3. Resultados e Discussão

3.1 Estratégia metodológica

Duas diferentes técnicas analíticas foram investigadas, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), visando procedimentos capazes de determinar com a maior precisão e exatidão possíveis a razão Ca/P em hidroxiapatita.

Na técnica HR-CS AAS, o cálcio foi determinado utilizando-se sua linha atômica (λ = 422,673 nm), já o fósforo foi determinado utilizando-se a banda de PO (λ = 324,62 nm). Os parâmetros instrumentais investigados e otimizados, inicialmente, foram a vazão de acetileno, a altura do queimador e a taxa de aspiração; subsequentemente, foram otimizados o número de pixels e o tempo de integração.

O cálcio e o fósforo foram medidos em chama óxido nitroso-acetileno e dos parâmetros mencionados acima, a vazão de acetileno não foi otimizada para o fósforo, uma vez que foi obrigatório se trabalhar com a menor vazão possível permitida pelo aparelho (170 L h⁻¹). Já na técnica de ICP OES, o fósforo foi determinado utilizando-se sua linha atômica (λ = 213,617 nm) e os parâmetros otimizados foram a potência da radiofrequência, a taxa de aspiração e a vazão do gás de nebulização. Nas duas técnicas analíticas investigadas, as otimizações foram realizadas buscando-se como resposta a melhor razão sinal/ruído. Os intervalos investigados nas otimizações foram determinados variando-se, inicialmente, de modo univariado os parâmetros de interesse. Os pontos centrais foram os valores que levaram à maior sensibilidade. A partir daí, investigaram-se suas vizinhanças, de modo multivariado, tomando-se como resposta a razão sinal/ruído (S/R).

Para análise dos sistemas investigados, foram montados planejamentos fatoriais do tipo composto central e do tipo Box-Behnken para a otimização da determinação de cálcio e fósforo por HR-CS AAS e ICP OES, respectivamente.

Para cada conjunto de dados, com o auxilio do software Statistica 7.0, foram avaliados modelos sem interação, com interação linear e com interações

lineares e quadráticas. A escolha do melhor modelo foi feita pelo coeficiente de determinação, (R²), que é uma medida da qualidade do modelo em relação à sua capacidade de estimar corretamente os valores da variável resposta. Seu valor situa-se no intervalo de 0 a 1 e, quanto maior, mais explicativo é o modelo [56].

Após definido o melhor modelo, o próximo passo foi encontrar os valores das variáveis experimentais que maximizam a razão sinal/ruído. Essa avaliação foi feita através da função de desejabilidade presente no Programa Statistica 7.0 e proposta por Derringer e R. Suich em 1980, que é uma técnica de otimização simultânea que consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas, ou no mínimo as mantenha em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-linear. Inicialmente, essa função converte cada resposta y_i em uma função individual de desejabilidade d_i que varia de $0 \le d_i \le 1$. Se a resposta for o valor mais desejável, d_i =1, caso contrário, d_i =0 e a resposta está fora da região aceitável [57]. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global, que normalmente é dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais, conforme mostra a equação 1:

D=
$$(d_1.d_2...d_m)^{1/m}$$
 (eq. 1)

3.2 Determinação da razão Ca/P por HR-CS AAS

3.2.1 Otimização da determinação de cálcio em chama C₂H₂-N₂O por HR-CS AAS

No presente trabalho foram utilizadas algumas recomendações importantes fornecidas pelo manual do equipamento para a determinação de cálcio por HR-CS AAS, tais como:

Linha atômica (nm): 422,6728
Tipo de chama: C₂H₂-N₂O

Supressor de ionização: KCI / CsCl 1% (m/v)

Embora possível em alguns casos, evitou-se a chama ar-acetileno, devido à menor sensibilidade observada, certamente por uma atomização menos completa. Na chama mais quente, a presença do KCI é necessária para evitar os efeitos de ionização.

Os parâmetros e seus respectivos intervalos de valores investigados na otimização da determinação de cálcio por HR-CS AAS são mostrados na tabela

3. Os intervalos escolhidos para os estudos da 1ª etapa da otimização foram baseados em sugestões do manual do equipamento, o qual sugere, para a determinação de cálcio, o valor de 215 L h⁻¹ de vazão de acetileno e o intervalo de 5-7 mm para a altura do queimador. Já o intervalo selecionado para a taxa de aspiração foi definido a partir da sua otimização univariada, ajustando-se, manualmente, o nebulizador, de modo a conseguir o maior sinal, sendo que o intervalo escolhido conteve este valor. No que diz respeito à segunda etapa de otimização, os valores foram definidos arbitrariamente, a partir de nossa experiência prévia com o equipamento.

A taxa de aspiração, a vazão de acetileno e a altura do queimador são parâmetros importantes, pois quando se altera a taxa de aspiração, as razões entre o combustível e o oxidante são modificadas, modificando-se, assim, também, o perfil de temperatura da chama. Daí, a necessidade de uma otimização multivariada.

Tabela 3 – Parâmetros e intervalos investigados na otimização da determinação de cálcio em hidroxiapatita por HR-CS AAS

Parâmetros	Intervalos investigados				
1ª etapa da otimização					
Taxa de aspiração (mL min ⁻¹)	5,6 - 12,4				
Vazão de acetileno (L h ⁻¹)	195 – 265				
Altura do queimador (mm)	4 – 8				
2ª etapa da otimização					
Número de pixels	2,2 – 9,0				
Tempo de integração (s)	0,6 - 3,4				

Definidos os parâmetros a serem estudados e seus intervalos, foi realizado um planejamento composto central 2³, com seis pontos axiais e um ponto central em triplicata, totalizando 17 experimentos (2³+(2x3)+3=17) na primeira etapa de otimização. Em toda esta etapa, utilizou-se sempre uma solução aquosa 0,8 mg L⁻¹ de cálcio, uma situação não distante daquela verificada para a determinação de cálcio na amostra, dada a alta diluição a que está submetida no presente caso. As medições foram realizadas de uma maneira aleatória, utilizando-se 7 pixels e fixando-se 3 s como tempo de integração. O apêndice 7.1 mostra os resultados dos parâmetros devidamente codificados encontrados no experimento, os quais foram obtidos de modo aleatório, em triplicata e não na ordem apresentada. Para isso, foi utilizada a

notação "-1 e +1" para representar os níveis baixo e alto dos fatores, respectivamente. Já a notação "0" foi empregada para as réplicas no ponto central e os valores de "-1,68 e +1,68" para os pontos axiais.

