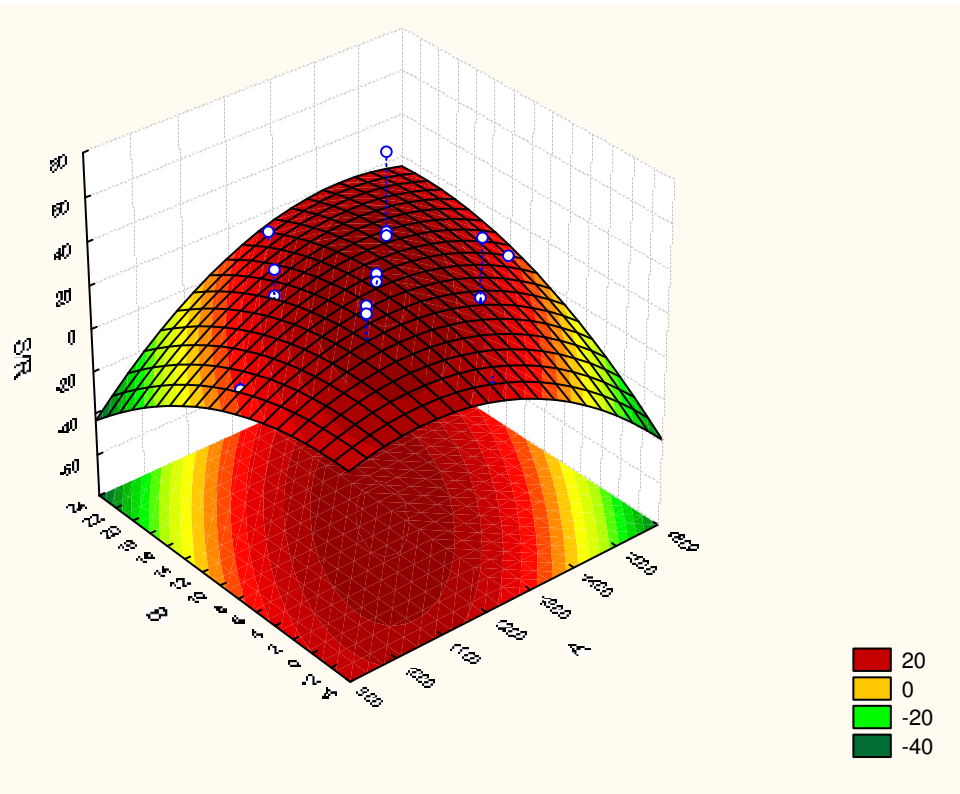


Figura 6. Superfície de resposta: relação sinal ruído em função da temperatura de pirólise (A) e da massa do modificador (B); C, D e E fixos nos respectivos valores críticos.

