

5. Otimização experimental e instrumental visando determinar carbazol e dibenzotiofeno por fosforimetria em meio líquido

5.1. Estudos Preliminares

O desenvolvimento da metodologia analítica espectrofotométrica para a determinação do carbazol (CBZ) e do dibenzotiofeno (DBT) em amostras orgânicas líquidas, na temperatura ambiente, usando microemulsões sem detergente começou com a avaliação das propriedades fosforescentes dos analitos neste meio. O processo de avaliação foi dividido em duas etapas: (i) definição da composição da ME e (ii) estudo do efeito da concentração da ME sobre o sinal fosforescente dos analitos.

A definição da composição da ME baseou-se no estudo das regiões de formação da ME para dezoito sistemas, nove usando o iso-octano como fase orgânica (grupo I) e nove usando o n-hexadecano (grupo II). Todas as ME's foram constituídas do óleo, de um surfactante, de um co-surfactante e a água. Nestes sistemas, o iso-octano e o n-hexadecano (óleos) foram selecionados por serem componentes principais e representativos dos líquidos orgânicos alifáticos de cadeia média C₈ e C₁₆. Nove álcoois de tamanho médio, lineares, ramificados e cíclicos foram testados como co-surfactantes (álcool propílico, álcool isopropílico, álcool butílico, álcool sec-butílico, álcool ter-butílico, álcool pentílico, álcool hexílico, cicloexanol e álcool 2'2-oxidietílico). O álcool escolhido como surfactante foi o etanol, devido a seu alto caráter hidrofílico e por serem as soluções estoques dos analitos 100 % etanólicas. Assim, as ME's estudadas foram:

- a) óleo/álcool propílico/etanol/água;
- b) óleo/álcool isopropílico/etanol/água;
- c) óleo/álcool butílico/etanol/água;
- d) óleo/álcool sec-butílico/etanol/água;

- e) óleo/álcool ter-butílico/etanol/água;
- f) óleo/álcool pentílico/etanol/água;
- g) óleo/álcool hexílico/etanol/água;
- h) óleo/ciclohexanol/etanol/água;
- i) óleo/álcool 2'2-oxidietílico/etanol/água.

O CBZ foi escolhido por ser o analito que possui maiores informações referenciais sobre suas propriedades luminescentes em solução, ajudando a facilitar a caracterização das ME's. O KI e Na_2SO_3 foram usados respectivamente como fonte de átomo pesado e sequestrador de oxigênio, por serem os reagentes mais adequados para obter FTA do CBZ diretamente em solução aquosa⁴⁵. A adequação desses reagentes é também decorrência de suas solubilidades e estabilidades quando presentes conjuntamente nos sistemas aquosos.

A região de formação da ME foi determinada pela construção de diagramas de fases pseudoternários, modo mais usual de descrever sistemas de quatro componentes, onde fase aquosa, fase oleosa, e mistura de surfactante e co-surfactante (neste caso mistura de álcoois) são representados nos vértices do triângulo⁷⁸. Como pode se observar na Figura 6, a região de formação das ME's é, em geral, não é muito grande dentro dos dois grupos de sistemas estudados.

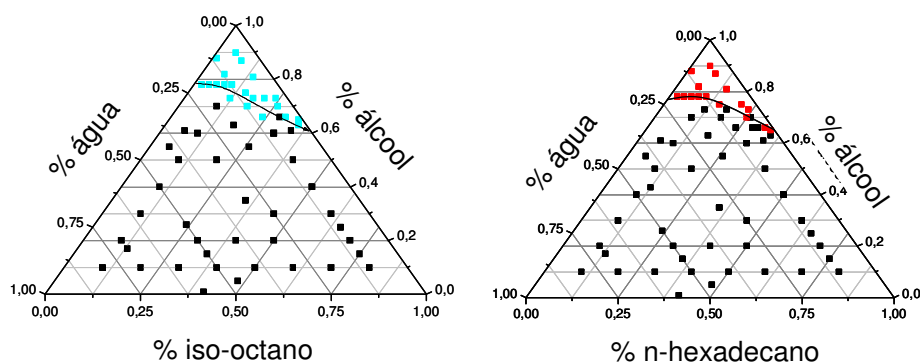


Figura 6. Diagramas de fases pseudoternários para as ME's contendo iso-octano e n-hexadecano.

Microemulsões transparentes e homogêneas foram obtidas quando os componentes variaram nas seguintes proporções: 1 a 35 % em volume de iso-octano ou de n-hexadecano, 65 a 87 % em volume mistura de álcoois e 1 a 20 % em volume água. A formação da microemulsão foi julgada a partir do critério óptico clássico da transparência e estabilidade. Microemulsões não foram

formadas quando se observaram sistemas opacos ou a aparição evidente duas fases depois de poucos segundos ou minutos após terem sido misturados os componentes. A composição final usada foi escolhida, arbitrariamente dentro desses limites, se baseando no volume previsto de amostra que se estimou ser necessário para a determinação fosforimétrica dos analitos de interesse. A composição escolhida foi 10 % em volume do óleo (iso-octano ou n-hexadecano), 65 %, em volume, da mistura de álcoois (50 % em volume de etanol e 15 % em volume do co-surfactante) e 25 % em volume de água, onde estariam contidas as proporções adequadas das soluções de KI e de Na₂SO₃.

A princípio, a medição da fosforescência do CBZ foi feita usando as condições instrumentais indicadas por Segura-Carretero⁴⁶, quando trabalhando diretamente em solução aquosa (Tabela 2). Nenhum sinal fosforescente foi obtido nestas condições. Diferentes proporções dos componentes foram avaliadas obtendo o mesmo resultado negativo. Distintas concentrações de Na₂SO₃ foram testadas considerando que a emissão fosforescente poderia estar sendo afetada pelo oxigênio presente na solução, ainda assim, nenhum sinal foi observado.

Tabela 2. Condições experimentais e instrumentais usadas por Segura-Carretero na determinação do CBZ em solução aquosa.

Características Espectroscópicas		Condições Experimentais		Condições Instrumentais	
λ (nm)	Tempo de Vida (μ s)	[KI] mol L ⁻¹	[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	t _d (μ s)	t _g (μ s)
290/440	255	0,6	0,002	150	400

t_d: tempo de retardo do detector (delay time).

t_g: tempo de abertura do detector (gate time).

Neste ponto a polaridade do meio foi considerada, pois segundo Parker⁵⁴, a fosforescência é mais intensa na medida em que a polaridade do sistema de solventes é maior. De acordo com Jablonski⁵⁰, substâncias aromáticas são mais polares quando no estado excitado, devido às mudanças na distribuição dos elétrons π da molécula que acontecem na transição. As interações entre as moléculas do(s) solvente(s) com as do soluto têm caráter fortemente eletrostático afetando a energia relativa entre o estado fundamental e do estado excitado, conseqüentemente influenciando a eficiência dos processos (radiativos ou não-radiativos) na desativação do estado excitado. O favorecimento dos processos de

desativação radiativa é consequência da estabilização do soluto com o estado excitado mais polar na presença de solventes mais polares⁶³.

Baseado no anteriormente exposto foi então realizado um estudo onde a proporção de um álcool (no caso foi escolhido o 1-propanol) foi aumentada numa solução aquosa do CBZ, visando avaliar o impacto sobre o sinal fosforescente do analito. Os resultados revelaram que efetivamente existe a atenuação do sinal fosforescente com o incremento do conteúdo do álcool na solução. A proporção máxima aceitável do álcool sem observação de atenuação significativa do sinal foi de 20 % em volume. A região de estabilidade para a formação da ME considera como proporção mínima de álcool 65 % em volume, teor que evidentemente supera o mínimo permissível para que o sinal fosforescente do CBZ não sofra atenuação.