Os resultados obtidos apresentados no apêndice 7.1 foram submetidos ao tratamento estatístico aplicando o Planejamento Composto Central (CCD), obtendo-se diversas tabelas e gráficos, sendo os mais importantes, para este caso, apresentados a seguir. A tabela 4 apresenta a estimativa dos efeitos principais individuais e de interação e os coeficientes para esse experimento, destacando-se em vermelho, os efeitos que são estatisticamente significantes, com 95% de confiança, ou seja, quando p<0,05, os efeitos ou interações são significativos, sendo os demais sem importância estatística.

Tabela 4 – Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento composto central 2³

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(41)	р	-95,%	+95,%	Coef.	Desvio padrão	-95,%	+95,%
Média/Interação	77,9389	3,967603	19,6438	0,000000	69,9261	85,9516	77,9389	3,967603	69,9261	85,9516
(1)Taxa de aspiração(L)	-53,5293	3,728620	-14,3563	0,000000	-61,0594	-45,9992	-26,7647	1,864310	-30,5297	-22,9996
Taxa de aspiração(Q)	13,8162	4,107736	3,3635	0,001678	5,5205	22,1120	6,9081	2,053868	2,7602	11,0560
(2)Vazão de acetileno(L)	-10,5918	3,728620	-2,8407	0,006979	-18,1219	-3,0617	-5,2959	1,864310	-9,0609	-1,5308
Vazão de acetileno(Q)	-31,6068	4,107736	-7,6945	0,000000	-39,9026	-23,3111	-15,8034	2,053868	-19,9513	-11,6555
(3)Altura do queimador(L)	-1,3459	3,728620	-0,3610	0,719971	-8,8760	6,1842	-0,6730	1,864310	-4,4380	3,0921
Altura do queimador(Q)	-29,5019	4,107736	-7,1820	0,000000	-37,7976	-21,2061	-14,7509	2,053868	-18,8988	-10,6031
1L e 2L	6,6139	4,869526	1,3582	0,181819	-3,2203	16,4481	3,3070	2,434763	-1,6101	8,2241
1L e 3L	6,4412	4,869526	1,3228	0,193248	-3,3930	16,2754	3,2206	2,434763	-1,6965	8,1377
2L e 3L	24,6023	4,869526	5,0523	0,000009	14,7681	34,4365	12,3011	2,434763	7,3840	17,2182

Outra forma de visualizar quais parâmetros e interações são estatisticamente significativos (p<0,05), é pela análise de variância (ANOVA), representada na tabela 5. Os testes são realizados com a estatística F e é o método mais usado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo.

Tabela 5 – ANOVA para o planejamento composto central 2³

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	Р
(1)Taxa de aspiração(L)	29323,25	1	29323,25	206,104 5	0,000000
Taxa de aspiração(Q)	1609,53	1	1609,53	11,3129	0,001678
(2)Vazão de acetileno(L)	1148,06	1	1148,06	8,0694	0,006979
Vazão de acetileno(Q)	8423,28	1	8423,28	59,2047	0,000000
(3)Altura do queimador(L)	18,54	1	18,54	0,1303	0,719971
Altura do queimador(Q)	7338,69	1	7338,69	51,5815	0,000000
1L e 2L	262,46	1	262,46	1,8448	0,181819
1L e 3L	248,93	1	248,93	1,7497	0,193248
2L e 3L	3631,63	1	3631,63	25,5256	0,000009
Erro	5833,22	41	142,27		
Total da soma quadrática	60132,29	50			

O parâmetro altura do queimador (linear), bem como sua interação com a taxa de aspiração (linear) e vazão de acetileno (linear) não se mostraram estatisticamente significativos, corroborando o observado na tabela 4.

As curvas de nível geradas a partir do modelo ajustado são mostradas na figura 3.

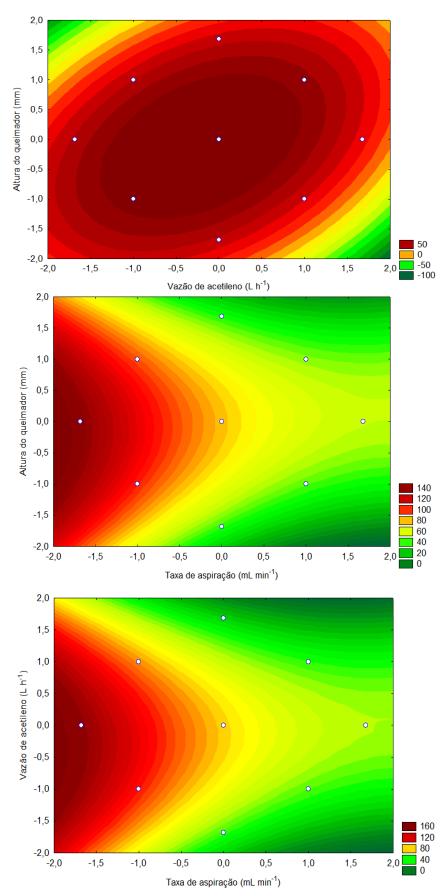


Figura 3 - Curvas de nível da razão sinal/ruído para a 1ª etapa da otimização da determinação de cálcio em hidroxiapatita

Através da análise das curvas de nível (Fig. 3), ficou evidente que o modelo desenvolvido é não-linear, com isso, buscou-se uma técnica que se adaptasse a essas condições de otimização, sendo utilizada a função de desejabilidade do programa Statistica 7.0, que permite obter os valores ótimos dos parâmetros investigados. A figura 4 mostra o gráfico dos perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e os valores otimizados dos três parâmetros experimentais escolhidos.