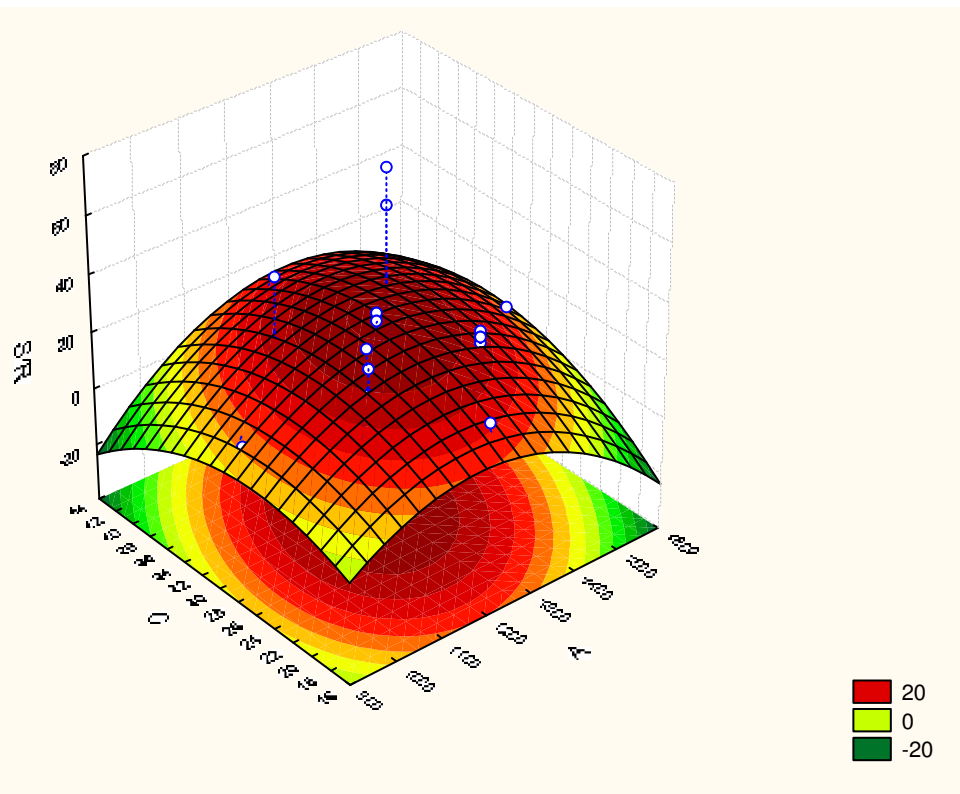


Figura 7. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da temperatura de pirólise (A) e do volume de amostra (C); B, D e E fixos no valor crítico.

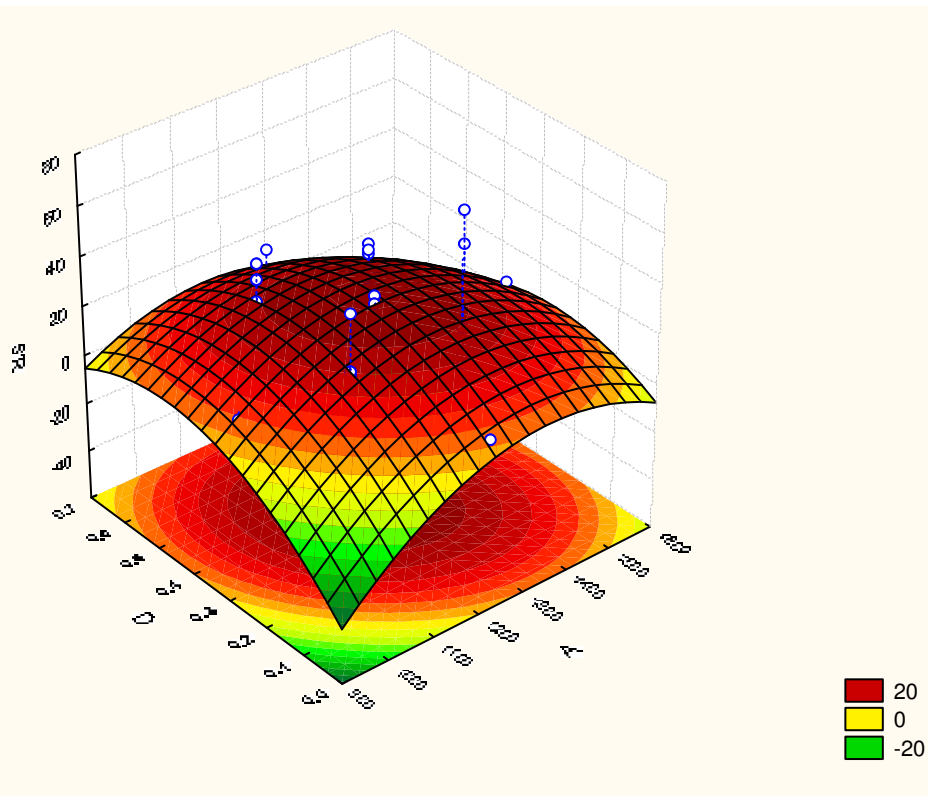


Figura 8. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da temperatura de pirólise (A) e do fator de diluição da amostra (D); B, C e E fixos no valor crítico.