O procedimento proposto para minimizar esta interferência foi a diluição da ME. Para tal, uma reformulação dos componentes e das suas proporções foi necessária. Assim, definiu-se agora como microemulsão-mãe (MEM) aquela constituída, em termos de volume, por: 10 % de iso-octano ou n-hexadecano, 78 % álcool (55 % de etanol e 23 % de co-surfactante) e 12 % água ultra purificada. A partir da microemulsão-mãe preparou-se a agora a denominada microemulsão-diluída (MED). A MED foi preparada pela diluição da MEM (de 1 a 10 % em volume) em solução aquosa contendo o íon de átomo pesado indutor de fosforescência (KI) e o seqüestrador de oxigênio (Na_2SO_3). Nessas condições, sinais fosforescentes pouco intensos, mas com potencialidade de serem otimizados, foram obtidos para a maioria dos álcoois co-surfactantes utilizados (Figura 7). Na mesma Figura 7 pode-se ainda notar o sinal fluorescente do CBZ. Qualquer conclusão sobre o efeito do tipo de co-surfactante empregado na MEM são ainda prematuros. Na etapa de otimização, a serem discutidas posteriormente, este efeito será reavaliado.

A caracterização física destas MED's foi realizada usando um microscópio óptico (100x) com câmara digital. Os diâmetros das gotículas das soluções caracterizadas são inferiores de 500 Å, tal como é apresentado na Figura 8. Estes diâmetros são menores que o estabelecido como diâmetro máximo (1400 Å) para denominar estas soluções como microemulsões. A tensão interfacial (TIF) não foi determinada, mas o fato da microemulsão se formar sugere que foram alcançadas TIF ultrabaixas na interface óleo/água.

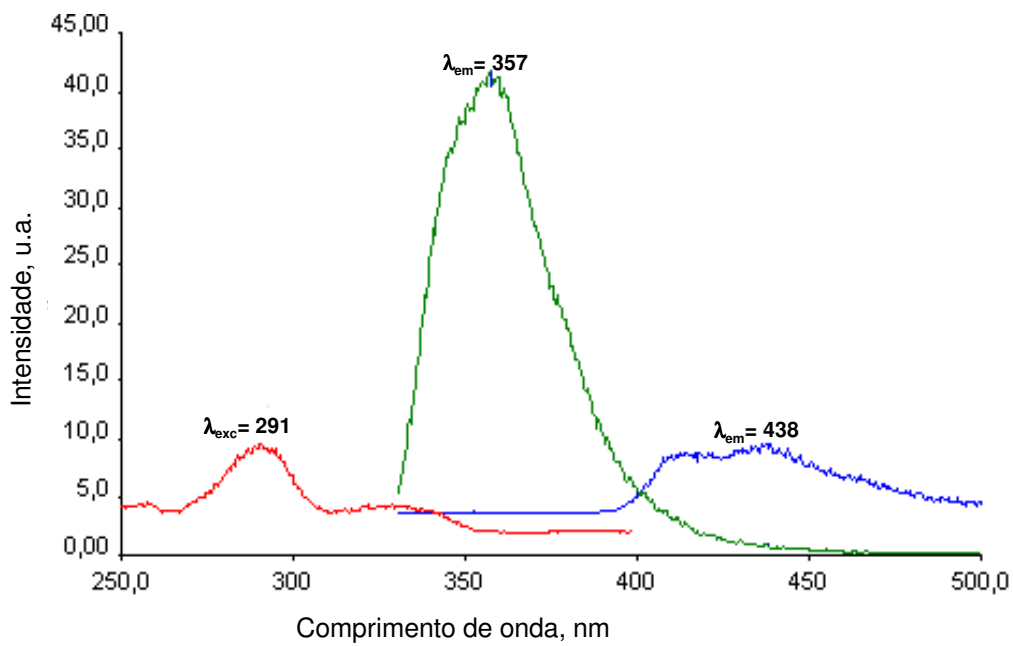


Figura 7. Espectro de excitação ($\lambda_{exc} = 291$ nm) de emissão fosforescente ($\lambda_{em} = 438$ nm) e de emissão fluorescente ($\lambda_{em} = 357$ nm) obtido a partir da MED do carbazol (5×10^{-5} mol L⁻¹) usando cicloexanol como co-surfactante na MEM.

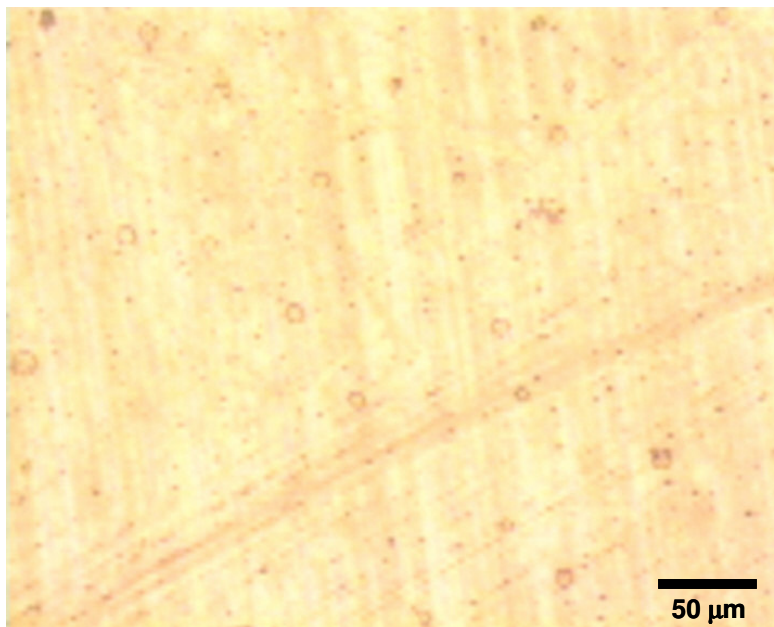


Figura 8. Imagem tomada do microscópio óptico marca Zeiss, modelo AZIOVERT 25, objetivo 10X, e zoom 0,80 da MED do sistema óleo/cicloexanol/etanol/água.

Como resultado desta fase preliminar, pode-se dizer que foi verificada a possibilidade do uso das MED na determinação fosforimétrica do carbazol presentes em amostras líquidas imiscíveis com água. O resultado positivo da

obtenção de sinal usando este tipo de ME poderia se explicar a partir do fato de que o procedimento seguido gerou um híbrido entre duas técnicas fosforescentes, pois nela se combinam as vantagens da técnica que usa o meio organizado, para permitir a análise de amostras imiscíveis em água, com a técnica que induz fosforescência por átomo pesado diretamente em solução aquosa. No primeiro estágio, as ME's sem detergente são formadas instantaneamente quando quantidades apropriadas dos componentes, água, óleo e mistura alcoólica são misturadas. Ao diluí-las e combiná-las com altas concentrações de átomo pesado e com o seqüestrador de oxigênio elas são adequadas para o uso na FTA. Em outras palavras, combina-se a capacidade do meio de organizar e estabilizar fases inicialmente imiscíveis com a indução do sinal fosforescente por meio do efeito externo de um átomo pesado.

5.2.

Otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais para a determinação do CBZ

Garantida a condição primária de obter sinal fosforescente dos analitos em meio organizado diluído, a fase a seguinte foi a da otimização da resposta analítica a partir do estabelecimento das melhores condições experimentais e instrumentais de análise.

Diferentes técnicas de otimização dos parâmetros de interesse foram aplicadas com o intuito de obter as máximas inclinações e amplitudes nas curvas de analíticas, o que garantiriam boas aplicações analíticas: a técnica clássica univariada, onde é estudada a influência de um fator de cada vez, e técnicas quimiométricas de planejamento fatorial e metodologia da superfície de resposta, que permitem determinar os parâmetros e as interações entre eles, que exercem maior influência a partir de um estudo multivariado dos mesmos.

Nestes estudos, para poder fazer uma estimativa do erro experimental, os ensaios foram feitos em triplicata com cada uma das repetições autênticas, objetivando a inclusão da variabilidade total do processo. Além disso, no caso do planejamento fatorial, os ensaios foram feitos e lidos em forma aleatória para evitar a distorção estatística nos resultados. Em outras palavras, para impedir que desvios típicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis.

As condições instrumentais utilizadas na etapa preliminar foram mantidas na etapa de otimização experimental, por considerá-las não determinantes na obtenção do sinal fosforescente das substâncias caracterizadas.

A estabilidade do analito nas MEM's foi avaliada em função da intensidade do sinal fosforescente na MED's ao longo de uma semana, observando-se que não existe diferença estatisticamente significativa nos valores de intensidade obtidos neste período de tempo. O sinal dos analitos, de acordo com estes resultados, foram definidos então, como estáveis no intervalo de tempo em que serão realizados os ensaios pertinentes com as MEM's.