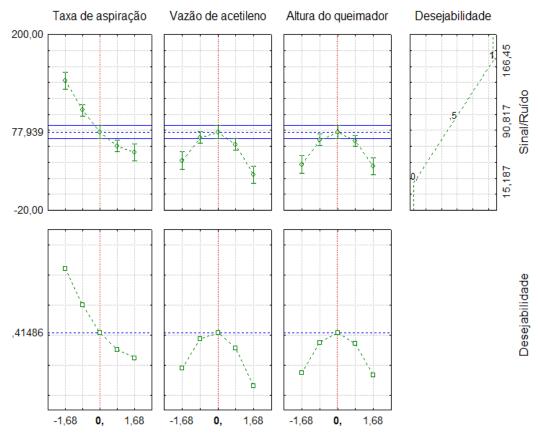


Figura 4 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento composto central

Observando a figura 4, verifica-se que os três primeiros perfis são relativos à variação da razão sinal/ruído com cada fator, mantendo fixos os outros no valor crítico. O quarto perfil mostra a desejabilidade da razão sinal/ruído, ou seja, a faixa da resposta de desejabilidade aceitável (0 \leq d_i \leq 1). Quanto maior o valor de D, mais conveniente é a resposta do sistema, ou seja, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo de D é a condição otimizada do sistema. Os três últimos perfis mostram a desejabilidade individual para cada fator e a desejabilidade global igual a 0,41486. As linhas verticais em vermelho presentes nos gráficos correspondem aos valores ótimos dos parâmetros

estudados e estão localizados, exatamente, nos pontos centrais. Não foi possível alcançar um ponto de máximo na taxa de aspiração, contudo os parâmetros não podem ser analisados de forma univariada, procurou-se, portanto um "ponto" de compromisso, onde todos os parâmetros investigados obtivessem, de forma multivariada e no intervalo estudado, a melhor razão sinal/ruído (nesse caso, igual a 77,939). Os valores ótimos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros investigados e seus respectivos valores otimizados

Parâmetros	Valores otimizados
Taxa de aspiração (mL min ⁻¹)	9
Vazão de acetileno (L h ⁻¹)	230
Altura do queimador (mm)	6

Depois de encontradas as melhores condições para estes parâmetros, o próximo passo foi verificar a influência dos parâmetros número de pixels e tempo de integração na resposta. Pela escolha do número de pixels, é possível aumentar ou diminuir a sensibilidade e a faixa dinâmica. Já o tempo de integração age no desvio padrão das medidas. Nesta segunda etapa de otimização, foi realizado um planejamento composto central 2², com pontos axiais e um ponto central em triplicata, gerando um total de 11 experimentos. Empregou-se esse planejamento a fim de verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão. O apêndice 7.2 mostra os resultados dos parâmetros codificados encontrados no experimento, as tabelas 7 e 8 mostram a estimativa dos efeitos e interações do planejamento escolhido e o teste estatístico ANOVA para o modelo ajustado, respectivamente.

Tabela 7 – Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento composto central 2²

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(27)	р	-95,%	+95,%	Coef.	Desvio Padrão	-95,%	+95,%
Média/Interação	91,2432	13,19536	6,91479	0,000000	64,169	118,3179	91,2432	13,19536	64,1686	118,3179
(1)Tempo (L)	-2,7916	16,61643	-0,16800	0,867832	-36,886	31,3025	-1,3958	8,30821	-18,4429	15,6512
Tempo (Q)	-70,4384	20,82770	-3,38196	0,002210	-113,173	-27,7035	-35,2192	10,41385	-56,5867	-13,8518
(2)Pixel (L)	-15,4758	13,49925	-1,14642	0,261680	-43,174	12,2224	-7,7379	6,74963	-21,5870	6,1112
Pixel (Q)	-21,2222	10,64185	-1,99422	0,056317	-43,057	0,6131	-10,6111	5,32092	-21,5287	0,3066
1L e 2L	3,8333	23,38139	0,16395	0,870993	-44,141	51,8080	1,9167	11,69069	-22,0707	25,9040

Tabela 8 – ANOVA para o planejamento composto central 2²

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	р
(1)Tempo (L)	46,29	1	46,29	0,02823	0,867832
Tempo (Q)	18758,51	1	18758,51	11,43764	0,002210
(2)Pixel (L)	2155,51	1	2155,51	1,31428	0,261680
Pixel (Q)	6522,40	1	6522,40	3,97691	0,056317
1L e 2L	44,08	1	44,08	0,02688	0,870993
Erro	44281,84	27	1640,07		
Total da soma quadrática	66117,49	32			

A tabela dos efeitos, juntamente com a ANOVA, mostrou que apenas o parâmetro tempo de integração teve seu efeito quadrático significativo, para um nível de significância de 0,05. O número de pixels não mostrou nenhum efeito significativo na resposta para os termos lineares e quadráticos.

A análise dos valores ótimos para os parâmetros investigados foram realizadas pela metodologia de otimização simultânea, empregando-se a função de desejabilidade.

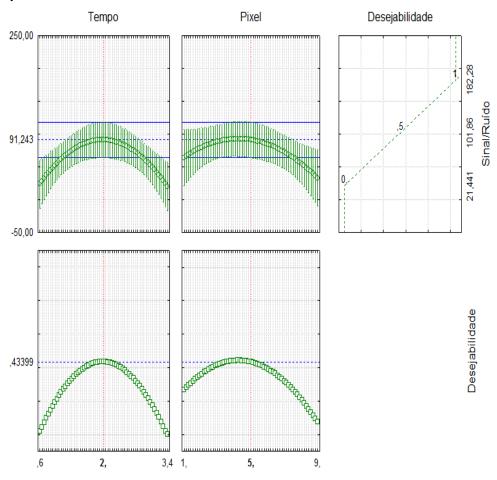


Figura 5 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento composto central

De acordo com a figura 5, o número de pixels igual a 4,3 e tempo de integração igual a 1,97 s foram apontados pela função de desejabilidade como os que fornecem melhor razão sinal/ruído (nesse caso, igual a 91,243) e a desejabilidade global igual a 0,43399. Já a figura 6 mostra o gráfico de superfície da função de desejabilidade e as combinações das duas variáveis experimentais investigadas. Observa-se que foi alcançado um ponto de máximo, representado pela região em vermelho, correspondente aos valores ótimos para D, o que corrobora os valores obtidos na Fig. 5.