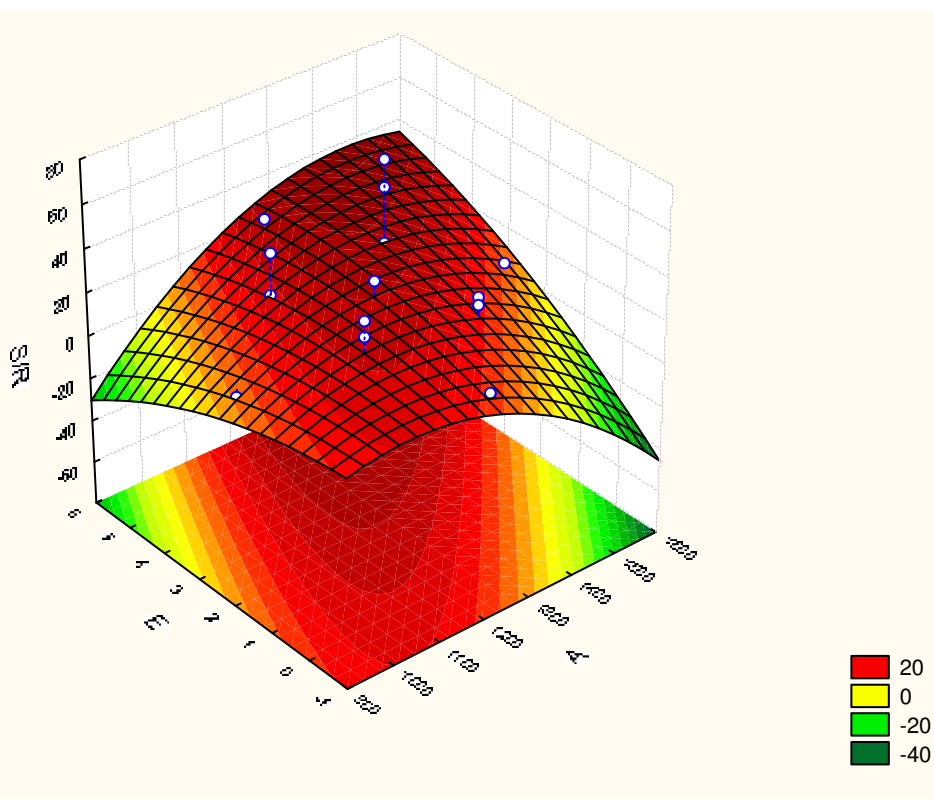


Figura 9. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da temperatura de pirólise (A) e da concentração do HNO₃ (E); B, C e D fixos no valor crítico.