Finalmente, vale a pena destacar que, a partir deste ponto, as MED's serão nomeadas de acordo com o co-surfactante empregado na preparação da MEM. A seguir, serão discutidos os resultados obtidos e finalmente comparados com o intuito de demonstrar que as técnicas quimiométricas são uma ferramenta valiosa na química analítica, mas são plenamente dependentes do conhecimento prévio (comportamento univariado dos fatores) do sistema em estudo.

5.2.1

Otimização univariada dos parâmetros experimentais e instrumentais

De acordo com o observado na etapa preliminar, os fatores a serem avaliados e otimizados são: (i) o fator de diluição da MEM, (ii) a concentração final de KI, (iii) a concentração final do sulfito de sódio e (iv) o pH da MED.

5.2.1.1.

Fator de diluição da MEM

De acordo com o observado na fase preliminar, a polaridade do meio é determinante na obtenção do sinal fosforescente do CBZ, portanto, o fator de diluição da MEM é uma variável chave que necessitou ser controlada na MED.

Com o intuito de verificar a influência do fator de diluição na fosforescência do CBZ, testes foram realizados fixando na MED a concentração do CBZ em $5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e mantendo as concentrações de KI ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$) e Na_2SO_3 ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) que vinham sendo utilizadas nos experimentos anteriores.

Esta avaliação foi feita para cada um dos sete sistemas óleo/co-surfactante/surfactante/água que estavam sendo estudados.

Na Tabela 3 apresentam-se os volumes de MEM avaliados, assim como as concentrações respectivas do analitos nas MEM utilizadas visando obter uma concentração final de $5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CBZ em todas as MED's derivadas.

Tabela 3. Volumes empregados da MEM no preparo da MED (concentração final de CBZ igual a $5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) para avaliar o efeito do fator de diluição sobre o sinal fosforescente do CBZ.

Volume MEM (μL)	[CBZ] MEM mol L^{-1}	Fator de Diluição
100	$5,5 \times 10^{-4}$	100
500	$1,1 \times 10^{-4}$	20
1000	$5,5 \times 10^{-5}$	10
1500	$3,7 \times 10^{-5}$	6,7
2000	$2,8 \times 10^{-5}$	5
2500	$2,2 \times 10^{-5}$	4

Como se pode observar na Figura 9, foi verificado que a tendência geral mostrada é o decréscimo da intensidade do sinal fosforescente com a diminuição do fator de diluição, ou seja, com a diminuição da polaridade do meio como era esperado. Assim, na maioria das MED's o CBZ apresentou a maior intensidade quando a MEM foi diluída em 100 vezes (100 μl da MEM). Apenas com os álcoois isopropílico e 2,2'oxidietílico geraram máximos numa diluição de 20 vezes. Por este motivo, um fator de diluição de 100 vezes foi escolhido para as avaliações posteriores.

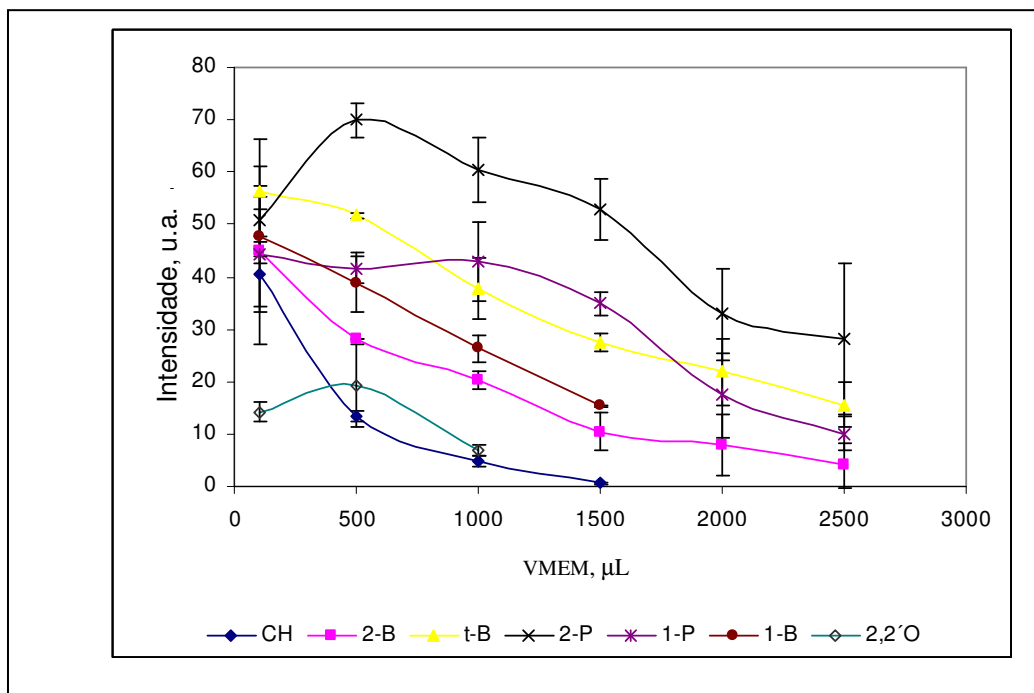


Figura 9. Avaliação do efeito do fator de diluição da MEM sobre o sinal fosforescente usando diferentes co-surfactantes na formulação: cicloexanol (CH), álcool sec-butílico (2-B), álcool ter-butílico (t-B), álcool isopropílico (2-P), álcool propílico (1-P), álcool butílico (1-B) e álcool 2'2-oxidietílico (2,2'O).

Os diferentes modelos de comportamento que definem a relação fator de diluição-sinal fosforescente foram em sua maioria não-lineares. Só no caso do álcool butílico se observou uma associação linear, o resto dos álcoois apresentou outros modelos mais ou menos sensíveis às mudanças de polaridade do meio.

É importante acrescentar que os diferentes sistemas avaliados não geraram nenhuma mudança estrutural nos espectros de excitação e emissão do carbazol, só foram observadas mudanças nas intensidades do mesmo, o qual pode ser verificado na Figura 10.

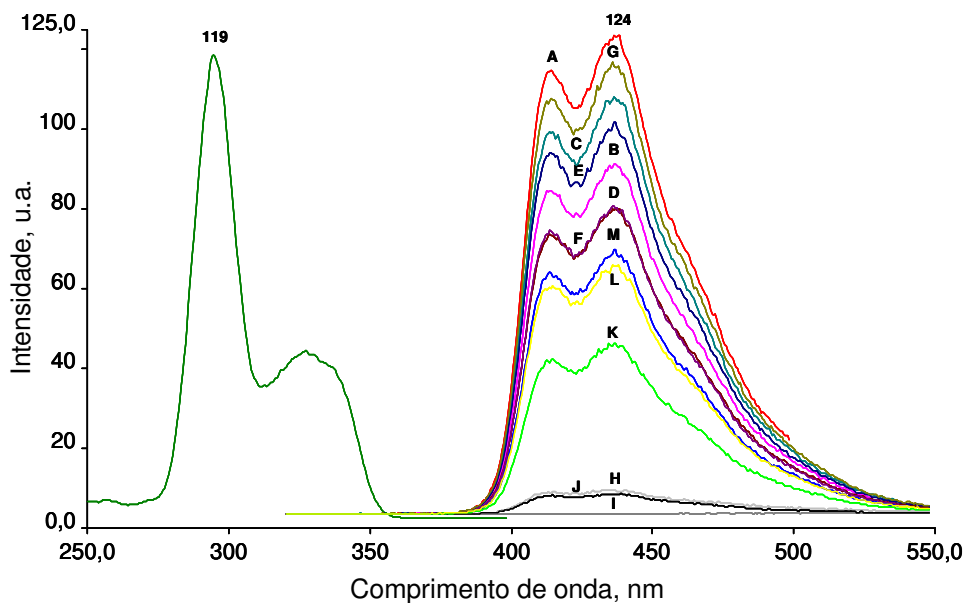


Figura 10. Avaliação do efeito do co-surfactante na intensidade do sinal nas condições otimizadas univariadamente (A: álcool isopropílico, B: cicloexanol, C=G: álcool sec-butílico, D: álcool propílico, E: álcool butílico, F: 2,2'oxidietanol, H: álcool pentílico, I: álcool benzílico, J: álcool sec-octílico, K: álcool hexílico, L: glicerol, M: álcool ter-butílico).