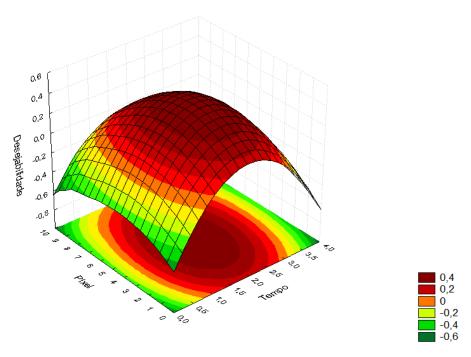


Figura 6 – Superfície de resposta da função desejabilidade global (D)

3.2.2 Otimização da determinação de fósforo utilizando a banda molecular PO e chama C₂H₂-N₂O por HR-CS AAS

A determinação de fósforo por meio da avaliação de bandas moleculares de PO em chama ar-acetileno é descrita na literatura como sendo um método analítico seguro, rápido e fácil. Nesta chama, a espécie PO é produzida por decomposição térmica do íon fosfato livre (PO₄³⁻). Alguns autores [58] sugerem a adição de cloreto de titânio como uma das formas de eliminar a interferência causada pelo cálcio na determinação de fósforo utilizando a banda de PO. O titânio forma com o cálcio o CaTiO₃ (Pf: 1975 °C), mais estável na chama do que Ca₃(PO₄)₂ (Pf: 1670 °C). O PO apresenta quatro bandas, localizadas em 246,40 nm, 247,78 nm, 324,62 nm e 327,04 nm, respectivamente.

A literatura [46,59] recomenda o comprimento de onda de 324,62 nm para a determinação de fósforo utilizando a banda de PO e chama ar-acetileno, uma vez que a estrutura das bandas de PO entre 200 e 265 nm é muito complexa, enquanto que ao redor de 325 nm os picos de banda são relativamente simples, proeminentes e bem separados. O seu uso deve ser evitado caso a solução da amostra contenha altas concentrações de cobre, pois a linha ressonante desse elemento, em 324,754 nm, causa uma grave interferência espectral.

No presente trabalho, foi selecionado o comprimento de onda de 324,62 nm, por não apresentar riscos de interferências, uma vez que a composição da amostra já é bem conhecida. A chama escolhida foi a C_2H_2 - N_2O , já que não foi possível localizar a linha de 324,62 nm quando do uso da chama ar-acetileno, nas concentrações em questão. É possível que, na ausência de titânio, e com quantidades estequiométricas de cálcio, seja necessária uma chama mais quente mesmo para alcançar a formação da molécula de PO. A figura 7 mostra o espectro observado da espécie química PO em chama C_2H_2 - N_2O .

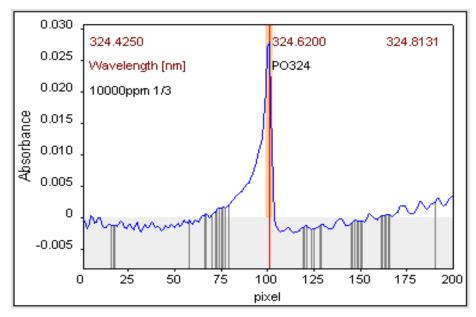


Figura 7 – Espectro da molécula de PO

Os parâmetros escolhidos para a 1ª etapa da otimização na determinação de fósforo utilizando a banda PO por HR-CS AAS foram a taxa de aspiração e a altura do queimador, sendo o intervalo escolhido para a taxa de aspiração baseado na mesma estratégia já descrita para o cálcio. A vazão de acetileno foi mantida fixa em 170 L h⁻¹, uma vez que uma linha de base excessivamente alta era observada acima deste valor. Na segunda etapa, foram otimizados o número de pixels e o tempo de integração e os valores foram definidos de forma arbitrária. Os intervalos estudados são mostrados na tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros e valores investigados na determinação de fósforo (PO) em hidroxiapatita por HR-CS AAS

Parâmetros	Valores investigados				
1ª etapa da otimização					
Taxa de aspiração (mL min ⁻¹)	5; 6; 7				
Altura do queimador (mm)	5; 6; 7				
2ª etapa da otimização					
Número de pixels	3; 5; 7				
Tempo de integração (s)	3; 4; 5				

Definidos os parâmetros a serem estudados, foi realizado um planejamento fatorial 3² (Planejamento Box-Behnken) que permite investigar todas as possíveis combinações para os níveis de um fator e verificar os efeitos principais e de interação entre os fatores sobre a variável resposta (sinal/ruído). Cada fator foi avaliado em três níveis, gerando um total de 9 experimentos, os quais foram realizados considerando 5 réplicas de cada ensaio. Em toda etapa de otimização, utilizou-se sempre uma solução aquosa com 10000 mg L-1 de fósforo, esta solução tem uma composição muito próxima da amostra a ser analisada. A matriz de planejamento foi construída fazendo todas as combinações entre os níveis dos dois fatores, seguindo o modelo recomendado por Box-Behnken - 3^(K-p) e os resultados encontrados no experimento podem ser visualizados no apêndice 7.3.

Com dados contidos no apêndice 7.3, realizou-se um tratamento estatístico, empregando-se a Análise e Planejamento de Experimentos do Programa Statistica 7.0, baseado no planejamento padrão Box-Behnken, já citado anteriormente e os resultados da análise estão expressos nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10- Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial 3²