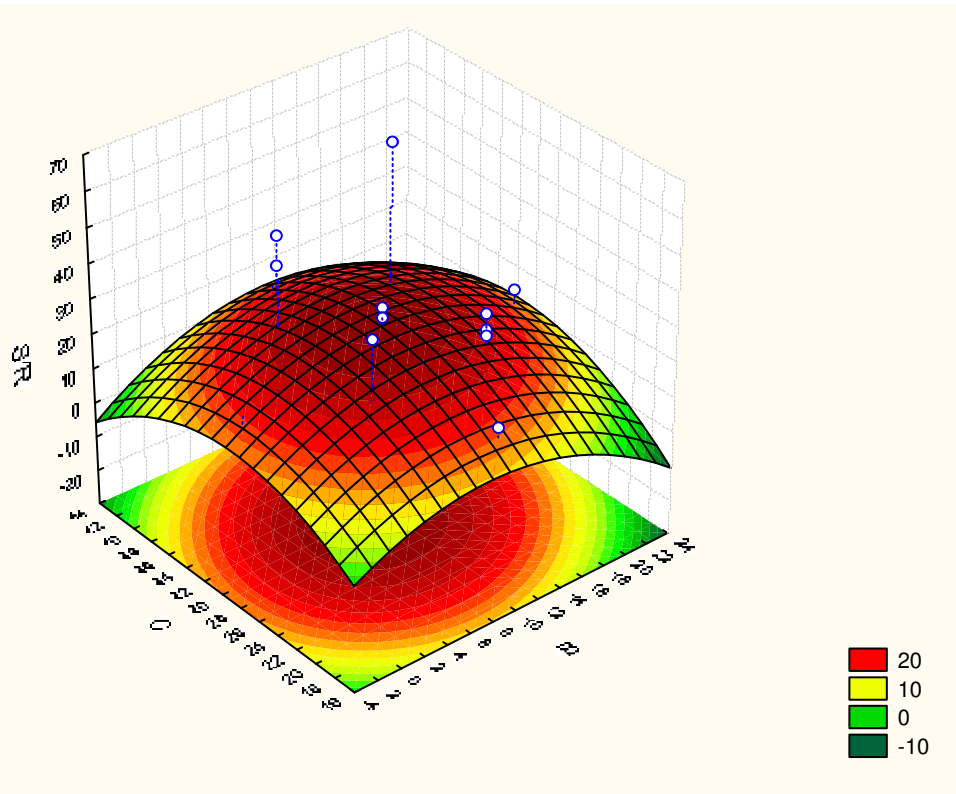


Figura 10. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da massa do modificador (B) e do volume de amostra (C); A, D e E fixos no valor crítico.

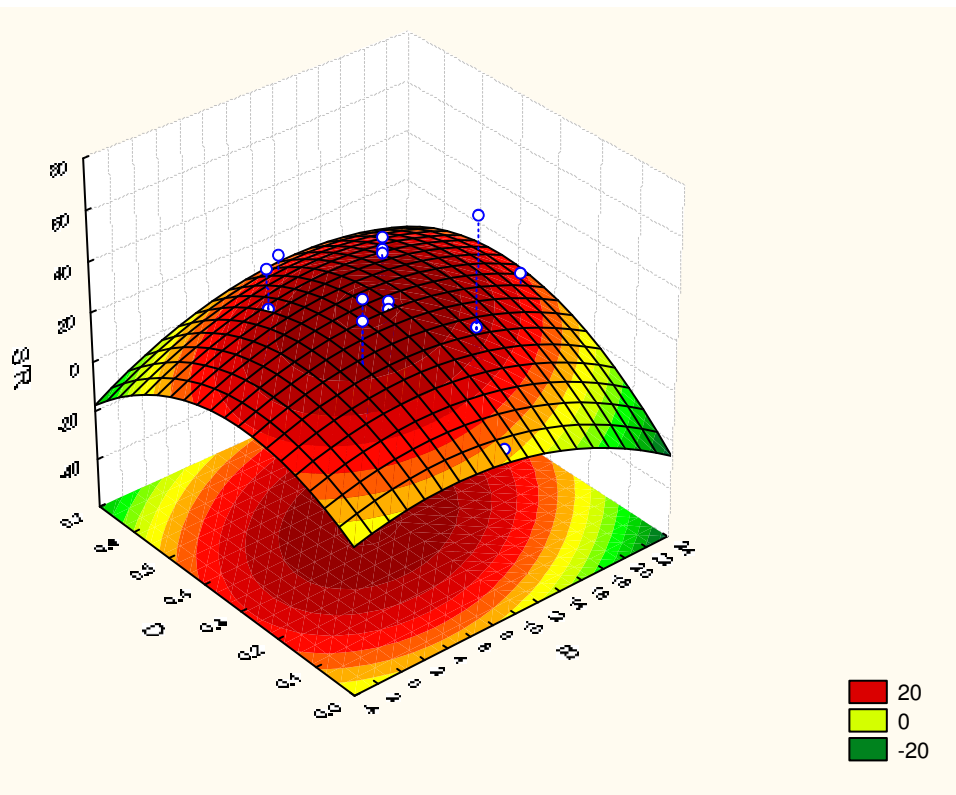


Figura 11. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da massa do modificador (B) e do fator de diluição da amostra (D); A, C e E fixos no valor crítico.