5.2.1.2. Concentração do átomo pesado

A presença do átomo pesado é vital na obtenção da fosforescência do CBZ em solução aquosa. Esta substância não apresenta fosforescência natural em solução, embora possua uma estrutura molecular rígida apropriada e contenha elétrons π deslocalizados e um heteroátomo. É imprescindível então a adição de íons de átomo pesados tais como Γ ou Tl^+ , a partir de sais solúveis, que sejam estáveis na solução contendo íons SO_3^{2-} . Como explicado na seção 3.2.6., a presença de íons de átomos pesados pode promover o cruzamento intersistemas (CI) entre os estados excitados singleto e tripleto favorecendo assim emissão de fosforescência. Vale lembrar que somente os íons Γ ou Tl^+ puderam ser usados com este objetivo em solução aquosa na presença de íons SO_3^{2-} , pois as outras opções (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} e Ag^+), tradicionalmente usadas em técnicas em substrato sólido, precipitam na forma de hidróxidos insolúveis na presença do sequestrador de oxigênio na solução.

Foram feitas avaliações comparativas da intensidade fosforescente do CBZ induzida pelos íons Γ ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$) e Tl^+ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nas MED's dos sistemas escolhidos na seção anterior. As intensidades dos sinais fosforescentes gerados pela presença do Tl^+ foram comparativamente muito menores do que aqueles

produzidos na presença do Γ . Adicionalmente, sendo a solubilidade em água do TINO_3 muito menor que a do KI, não existe muita versatilidade na maximização de sinal pelo aumento da concentração de sal de átomo pesado. No princípio, dada a importância das interações eletrostáticas entre o CBZ e o átomo pesado, devido à presença na estrutura do CBZ do grupo $-\text{N}$ era de esperar-se que houvesse maior eficiência do efeito do átomo pesado quando o TI^+ fosse usado. Este resultado definitivamente fundamenta a hipótese de que os mecanismos pelos quais os átomos pesados são capazes de mudar a multiplicidade do spin não estão bem esclarecidos e não se limitam puramente a interações eletrostáticas entre estes íons e moléculas orgânicas no estado singleto excitado³².

Como o Γ mostrou ser mais eficiente na função de promover a fosforescência do analito nas condições de trabalho, este foi escolhido como o átomo pesado na formulação das MED's. Mas, em busca de obter o máximo sinal fosforescente do CBZ foi necessária a otimização da concentração final de Γ . Assim, um estudo foi realizado variando a concentração de Γ em três diferentes MED's no intervalo de 0,2 a 4,0 mol L^{-1} . Na Figura 11 se apresentam os resultados obtidos. Como se pode observar, os sinais mais intensos foram obtidos na MED preparada com álcool isopropílico como co-surfactante. A mesma apresentou um notável incremento da intensidade fosforescente até a concentração de Γ igual a 1,5 mol L^{-1} , concentração a partir da qual o sinal permaneceu estatisticamente invariável. Este comportamento foi semelhante ao mostrado pela MED do cicloexanol. No caso do álcool butílico, sinais 60 % menos intensos foram observados e o aumento da concentração do Γ não foi de grande impacto no incremento da intensidade do sinal.

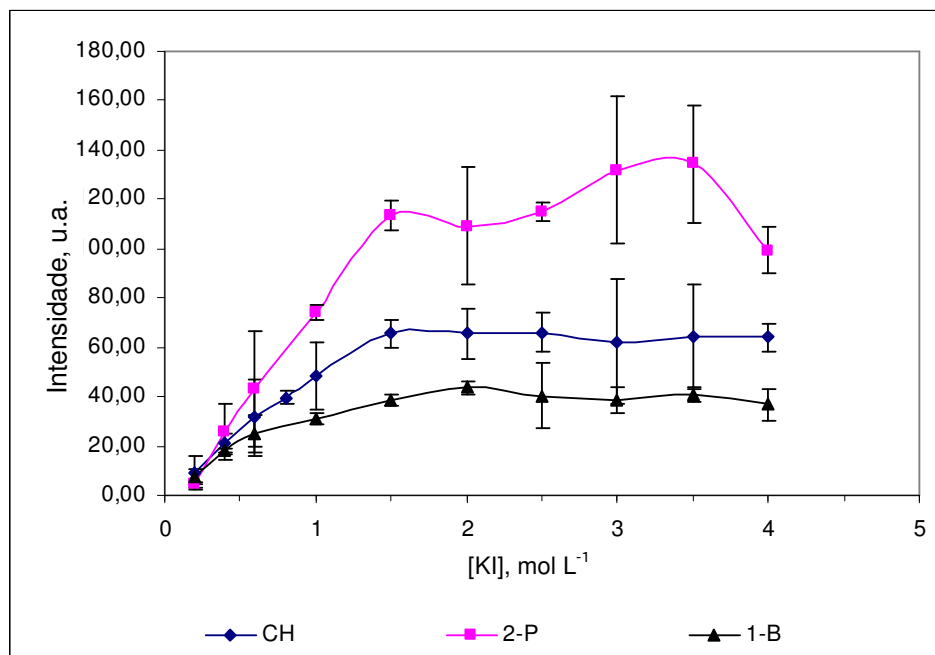


Figura 11. Avaliação do efeito da concentração do I^- sobre o sinal fosforescente usando como co-surfactantes na formulação o cicloexanol (CH), o álcool isopropílico (2-P) e o álcool butílico 1-B).

A causa destas evidentes diferenças de intensidades entre as diferentes MED's com o incremento da concentração do I^- poderia estar relacionada com a polaridade característica das diferentes MED's. Segundo os resultados, foi estabelecida como $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ a concentração ótima de I^- . Esta concentração representa, por aproximação, a média do intervalo de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mol L}^{-1}$, onde aparentemente já não existe dependência entre a intensidade do sinal e a concentração deste átomo pesado.

5.2.1.3. Concentração do sequestrador de oxigênio

A presença de O_2 dissolvido é um dos principais fatores que afetam as propriedades fosforescentes de uma substância, em solução aquosa, na temperatura ambiente. Como já explicado anteriormente, o oxigênio tem um efeito desativador sobre o estado excitado tripleto por meio de um processo de *quenching* dinâmico, assim por estar presente em altas concentrações e por ter uma alta capacidade de difusão no meio aquoso. Sinais fosforescentes não são possíveis de serem observados em meios aquosos que não foram previamente desoxigenados.

A desoxigenação química usando Na_2SO_3 oferece vantagens em termos práticos e é o mais recomendado para soluções aquosas. É um método simples econômico e rápido, pois em soluções aquosas elimina o oxigênio imediatamente, oferecendo proteção contra a contaminação do oxigênio atmosférico acima da solução durante um período de tempo longo⁶¹. Por todas estas razões, o Na_2SO_3 foi selecionado no desenvolvimento deste estudo.

Para encontrar a concentração ótima para esta substância na MED, foi monitorado o efeito que este agente teve sobre o sinal fosforescente do CBZ. Para isto, quantidades apropriadas de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_3 foram agregadas às MED's (preparadas pela diluição de 100 vezes da MEM) e com concentração do átomo pesado fixa em $0,6 \text{ mol L}^{-1}$. As concentrações finais de Na_2SO_3 avaliadas foram 2×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 4×10^{-2} , 6×10^{-2} , 8×10^{-2} e $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. A seguir na Figura 12 se apresentam os resultados obtidos.