Efeito	Desvio Padrão	t(39)	р	-95,%	+95,%	Coef.	Desvio Padrão	-95,%	+95,%
52,6604	2,228391	23,63159	0,000000	48,1531	57,1678	52,6604	2,228391	48,1531	57,1678
1,5174	5,458421	0,27799	0,782487	-9,5233	12,5581	0,7587	2,729211	-4,7616	6,2790
21,7108	4,727131	4,59281	0,000045	12,1493	31,2723	10,8554	2,363566	6,0746	15,6362
-35,7180	5,458421	-6,54365	0,000000	-46,7587	-24,6773	-17,8590	2,729211	-23,3793	-12,3386
-14,5132	4,727131	-3,07020	0,003884	-24,0748	-4,9517	-7,2566	2,363566	-12,0374	-2,4759
-40,8261	6,685173	-6,10696	0,000000	-54,3481	-27,3040	-20,4130	3,342587	-27,1740	-13,6520
	52,6604 1,5174 21,7108 -35,7180 -14,5132	52,6604 2,228391 1,5174 5,458421 21,7108 4,727131 -35,7180 5,458421 -14,5132 4,727131	52,6604 2,228391 23,63159 1,5174 5,458421 0,27799 21,7108 4,727131 4,59281 -35,7180 5,458421 -6,54365 -14,5132 4,727131 -3,07020	52,6604 2,228391 23,63159 0,000000 1,5174 5,458421 0,27799 0,782487 21,7108 4,727131 4,59281 0,0000045 -35,7180 5,458421 -6,54365 0,000000 -14,5132 4,727131 -3,07020 0,003884	52,6604 2,228391 23,63159 0,000000 48,1531 1,5174 5,458421 0,27799 0,782487 -9,5233 21,7108 4,727131 4,59281 0,0000045 12,1493 -35,7180 5,458421 -6,54365 0,000000 -46,7587 -14,5132 4,727131 -3,07020 0,003884 -24,0748	52,6604 2,228391 23,63159 0,000000 48,1531 57,1678 1,5174 5,458421 0,27799 0,782487 -9,5233 12,5581 21,7108 4,727131 4,59281 0,0000045 12,1493 31,2723 -35,7180 5,458421 -6,54365 0,000000 -46,7587 -24,6773 -14,5132 4,727131 -3,07020 0,003884 -24,0748 -4,9517	52,6604 2,228391 23,63159 0,000000 48,1531 57,1678 52,6604 1,5174 5,458421 0,27799 0,782487 -9,5233 12,5581 0,7587 21,7108 4,727131 4,59281 0,0000045 12,1493 31,2723 10,8554 -35,7180 5,458421 -6,54365 0,000000 -46,7587 -24,6773 -17,8590 -14,5132 4,727131 -3,07020 0,003884 -24,0748 -4,9517 -7,2566	52,6604 2,228391 23,63159 0,000000 48,1531 57,1678 52,6604 2,228391 1,5174 5,458421 0,27799 0,782487 -9,5233 12,5581 0,7587 2,729211 21,7108 4,727131 4,59281 0,0000045 12,1493 31,2723 10,8554 2,363566 -35,7180 5,458421 -6,54365 0,000000 -46,7587 -24,6773 -17,8590 2,729211 -14,5132 4,727131 -3,07020 0,003884 -24,0748 -4,9517 -7,2566 2,363566	52,6604 2,228391 23,63159 0,000000 48,1531 57,1678 52,6604 2,228391 48,1531 1,5174 5,458421 0,27799 0,782487 -9,5233 12,5581 0,7587 2,729211 -4,7616 21,7108 4,727131 4,59281 0,000045 12,1493 31,2723 10,8554 2,363566 6,0746 -35,7180 5,458421 -6,54365 0,000000 -46,7587 -24,6773 -17,8590 2,729211 -23,3793 -14,5132 4,727131 -3,07020 0,003884 -24,0748 -4,9517 -7,2566 2,363566 -12,0374

Tabela 11 - ANOVA para o planejamento fatorial 3²

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	р
(1)Taxa de aspiração L+Q	4730,86	2	2365,429	10,58558	0,000213
(2)Altura do queimador L+Q	11674,65	2	5837,324	26,12272	0,000000
1*2	8333,83	1	8333,835	37,29491	0,000000
Erro	8714,85	39	223,458		
Total da soma quadrática	33454,19	44			

Por meio desta primeira rodada de experimentos, analisando a tabela da estimativa dos efeitos, bem como a tabela da ANOVA, verificou-se que os efeitos principais, taxa de aspiração e altura do queimador, são estatisticamente significativos no modelo quadrático avaliado, assim como a interação entre eles, não sendo significativa apenas a taxa de aspiração linear, constando que o modelo quadrático é o mais adequado para representar a variação desse parâmetro, dentro do intervalo estudado. Os resultados foram interpretados por meio da análise de probabilidade (p<0,05), com um nível de confiança de 95%.

A superfície de resposta para a taxa de aspiração e altura do queimador (com vazão de acetileno fixada em 170 L h⁻¹) e a curva de nível correspondente são mostradas na figura 8.

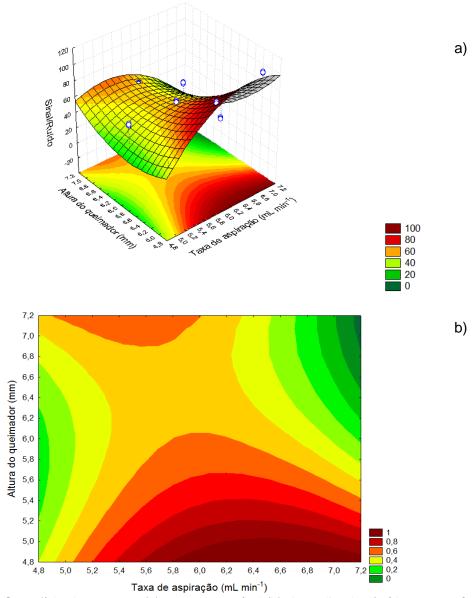


Figura 8 – Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) da razão sinal/ruído para a 1ª etapa da otimização da determinação de fósforo (PO) por HR-CS AAS com vazão de acetileno fixada em 170 L h-1

Analisando a figura 8, pode-se observar que a razão sinal/ruído apresenta um ponto de sela, sendo necessária a aplicação da função desejabilidade a fim de obter os valores ótimos para cada parâmetro investigado.

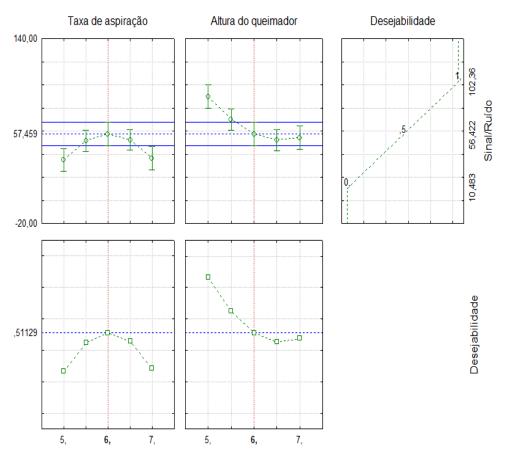


Figura 9 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da função de desejabilidade para o planejamento fatorial 3²

Observando a figura 9, verifica-se que a desejabilidade global de 0,51129 e a melhor razão sinal/ruído (nesse caso, igual a 57,459) é alcançada quando se emprega os valores ótimos de 5,8 mL min⁻¹ e 6,5 mm para os parâmetros taxa de aspiração e altura do queimador, respectivamente.