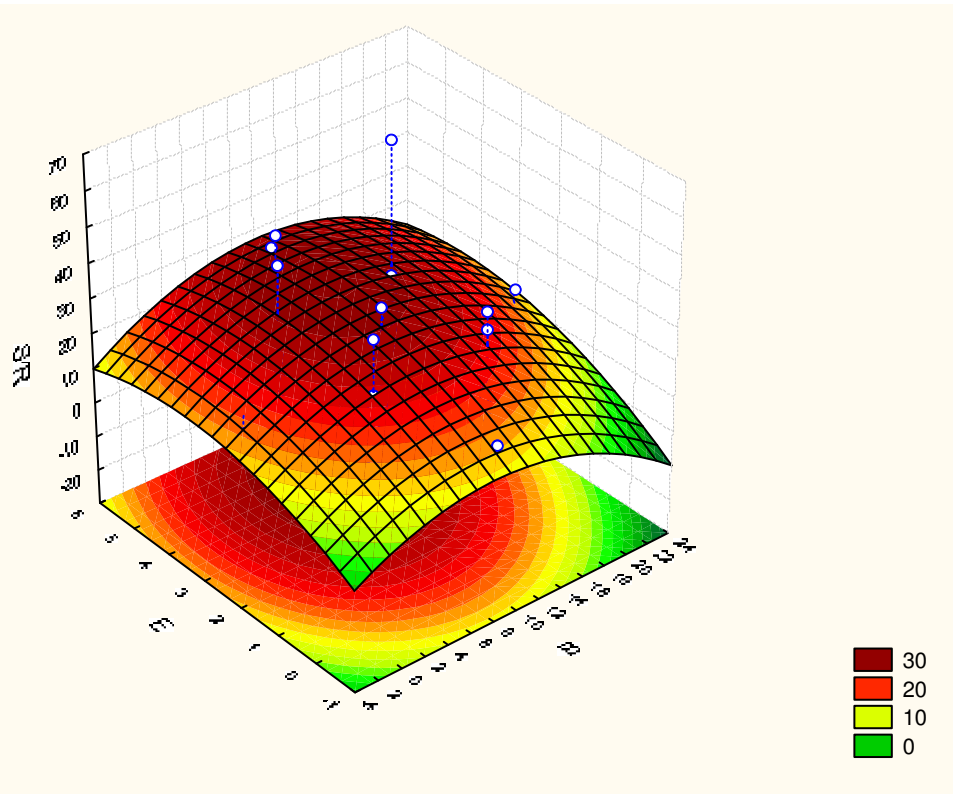


Figura 12. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função da massa do modificador (B) e da concentração de HNO_3 (E); A, C e D fixos no valor crítico.