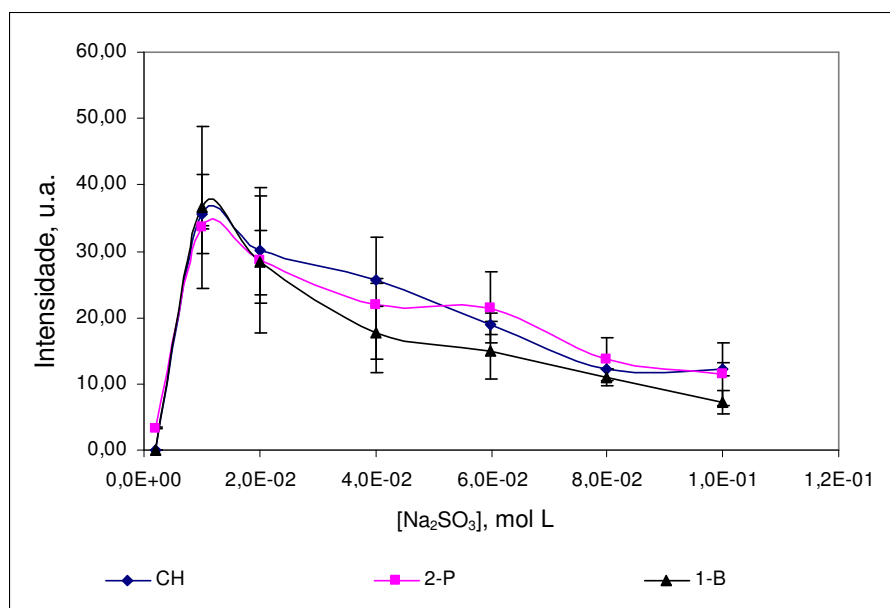


Figura 12. Avaliação do efeito da concentração do sequestrador de oxigênio (Na_2SO_3) sobre o sinal fosforescente usando como co-surfactantes na formulação o cicloexanol (CH), o álcool isopropílico (2-P) e do álcool butílico (1-B).

Pode-se observar que as tendências do comportamento da intensidade do sinal do CBZ com o aumento da concentração do Na_2SO_3 associadas às três MED's estudadas são semelhantes. Notou-se claramente que uma concentração de $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, usada até agora, não era suficiente para eliminar o oxigênio do meio tendo como resultado a atenuação do sinal. Pelo contrário uma concentração

de 1×10^{-2} mol L⁻¹ de Na₂SO₃ gerou um máximo na intensidade do sinal do CBZ nas três MED's. Isto poderia indicar que nesta concentração, ou muito próximo dela, é alcançada a completa eliminação do O₂ do meio. Mas, a partir de 4×10^{-2} mol L⁻¹ não existe diferença estatisticamente significativa entre os valores de intensidade obtidos, apenas nota-se uma tendência de queda de sinal.

Em conclusão, o Na₂SO₃ definitivamente confere qualidade ao meio para que seja observada a fosforescência, mas o seu efeito na intensidade do sinal não é tão significativo. Isto já tem sido reportado por vários autores^{75,79}, os quais têm sugerido o tempo de aparição do sinal como chave na escolha da concentração ótima do Na₂SO₃, pois incrementos na concentração do seqüestrador fazem que os sinais sejam gerados mais rapidamente devido a uma mais rápida desoxigenação do meio. Neste estudo, o tempo de aparição do sinal não foi medido por considerá-lo infinitamente pequeno, razão pela qual a concentração selecionada como ótima foi aquela associada com a obtenção do sinal fosforescente mais intenso, e correspondente a 1×10^{-2} mol L⁻¹.

5.2.1.4. pH da MED

A influencia do pH na fosforescência de um analito em solução é muito importante porque afeta a forma luminescente existente da molécula, assim como os processos de desoxigenação com íon sulfito. Estudos recentes têm demonstrado que a eficiência do processo de desoxigenação usando Na₂SO₃ é controlada pelo pH do meio, e que ambientes fortemente ácidos ou básicos geram atenuações drásticas do sinal fosforescente^{45,62}. O anteriormente exposto concorda com o observado neste estudo já que não se observou fosforescência no CBZ quando foi estudada condições drásticas de basicidade (NaOH 0,5 mol L⁻¹) e de acidez (HNO₃ 0,5 mol L⁻¹) na formulação das MED's.

Uns dois aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a possível produção de derivados com maior eficiência quântica fosforescente devido à protonação ou hidrólise ácida ou básica da molécula do analito⁵⁹. A relação entre o pH do meio com a polaridade do estado excitado da molécula pode também afetar a estabilidade do estado excitado

e a diferença de energia entre este e o estado fundamental, conseqüentemente a magnitude do sinal e a posição das bandas de excitação e de emissão.

Um estudo mais detalhado da influência do pH da MED sobre a fosforescência do CBZ foi realizado, variando-se o pH em duas unidades no intervalo entre 2,00 e 10,00 pela adição de 1 mL da respectiva solução tampão. Os resultados deste estudo mostraram um efeito atenuador do pH sobre o sinal do analito. Nos valores de pH testados se obtiveram sinais significativamente menores que o observado com o pH natural da MED. O sinal do CBZ foi drasticamente reduzido em torno de 90 % quando se variou o pH 7,50 (pH natural da MED) para 2,00 e 4,00. Nos pH's superiores (6,00 e 8,00) a atenuação foi de 50 %, e a pH 10,00 foi observado um decréscimo suave do sinal, em torno de 9 %. Por estes resultados, se decidiu trabalhar ao pH natural da MED. Na faixa de pH estudada não se observou nenhuma mudança estrutural nos espectros de excitação e emissão do carbazol, só foram observadas mudanças nas intensidades do mesmo (Figura 13).

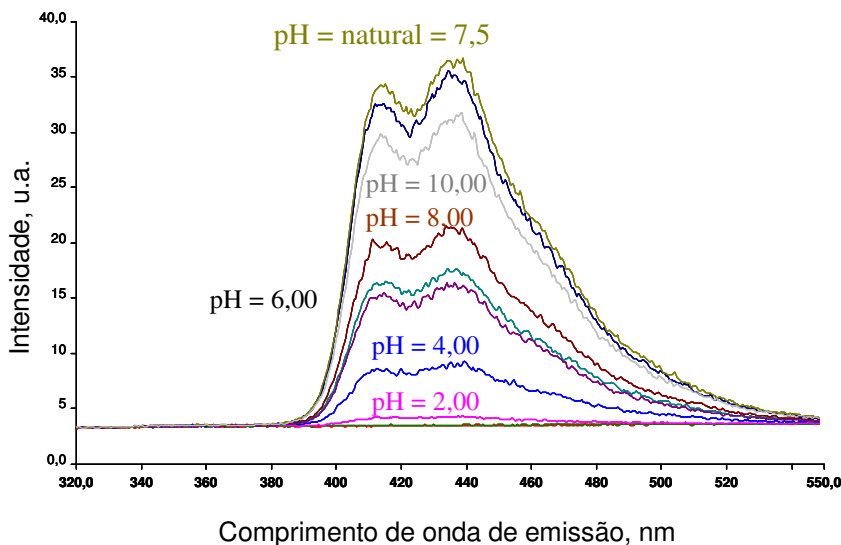


Figura 13. Avaliação do pH da MED sobre o sinal fosforescente do CBZ.

5.2.1.5.

Parâmetros do detector: Tempo de retardo (*delay*) e tempo de abertura (*gate*)

Uma vez otimizadas as condições experimentais foram ajustados os tempos de retardo e de abertura do detector, parâmetros instrumentais que poderiam ter influência crítica na magnitude do sinal fosforescente do CBZ, assim

como no perfil do espectro. O tempo de retardo está associado com o tempo de aquisição do sinal do analito após exposição à radiação. É um parâmetro importante, pois permite rejeitar fenômenos ópticos de curta duração (espalhamento e fluorescência) minimizando assim o ruído associado à medição da fosforescência. O tempo de abertura do detector determina o tempo de exposição do mesmo à radiação da lâmpada de Xe e deve ser otimizado no intuito de se encontrar um compromisso entre a magnitude do sinal do analito e o sinal de fundo.

Para testar a influência destes parâmetros foram preparadas três MED's e medidas primeiramente deixando o tempo de abertura do detector fixo em 0,40 ms, variando-se o tempo de retardo de 0,01 ms até 9 ms. Os resultados indicam que já com um valor de 0,30 ms se tem uma atenuação quase total do sinal. Foi escolhido um tempo de retardo igual a 0,05 ms, mesmo não sendo o que produziu sinal fosforescente máximo, por garantir um ambiente livre do sinal fluorescente do próprio analito e ainda intensa magnitude do sinal do CBZ. O procedimento foi semelhante para se avaliar o efeito do tempo de abertura. Neste caso, a razão entre sinal do CBZ e o sinal de fundo foi o parâmetro a monitorar para selecionar o melhor *gate*. O valor de 0,20 ms foi escolhido por apresentar a melhor razão sinal-ruído para o CBZ. A Figura 14, o sinal fosforescente é mostrado em função do tempo de retardo do detector. Nota-se que a banda fluorescente (355,3 nm) pode ser observada muito próxima da banda fosforescente (436,1 nm) quando o tempo de retardo foi 0,01 ms. Nessa Figura tem-se também o comportamento da razão entre a fosforescência e o sinal de fundo em função do tempo de abertura do detector.