Na segunda etapa de otimização, foi investigada a influência do número de pixels e do tempo de integração, utilizando as condições ótimas dos parâmetros estudados na primeira etapa desta otimização. Para essa etapa, também foi utilizado um planejamento fatorial 3º (Planejamento Box-Behnken) com cinco réplicas para cada ensaio e os resultados encontrados no experimento encontra-se no apêndice 7.4.

As tabelas 12 e 13 mostram quais são os efeitos principais e as interações, em vermelho, do modelo ajustado que são significativos, com 95% de confiança.

Tabela 12 - Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial 3²

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(39)	р	-95,%	+95,%	Coef.	Desvio Padrão	-95,%	+95,%
Média/Interação.	23,23743	0,822623	28,24798	0,000000	21,5735	24,90134	23,23743	0,822623	21,57352	24,90134
(1)Pixel (L)	8,22570	2,015006	4,08222	0,000214	4,1500	12,30143	4,11285	1,007503	2,07498	6,15072
Pixel (Q)	-0,00107	1,745047	-0,00061	0,999516	-3,5308	3,52862	-0,00053	0,872523	-1,76538	1,76431
(2)Tempo (L)	-6,57031	2,015006	-3,26069	0,002311	-10,6460	-2,49457	-3,28515	1,007503	-5,32302	-1,24729
Tempo (Q)	-8,50048	1,745047	-4,87121	0,000019	-12,0302	-4,97079	-4,25024	0,872523	-6,01509	-2,48540
1L e 2L	-9,11889	2,467869	-3,69505	0,000673	-14,1106	-4,12715	-4,55944	1,233934	-7,05531	-2,06358

Tabela 13 - ANOVA para o planejamento fatorial 3²

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	р
(1)Pixel L+Q	507,466	2	253,7329	8,33226	0,000970
(2)Tempo L+Q	1046,349	2	523,1747	17,18038	0,000004
1*2	415,771	1	415,7707	13,65337	0,000673
Erro	1187,623	39	30,4519		
Total da soma quadrática	3157,209	44			

Através da tabela da estimativa dos efeitos, pode-se observar que somente o termo quadrático do número de pixels, não mostra significância estatística (p<0,05). Os demais parâmetros possuem significância estatística, pois apresentam p<0,05.

O gráfico de superfície de resposta para a razão sinal/ruído, em função do efeito dos parâmetros número de pixels e tempo de integração pode ser visualizado na figura 10.

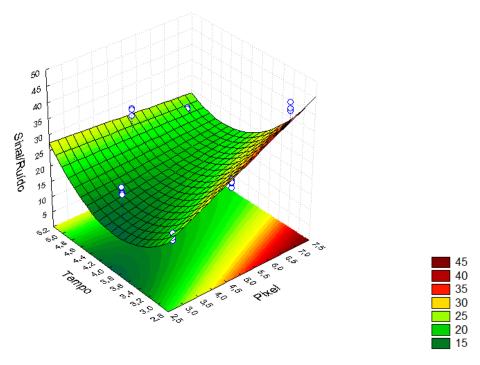


Figura 10 – Superfície de resposta da razão sinal/ruído para a 2ª etapa da otimização da determinação de fósforo (PO) por HR-CS AAS

Analisando a figura 10, observa-se que o número de pixels tende para valores maiores do que 7 (valor situado na região vermelha da figura). Embora a análise estatística direcione esse parâmetro para valores maiores, cabe esclarecer que em uma análise multivariada é desejável encontrar um compromisso ótimo, ou seja, tentar estabelecer uma melhor combinação dos parâmetros estudados, a fim de obter a resposta que melhor se aproxime do valor ideal. Essa condição pode ser alcançada utilizando-se a função de desejabilidade e os valores ótimos para cada parâmetro desse experimento encontram-se na figura 11.

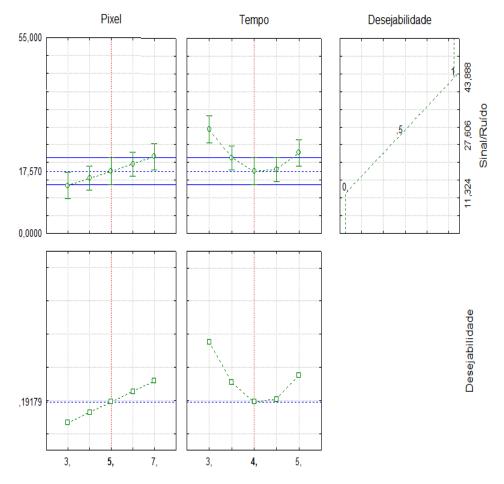


Figura 11 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento fatorial $\mathbf{3}^2$

A figura 11 mostra os valores ótimos (desejáveis) para os parâmetros avaliados nesse experimento, são eles: 4 s para tempo de integração e 5 para número de pixels, para um valor máximo de desejabilidade global de 0,19179 e razão sinal/ruído de 17,570.

3.3 Determinação da razão Ca/P por ICP OES

3.3.1 Otimização da determinação de cálcio por ICP OES (vista radial)

Na otimização dos parâmetros do ICP OES, inicialmente foi feita a escolha adequada do comprimento de onda, sendo escolhidos os mais sensíveis e os que não apresentaram sobreposição de linhas espectrais interferentes. Esses comprimentos de onda são recomendados pelo fabricante do espectrômetro, segundo o banco de dados disponível no *software* do equipamento. Assim, foram escolhidas as linhas analíticas atômicas em 422,673 nm para a determinação de cálcio e 213,617 nm para a determinação de fósforo.

A técnica de ICP OES permite uma determinação simultânea dos dois elementos e, normalmente, a configuração radial é a mais indicada, pois o ajuste adequado da potência da radiofrequência e da vazão do gás de nebulização define a posição de observação e permite eliminar ou minimizar o efeito negativo de emissões indesejáveis, que podem prejudicar a detecção do sinal analítico. Sabe-se que o fósforo é um elemento pouco sensível ao utilizar-se a vista radial, nesse caso optou-se por empregar a vista axial para esse analito, buscando encontrar as condições ótimas dos parâmetros avaliados que levassem à melhor razão sinal/ruído para os dois elementos, sem perda de sensibilidade para o cálcio, que foi determinado na configuração radial conforme mencionado acima.