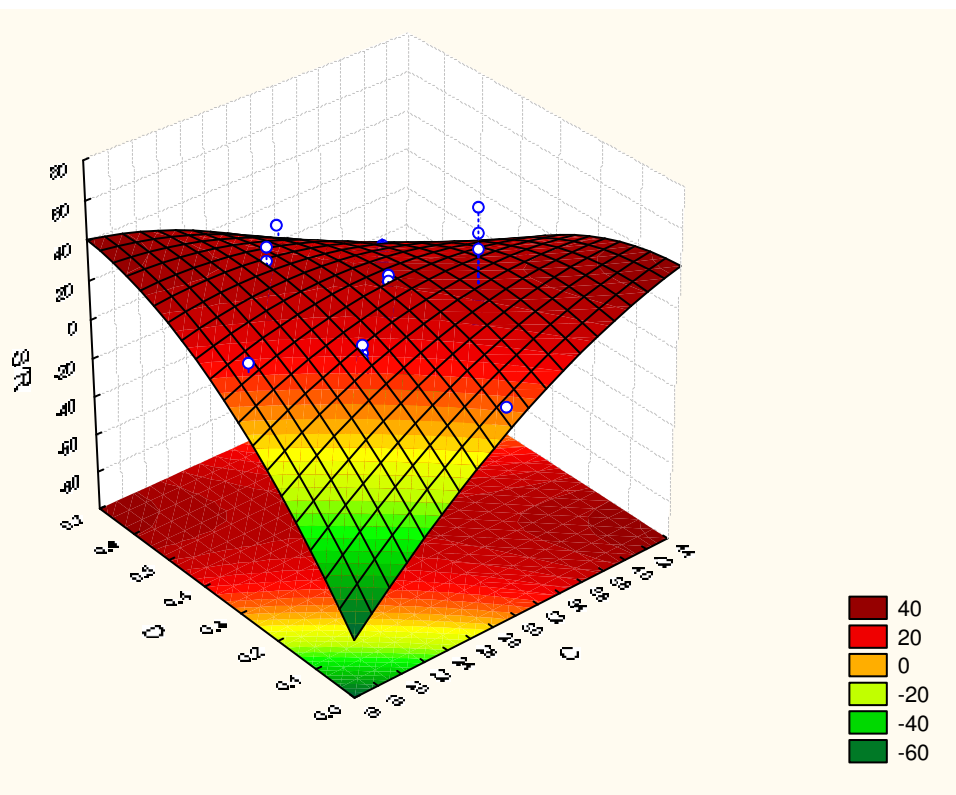


Figura 13. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função do volume de amostra (C) e do fator de diluição da amostra (D); A, C e E fixos no valor crítico.

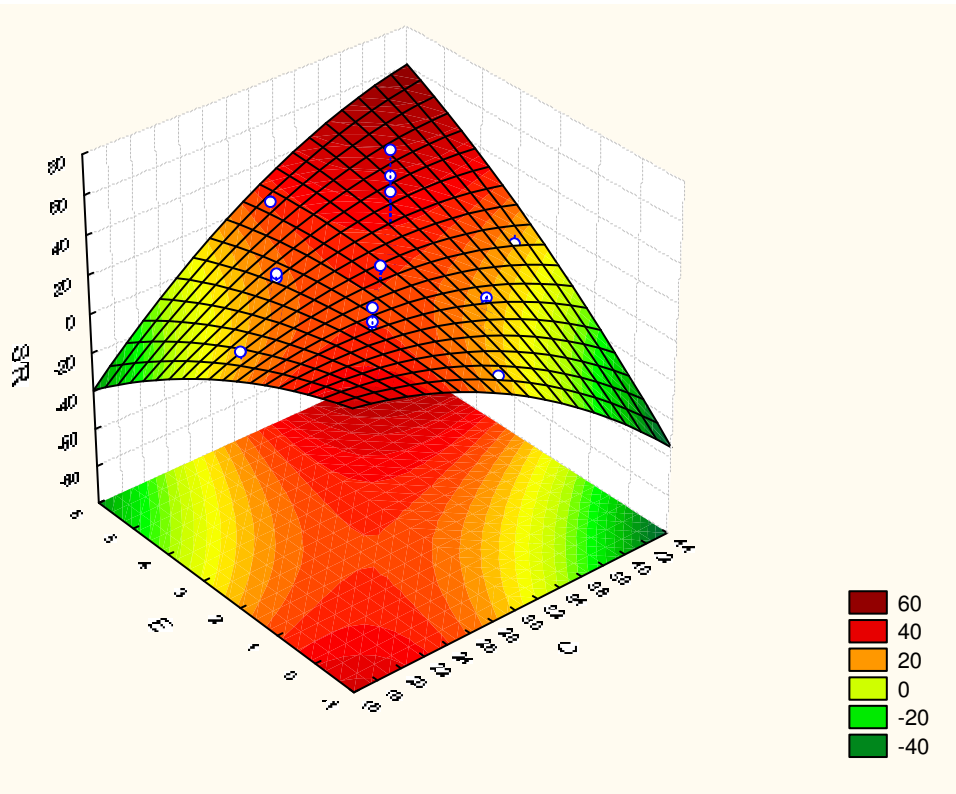


Figura 14. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função do volume da amostra (C) e da concentração de HNO₃ (E); A, B e D fixos no valor crítico.