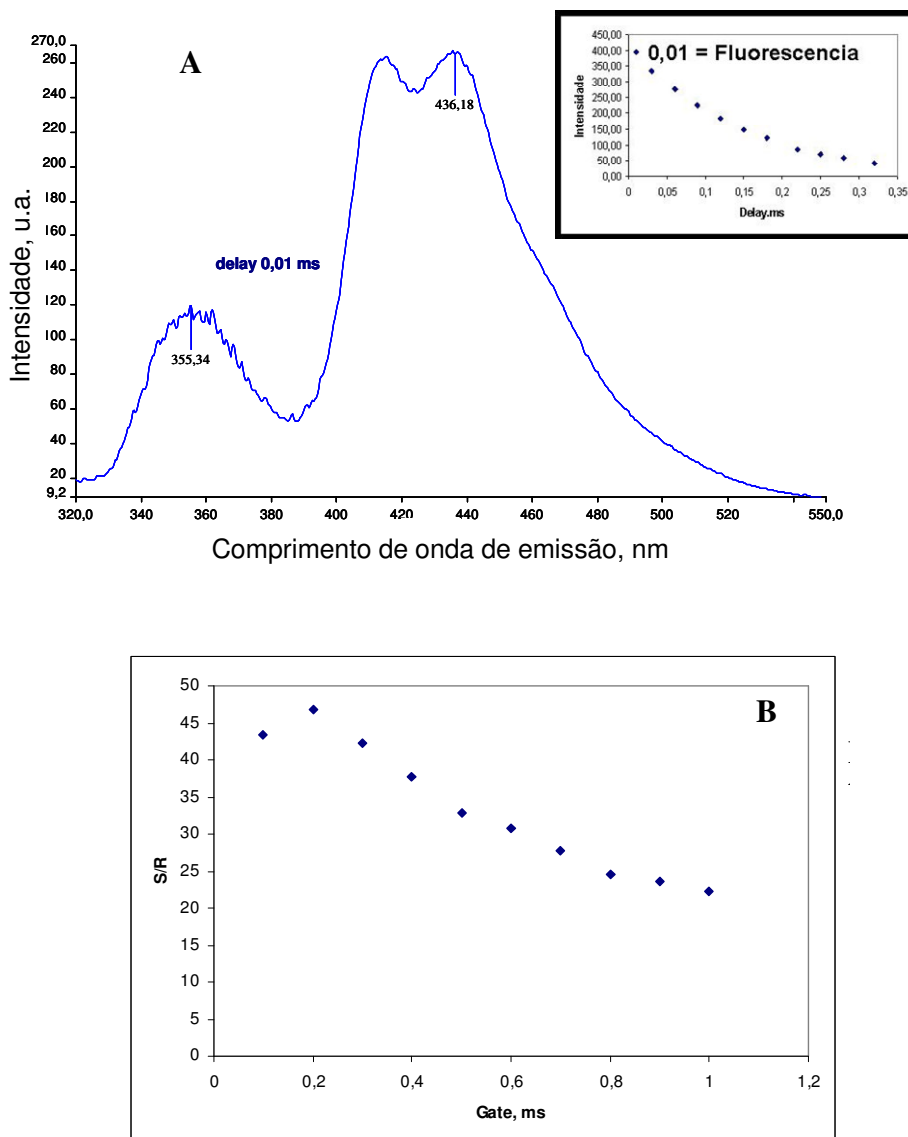


Figura 14. Avaliação da influência do tempo de retardo do detector (A) e do tempo de abertura do detector (B) na fosforescência do DBT.

5.2.2. Otimização multivariada dos parâmetros experimentais para o CBZ

Conhecido o sistema de estudo e com o intuito de garantir que as condições apropriadas serão selecionadas para o alcance da máxima sensibilidade, foi realizado um planejamento fatorial completo. Esta é uma técnica estatística multivariada utilizada quando se tem duas ou mais variáveis (fatores) afetando uma ou mais respostas do sistema. A mesma permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, conseguindo-se desta forma, uma análise de uma variável sujeita a todas as combinações das outras variáveis. Ela representa a única maneira de prever a interação entre variáveis^{80,81}. Neste estudo, o planejamento

fatorial foi usado com uma perspectiva confirmatória, ou seja, para avaliar o grau que os dados obtidos univariadamente satisfazem o objetivo de maximizar o sinal do analito.

Para sua aplicação foi necessário cobrir certos requisitos. O primeiro deles foi escolher as variáveis para o estudo. De acordo com os resultados obtidos no estudo da seção anterior, as variáveis a serem avaliadas foram as experimentais, por considerar as variáveis instrumentais menos críticas na obtenção do sinal fosforescente do CBZ. Dentro das variáveis experimentais, somente o fator de diluição não foi ponderado, por considerar que a partir de um fator de diluição de 100 vezes não se conseguiram sinais relativamente mais intensos de acordo com o observado na seção 5.2.1.1. No caso do tipo de MEM, a mesma foi definida como uma variável qualitativa dentro do planejamento. A segunda condição a cobrir foi especificar os níveis de variação e sua faixa. Escolheu-se a análise fatorial mais simples, onde todos os fatores são estudados em apenas dois níveis: o baixo (-1) e o alto (+1). A faixa de variação foi definida inicialmente em função do comportamento apresentado pelas variáveis no estudo univariado. A terceira condição, o tamanho da amostra, foi mantida em duas réplicas e por último, a ordem de realização dos ensaios foi aleatória. Na Tabela 4 são resumidos estes requisitos.

Tabela 4. Variáveis consideradas na primeira fase do planejamento fatorial.

Variável	Níveis	
	-1	+1
[KI] mol L ⁻¹	0,6	3,5
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,01	0,04
pH	6	10
Tipo de MEM	CH	2-P

Por definição, o planejamento fatorial desenhado foi 2⁴, o que quer dizer que foram analisados 4 fatores em 2 níveis. Como resultado um total de 48 experimentos foram realizados considerando duas réplicas.

A matriz de planejamento foi construída fazendo todas as combinações possíveis entre os níveis dos quatro fatores seguindo o modelo recomendado por Box & Hunter como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial 2^4 .

Ensaio	[KI] mol L ⁻¹	[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	pH	Tipo de MEM	Intensidades		
					I	II	III
1	-1	-1	-1	-1	52,89	48,71	66,17
2	1	-1	-1	-1	152,52	140,48	148,38
3	-1	1	-1	-1	34,85	42,58	31,19
4	1	1	-1	-1	47,98	41,74	41,90
5	-1	-1	1	-1	27,28	37,11	32,84
6	1	-1	1	-1	118,64	116,12	122,91
7	-1	1	1	-1	23,58	28,95	22,18
8	1	1	1	-1	37,92	41,22	54,01
9	-1	-1	-1	1	73,53	57,18	63,97
10	1	-1	-1	1	168,11	248,74	198,45
11	-1	1	-1	1	26,75	23,32	30,16
12	1	1	-1	1	35,50	62,62	50,42
13	-1	-1	1	1	47,46	33,93	35,16
14	1	-1	1	1	106,26	133,06	71,26
15	-1	1	1	1	30,17	37,86	28,43
16	1	1	1	1	79,10	74,97	59,27

Para a análise estatística dos dados foram usados os valores codificados dos fatores nos dois níveis a serem avaliados e se assumiu como primeiro modelo a testar o linear, por ser o modelo mais simples. O programa Statistica 6.0 da Statsoft, especificamente o módulo de Análise e Planejamento de Experimentos, foi usado para todo o tratamento estatístico dos resultados. O mesmo foi baseado no planejamento padrão Box & Hunter $2^{(k-p)}$. Já no modelo estatístico o tipo de erro escolhido para a ANOVA foi erro puro por ter sido considerado duas réplicas autênticas na definição do tamanho da amostra. Nas Tabela 6 se apresentam os resultados obtidos.

Tabela 6. Resultado da ANOVA do planejamento fatorial 2⁴.