Os parâmetros experimentais avaliados, bem como os intervalos empregados na otimização dos mesmos para a determinação de cálcio e fósforo no ICP OES, encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros experimentais e respectivos valores empregados na otimização do método para determinação do cálcio e fósforo em hidroxiapatita, por ICP OES empregando-se as configurações radial e axial, respectivamente

Parâmetros	Intervalos
Potência da radiofrequência (W)	1300; 1400; 1500
Taxa de aspiração (mL min ⁻¹)	1,0; 1,5; 2,0
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6; 0,8; 1,0

A otimização dos parâmetros experimentais foi realizada através de um planejamento fatorial 3³ (Planejamento Box-Behnken), sendo cada um dos fatores analisados em 3 níveis, de forma aleatória e em triplicata, totalizando 27

experimentos. Em toda esta etapa de otimização, utilizou-se uma solução aquosa com 10 mg L⁻¹ de cálcio e fósforo. O apêndice 7.5 mostra os resultados obtidos neste experimento, com os níveis dos parâmetros devidamente codificados e suas respectivas respostas (sinal/ruído) para o cálcio e fósforo.

Os resultados obtidos empregando-se os valores do apêndice 7.5 foram inseridos no programa *Statistica* 7.0, selecionando a opção Análise e Planejamento de Experimentos (modelo padrão Box-Behnken - 3^(K-p)), que permitiu avaliar as interações entre as variáveis estudadas e a sua influência sobre a resposta analítica de interesse. A tabela 15 fornece a estimativa dos efeitos e os coeficientes para o planejamento fatorial em questão.

Tabela 15 - Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial 3³

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t(21)	Р	-95,%	+95,%	Coef.	Desvio Padrão	-95,%	+95,%
Média/Interação	16,8148	0,505836	33,2416	0,000000	15,7629	17,86676	16,81481	0,505836	15,76287	17,86676
(1)Potência(L)	-5,4000	1,239041	-4,3582	0,000276	-7,9767	-2,82327	-2,70000	0,619520	-3,98836	-1,41164
Potência(Q)	-0,3556	1,073041	-0,3314	0,743662	-2,5871	1,87595	-0,17778	0,536520	-1,29353	0,93798
(2)Taxa (L)	37,7333	1,239041	30,4537	0,000000	35,1566	40,31006	18,86667	0,619520	17,57830	20,15503
Taxa (Q)	-11,9222	1,073041	-11,1107	0,000000	-14,1537	-9,69071	-5,96111	0,536520	-7,07687	-4,84536
1L e 2L	-6,7833	1,517509	-4,4700	0,000211	-9,9392	-3,62750	-3,39167	0,758754	-4,96958	-1,81375

Conforme se observa na tabela 15, os fatores que têm um *p* menor que 0,05 são estatisticamente significativos, no intervalo estudado, e a maioria influencia de maneira negativa no resultado do experimento. Como nenhuma das interações (linear e quadrática) foi significativa para a vazão do gás de nebulização, o *software* removeu automaticamente esse parâmetro e isso pode ser comprovado pelos gráficos das superfícies de resposta representados na figura 12.

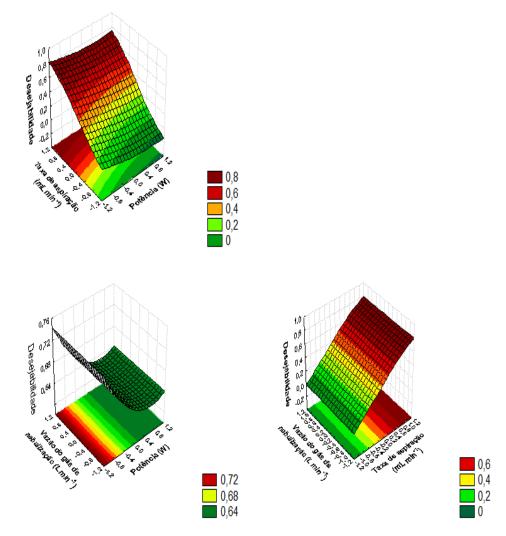


Figura 12 – Superfícies de resposta da razão sinal/ruído para a otimização do cálcio e fósforo por ICP OES

Essas superfícies de resposta foram geradas no Programa *Statistica* 7.0 utilizando-se a função de desejabilidade. Através dessa função foi possível encontrar os valores ótimos das variáveis independentes, que satisfizessem a variável dependente. Outra forma de visualizar os valores ótimos é através do gráfico dos perfis para os valores previstos e da desejabilidade, mostrado na figura 13.

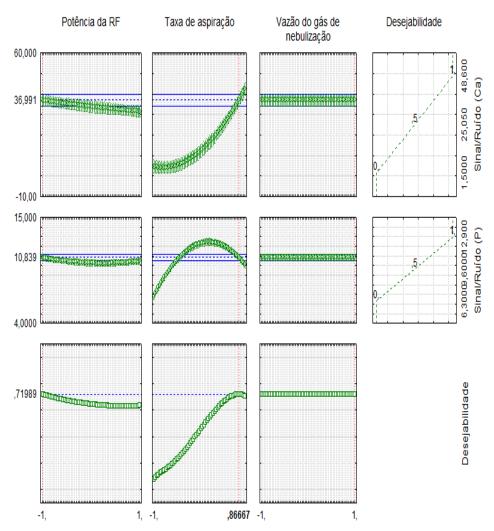


Figura 13 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento fatorial 3³

Com base nos gráficos mostrados, verifica-se que, no intervalo estudado, a desejabilidade global de 0,71989 que leva a melhor razão sinal/ruído (nesse caso igual a 36,991 para cálcio e 10,839 para fósforo, respectivamente) é obtida ao utilizar-se uma taxa de aspiração de 0,87 mL min⁻¹, associada à potência da radiofrequência de 1300 W.

Mais uma vez é difícil fazer uma análise univariada dos parâmetros analisados. Nesse caso, a estatística está direcionando para valores menores de potência e maiores de taxa de aspiração. No entanto, a redução da potência no modelo obtido tem um peso muito menor quando comparado ao aumento da taxa de aspiração (termo linear). Ao mesmo tempo, tem a contribuição do termo quadrático da taxa de aspiração que é negativo.