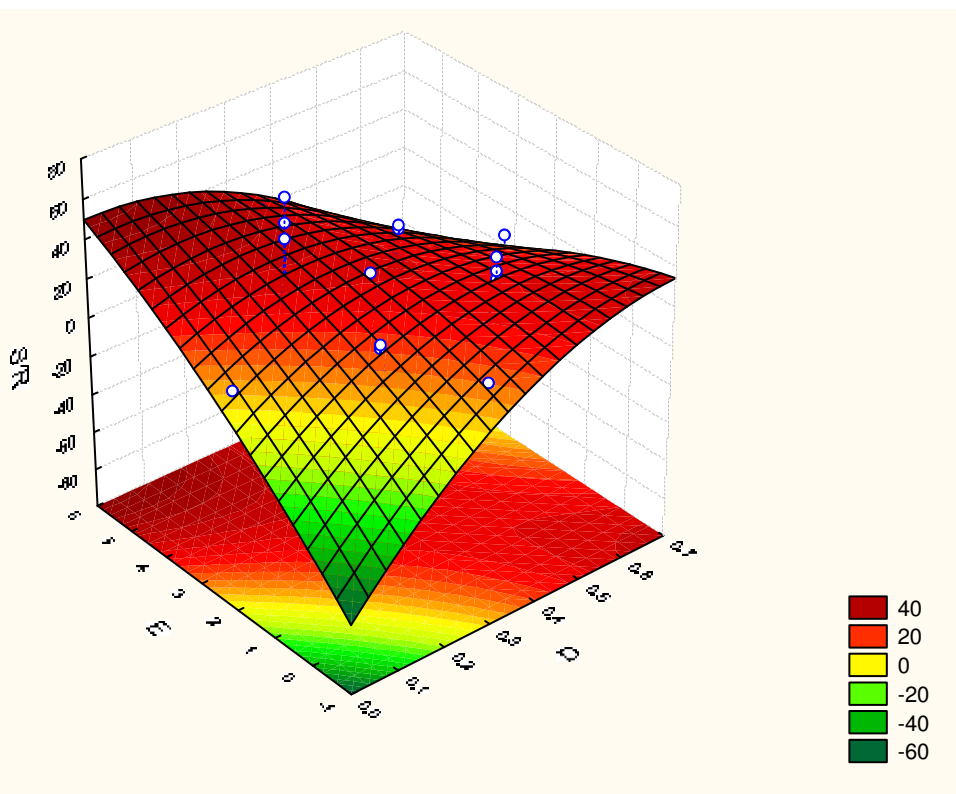


Figura 15. Superfície de resposta: relação sinal/ruído em função do fator de diluição da amostra (D) e da concentração de HNO₃ (E); A, B e C fixos no valor crítico.

Avaliando os gráficos com as superfícies de resposta tridimensional, gerados a partir do modelo desenvolvido, verificamos que os valores críticos estão dentro das faixas utilizadas no estudo, conforme da tabela 7.

Tabela 7. Faixa de valores testados e os valores críticos.

	Valores mínimos testados	Valores críticos	Valores máximos testados
Temperatura de pirólise (A)	952,6982	1234,910	1547,302
Massa de modificador (B)	-1,8921	9,010	21,892
Volume de amostra (C)	18,1079	29,064	41,892
Fator de diluição da amostra(D)	0,0360	0,386	0,631
Concentração de HNO ₃ (E)	-0,4730	2,573	5,473

Na tabela 7 observa-se que os intervalos testados contêm todos os valores ótimos, o que está de acordo com os resultados encontrados, uma vez que as variáveis estudadas não apresentaram influência significativa na resposta. Não faria sentido investigar faixas maiores da temperatura de atomização, pois a experiência prévia com elementos refratários no forno de grafite já indica que estes valores devem ser altos. Por outro lado, os outros fatores, também tendem a ter menor influência, exatamente pelas altas temperaturas de pirólise e atomização.

A tabela 8 contém a condição final otimizada

Tabela 8. Procedimento e programa de temperatura ao final da otimização.

	Temperatura (C°)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão do gás (mL/min)
Secagem	110	1	30	250
Secagem	130	15	30	250
Pirólise	1250	10	20	250
Atomização	2500	0	7	0
Limpeza	2550	1	4	250
Volume de injeção da amostra 30 microlitros				
Diluição da amostra: 1 parte de soro com 2 partes de HNO ₃ 2,5% (v/v)				
Volume de injeção de modificador 10 microlitros				
Massa do modificador (5 partes Pd + 3 partes Mg): 9 µg/10µL				

As condições otimizadas constantes na tabela 8 foram utilizadas para o início da validação da técnica. Estas condições, principalmente no que se refere à temperatura de atomização e limpeza do forno, constituem valores próximos aos limites operacionais do equipamento utilizado.