ANOVA; Var.:Intensidade; R-sqr=,93634; Adj.:93634; 2**(4-0) design; MS Pure Error=210,0771 DV: Intensidade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)[KI]	41732,5	1	41732,48	198,6531	0,000000
(2)[Na ₂ SO ₃]	35997,6	1	35997,58	171,3541	0,000000
(3)pH	4970,5	1	4970,49	23,6603	0,000003
(4)Tipo de MEM	1446,8	1	1446,83	6,8872	0,01320
1 by 2	16209,3	1	16209,32	77,1589	0,000000
1 by 3	505,4	1	505,38	2,4057	0,13073
1 by 4	708,0	1	708,02	3,3703	0,07569
2 by 3	7148,0	1	7147,98	34,0255	0,000000
2 by 4	142,1	1	142,11	0,6764	0,41690
3 by 4	276,4	1	276,43	1,3159	0,25984
1*2*3	2183,9	1	2183,90	10,3957	0,00291
1*2*4	11,2	1	11,17	0,0531	0,81914
1*3*4	835,8	1	835,75	3,9783	0,05467
2*3*4	2436,9	1	2436,89	11,6000	0,00179
Lack of Fit	1069,3	1	1069,27	5,0899	0,03103
Pure Error	6722,5	32	210,08		
Total SS	122396,1	47			

Os resultados oferecidos pelo Statistica 6.0 da análise de variância e resumidos na Tabela 6 destacam alguns valores em negrito. Estes valores correspondem àqueles que possuem significância estatística baseada na análise de probabilidade p com nível de confiança de 95% e no teste F. Os efeitos e/ou interações que apresentam valores de $p < 0,05$ e de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, são estatisticamente significantes. Os efeitos principais, concentração de KI (1), concentração de Na₂SO₃ (2), pH (3) e tipo de MEM (4) são estatisticamente importantes no modelo linear avaliado. Assim como as interações 12, 23, 123 e 234.

Tabela 7. Estimativa dos efeitos do planejamento fatorial 2⁴.

Factor	Effect Estimates; Var.:Intensidade; R-sqr=,93634; Adj:,90933 (F 2**(4-0) design; MS Pure Error=210,0771 DV: Intensidade					
	Effect	Std.Err. Pure Err	t(32)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	68,496	2,09203	32,742	0,00000	64,235	72,758
(1)[KI]	58,972	4,18407	14,094	0,00000	50,449	67,495
(2)[Na ₂ SO ₃]	-54,770	4,18407	-13,090	0,00000	-63,293	-46,248
(3)pH	-20,352	4,18407	-4,864	0,00003	-28,875	-11,829
(4)Tipo de MEM	10,980	4,18407	2,624	0,01320	2,458	19,503
1 by 2	-36,753	4,18407	-8,784	0,00000	-45,276	-28,230
1 by 3	-6,490	4,18407	-1,551	0,13073	-15,012	2,033
1 by 4	7,681	4,18407	1,836	0,07569	-0,841	16,204
2 by 3	24,406	4,18407	5,833	0,00000	15,884	32,929
2 by 4	-3,441	4,18407	-0,822	0,41690	-11,964	5,081
3 by 4	-4,800	4,18407	-1,147	0,25984	-13,322	3,723
1*2*3	13,490	4,18407	3,224	0,00291	4,968	22,013
1*2*4	0,965	4,18407	0,231	0,81914	-7,558	9,487
1*3*4	-8,345	4,18407	-1,995	0,05467	-16,868	0,177
2*3*4	14,250	4,18407	3,406	0,00179	5,728	22,773

Os resultados da Tabela 7 confirmam o que foi observado na ANOVA. O efeito principal de maior influência na fosforescência do CBZ é a concentração de KI. Considerando a isoladamente, poder-se-ia dizer que o sinal positivo no modelo linear indica que a intensidade do sinal fosforescente aumenta com o aumento da concentração do átomo pesado. O mesmo efeito, mas de menor importância, foi observado para o tipo de MEM. Efeitos positivos são observados quando o álcool isopropílico é usado como co-surfactante. No caso dos fatores concentração do Na₂SO₃ e pH, um aumento nos mesmos provoca o decréscimo da intensidade do sinal. Considerando agora as interações estatisticamente significativas entre os fatores pode-se observar que o aumento das concentrações do átomo pesado e do sequestrador de oxigênio simultaneamente é prejudicial para o sinal. O efeito contrário é observado para as outras interações também estatisticamente significativas.

Uma forma gráfica de apresentar o anteriormente exposto é através do gráfico de Pareto (Figura 15). Ele mostra de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes. Os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória ($p = 0,05$) devem ser considerados no modelo matemático. Os valores ao lado de cada retângulo representam a distribuição t de Student⁸². Considerando somente o efeito principal, o gráfico de Pareto mostra o já

observado na ANOVA que as concentrações de KI e de Na_2SO_3 são os efeitos mais importantes.

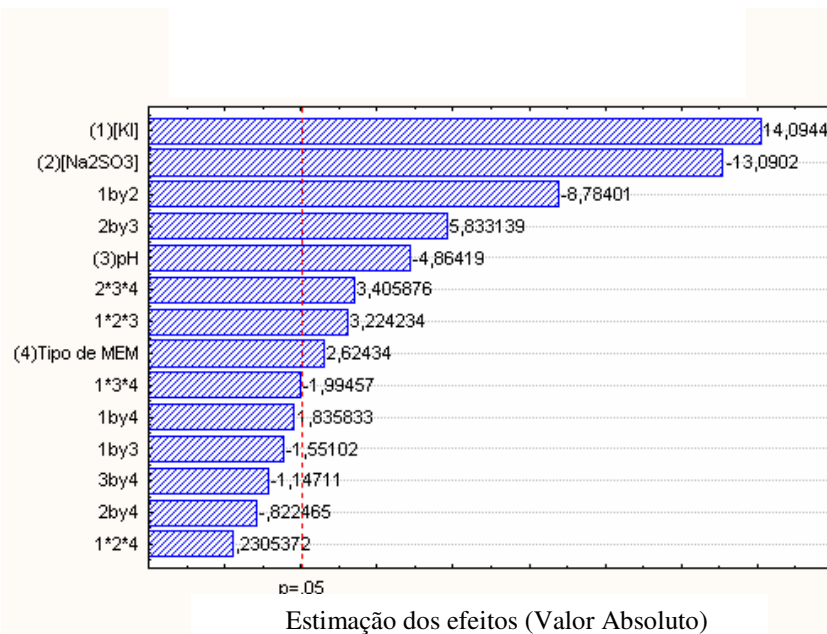


Figura 15. Gráfico de Pareto.

Foram também determinados os coeficientes de regressão. Estes são definidos como os valores numéricos da estimativa do parâmetro diretamente associado como uma variável independente, em nosso caso, concentração de KI, concentração de Na_2SO_3 , pH e tipo de MEM. Estes coeficientes são a metade do valor do efeito estimado devido a amplitude de níveis avaliados (-1 e +1). Eles indicam exatamente em quanto cada incremento do fator vai alterar na resposta, levando em consideração também à interação entre os fatores. A equação que descreve o modelo linear é:

$$\text{Intensidade} = 68 + 29 x_1 - 27 x_2 - 10 x_3 + 5 x_4 - 18 x_1 x_2 + 12 x_2 x_3 + 7 x_1 x_2 x_3 + 7 x_2 x_3 x_4$$

Onde x_1 = concentração de KI, x_2 = concentração de Na_2SO_4 , x_3 = pH, x_4 = Tipo de MEM.

Para avaliar a adequação do modelo é preciso testar a falta de ajuste. O fator falta de ajuste ou *lack of fit* indica o quanto o modelo está ajustado. Ele é

calculado quando existem pontos realizados em replicatas, como em nosso caso. Se a variabilidade residual resulta ser significativamente maior que o erro puro, denota que o modelo não está bem ajustado. Fazendo o teste F para avaliar a falta de ajuste, comparando o valor do $F_{\text{crítico}}$ com $F_{\text{calculado}}$ se pode constatar que o modelo linear apresenta falta de ajuste por ser o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ ($5,728 > 4,17$). Este teste foi mostrado na Tabela 6 (ANOVA). Na Figura 16, o gráfico de valores preditos contra valores observados mostra que o modelo linear é inadequado.