Pode-se aumentar a razão sinal/ruído, diminuindo-se a potência da RF e aumentando-se a taxa de aspiração. Observe que, ao mesmo tempo em que o termo linear aumenta, o termo quadrático diminui, sendo necessária uma análise multivariada dos parâmetros.

3.4 Determinação da razão Ca/P em uma amostra nas condições otimizadas

A primeira questão relativa à determinação exata da razão Ca/P diz respeito à determinação, também exata, de cada um dos elementos em questão, o que remete à questão da calibração. Nas condições ideais de determinação constantes na tabela 6, foi levantada a curva de calibração do cálcio, preparada a partir da diluição adequada de uma ampola Titrisol, e que se encontra mostrada na figura 14.

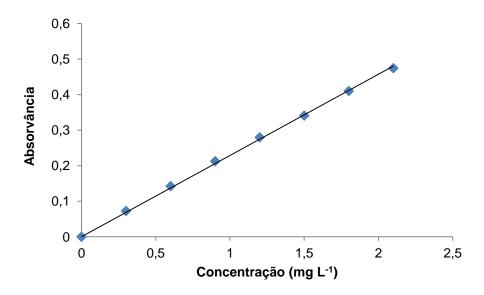


Figura 14 – Curva de calibração para cálcio por HR-CS AAS, preparada a partir da diluição de uma solução 1000 mg L^{-1} cálcio, A=0,2285 (±0,0012) C, R^2 =0,9996

No que diz respeito ao fósforo, utilizou-se apenas solução de calibração preparada a partir do sal Ca₃O₈P₂ (β-fosfato tricálcio ≥98%, Sigma Aldrich, número de referência 49963), tendo em vista a faixa dinâmica necessária, bem acima dos 1000 mg L⁻¹ da solução padrão obtida a partir da ampola Titrisol disponível. O sal seco foi devidamente pesado, dissolvido em HNO₃ 5% v/v e as soluções de calibração preparadas por diluições adequadas. A figura 15 mostra os resultados obtidos a partir da leitura do fósforo utilizando a banda molecular (PO) de 324,62 nm .

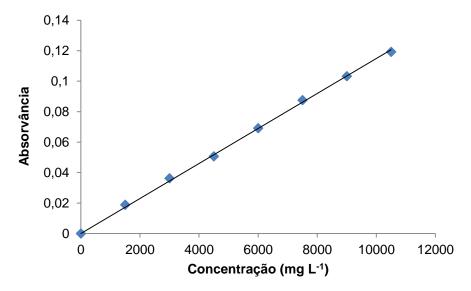


Figura 15 – Curva de calibração para o fósforo por HR-CS AAS utilizando sua banda molecular de 324,62 nm preparada a partir da dissolução do sal $Ca_3O_8P_2$, A= 1E-05 (±6,2E-08) C, R^2 =0,9994

Para fins de comparação, foram também levantadas curvas de calibração utilizando ICP OES, no modo axial, nas condições de 0,87 mL min⁻¹ para taxa de aspiração e 1300 W para potência da radiofrequência. As respectivas curvas estão mostradas nas figuras 16 e 17.

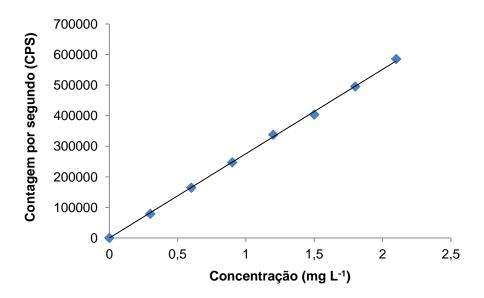


Figura 16 – Curva de calibração para o cálcio (vista axial) por ICP OES; I=275709 ($\pm 1541,7$) C; $R^2=0,9993$

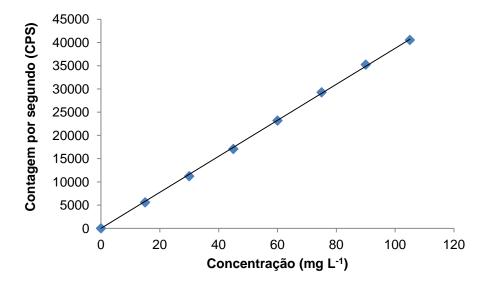


Figura 17 – Curva de calibração para o fósforo (vista axial) por ICP OES; $I=387,2 \ (\pm 1,59)$ C; $R^2=0,9999$

De posse dessas curvas, foram calculados limites instrumentais de detecção e quantificação para os diferentes procedimentos. O limite de detecção (LOD) é considerado a menor concentração do analito que pode ser detectado, calculado, segundo a definição da IUPAC, por 3 s/m, sendo s o desvio padrão calculado para 10 medidas do branco da amostra e m a inclinação da respectiva curva de calibração, e o limite de quantificação (LOQ) corresponde à mais baixa concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis, calculada como 10 s/m. A tabela 16 mostra os valores de LOD e LOQ para o cálcio e fósforo relativos aos diferentes procedimentos.

Tabela 16 – Valores (mg L⁻¹) dos limites de detecção e quantificação instrumentais para o cálcio e fósforo empregando-se as técnicas de HR-CSAAS e ICP OES (visão axial)

	С	a	Р	P (PO)	
Parâmetros	HR-CS AAS	ICP OES	ICP OES	HR-CS AAS	
LOD	5,89E-03	3,10E-04	2,61E-02	4,20E01	
LOQ	1,96E-02	1,03E-03	8,69E-02	1,40E02	

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência convencionalmente aceito como verdadeiro. Devido a não disponibilidade de material de referência certificado adequado, avaliou-se a exatidão dos métodos empregados pela análise de uma amostra de hidroxiapatita (Hap 237), anteriormente caracterizada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, sendo que lá foram utilizadas a espectrometria de absorção atômica com chama e a Fluorescência de raios-X, para cálcio e

fósforo, respectivamente. A tabela 17 mostra os resultados da razão Ca/P obtidos.

Tabela 17 – Razões Ca/P obtidas por diferentes métodos

Técnica	Ca/P	Referência	
HRCS AAS P(PO)	1,665 ± 0,075	Coto Trobolho	
ICP OES Ca e P (axial)	1,574 ± 0,066	Este Trabalho	
AAS Raios-X	1,658 ± 0,20	CBPF	