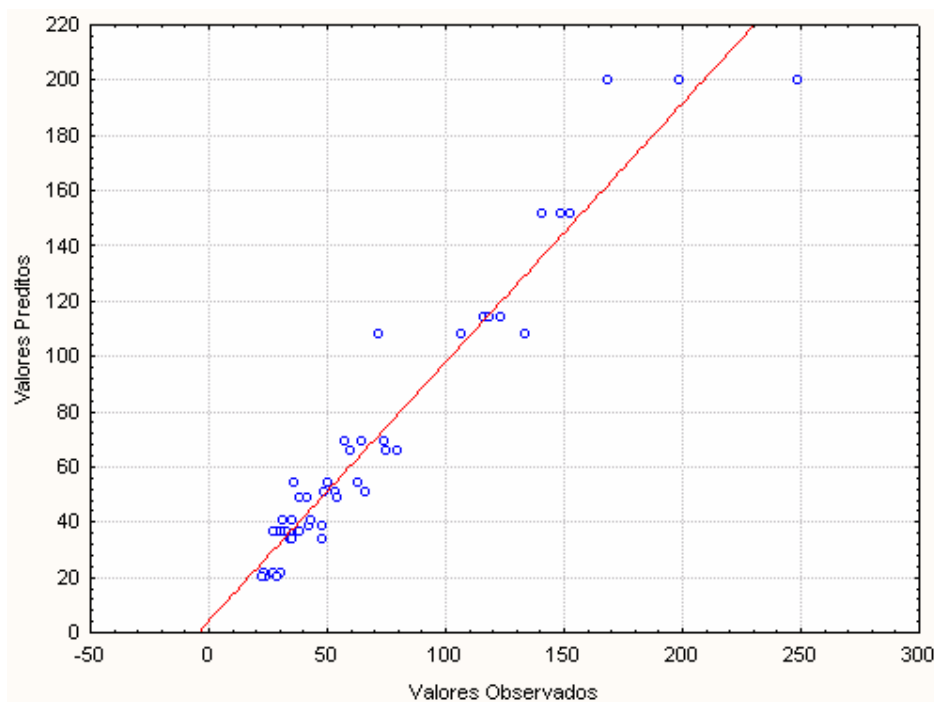


Figura 16. Gráfico de valores observados *versus* valores preditos.

Como o sistema ainda não está otimizado, um segundo planejamento teve que ser realizado. Nesta segunda fase as faixas de aplicação foram reduzidas de acordo o observado no planejamento anterior. Na Tabela 8 apresentam-se os valores correspondentes.

Tabela 8. Variáveis consideradas na segunda fase do planejamento fatorial 2⁴.

Variável	Níveis	
	-1	+1
[KI] mol L ⁻¹	2,1	3,5
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,01	0,025
pH	7,2	8
Tipo de MEM	CH	2-P

A matriz de planejamento foi construída fazendo todas as combinações possíveis entre os níveis dos quatro fatores seguindo novamente o modelo recomendado por Box & Hunter. Na Tabela 9 a seguir, mostra a matriz analisada.

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial 2⁴.

Ensaio	[KI] mol L ⁻¹	[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	pH	Tipo de MEM	Intensidades		
					I	II	III
1	-1	-1	-1	-1	141,63	145,84	96,30
2	1	-1	-1	-1	174,64	165,02	133,51
3	-1	1	-1	-1	71,34	54,23	67,17
4	1	1	-1	-1	98,50	86,03	73,15
5	-1	-1	1	-1	104,39	128,80	118,45
6	1	-1	1	-1	40,81	195,43	162,38
7	-1	1	1	-1	101,25	111,48	119,08
8	1	1	1	-1	120,98	124,85	116,98
9	-1	-1	-1	1	102,48	111,08	150,58
10	1	-1	-1	1	128,56	244,23	171,80
11	-1	1	-1	1	106,32	105,46	90,81
12	1	1	-1	1	124,47	78,19	105,21
13	-1	-1	1	1	144,48	150,06	126,25
14	1	-1	1	1	188,00	192,95	188,28
15	-1	1	1	1	118,48	149,98	127,74
16	1	1	1	1	127,55	118,43	114,66

Os valores ressaltados em negrito não foram considerados no tratamento estatístico por serem confirmados como *outliers* segundo o teste Q ou teste de Dixon. O planejamento então foi tratado considerando uma réplica e o modelo de análise empregado manteve as condições empregadas no planejamento anterior.

Na Tabela 10 e na Tabela 11 se apresentam os resultados do tratamento estatístico dos dados.

Tabela 10. Resultados da ANOVA do planejamento fatorial 2⁴.

Factor	ANOVA; Var.:INTENSIDADE; R-sqr=,89167; 2**(4-0) design; MS Pure Error=232,7253 DV: INTENSIDADE				
	SS	df	MS	F	p
(1)[KI]	8643,2	1	8643,2	37,1389	0,00002
(2)[Na2SO3]	19975,5	1	19975,5	85,8330	0,00000
(3)pH	1557,5	1	1557,5	6,6925	0,01986
(4)TIPOMEM	1280,8	1	1280,8	5,5035	0,03219
1 by 2	4232,2	1	4232,2	18,1855	0,00059
1 by 3	386,8	1	386,8	1,6619	0,21567
1 by 4	189,3	1	189,3	0,8134	0,38050
2 by 3	1068,7	1	1068,7	4,5922	0,04784
2 by 4	136,2	1	136,2	0,5851	0,45546
3 by 4	48,3	1	48,3	0,2075	0,65486
1*2*3	5,7	1	5,7	0,0244	0,87792
1*2*4	851,7	1	851,7	3,6597	0,07381
1*3*4	866,2	1	866,2	3,7221	0,07163
2*3*4	860,2	1	860,2	3,6962	0,07253
Lack of Fit	1148,5	1	1148,5	4,9351	0,04109
Pure Error	3723,6	16	232,7		
Total SS	44974,4	31			

Tabela 11. Estimativa dos efeitos para o planejamento fatorial 2⁴.

Effect Estimates; Var.:INTENSIDADE; R-sqr=,89167; Adj:.,8024 2**(4-0) design; MS Pure Error=232,7253 DV: INTENSIDADE						
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(16)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	133,303	2,69679	49,4302	0,00000	127,586	139,020
(1)[KI]	32,869	5,39358	6,0942	0,00002	21,436	44,303
(2)[Na2SO3]	-49,969	5,39358	-9,2646	0,00000	-61,403	-38,536
(3)pH	13,953	5,39358	2,5870	0,01986	2,519	25,387
(4)TIPOMEM	12,653	5,39358	2,3460	0,03219	1,219	24,087
1 by 2	-23,001	5,39358	-4,2644	0,00059	-34,434	-11,567
1 by 3	-6,953	5,39358	-1,2891	0,21567	-18,387	4,481
1 by 4	4,864	5,39358	0,9019	0,38050	-6,569	16,298
2 by 3	11,558	5,39358	2,1429	0,04784	0,124	22,992
2 by 4	4,126	5,39358	0,7649	0,45546	-7,308	15,559
3 by 4	-2,457	5,39358	-0,4555	0,65486	-13,891	8,977
1*2*3	0,842	5,39358	0,1561	0,87792	-10,592	12,276
1*2*4	-10,318	5,39358	-1,9130	0,07381	-21,752	1,116
1*3*4	-10,406	5,39358	-1,9293	0,07163	-21,839	1,028
2*3*4	-10,369	5,39358	-1,9225	0,07253	-21,803	1,064

Novamente, como se podem perceber, alguns dos valores se encontram destacados em negrito. Definitivamente todos os fatores avaliados possuem significância estatística ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, e de $p < 0,05$). A importância relativa deles sobre a fosforescência do CBZ pode ser vista na Tabela ANOVA ou pelo valor dos efeitos dos fatores (Tabela 11). A mesma também pode ser observada claramente no gráfico de Pareto (Figura 17), segundo o qual os efeitos mais importantes estatisticamente são a concentrações de Na₂SO₃ e KI e a interação entre eles. No caso do pH e tipo de MEM possuem valores de p muito próximos do p crítico, fazendo com que sua significância estatística não seja muito relevante no modelo linear considerado, mas mesmo assim deve ser incluído no modelo. O resto das interações de segunda e terceira ordem apresenta valores de p maiores a 0,05, perdendo importância no modelo. Esta conclusão pode ser confirmada a partir do gráfico de probabilidade normal dos efeitos (Figura 18).

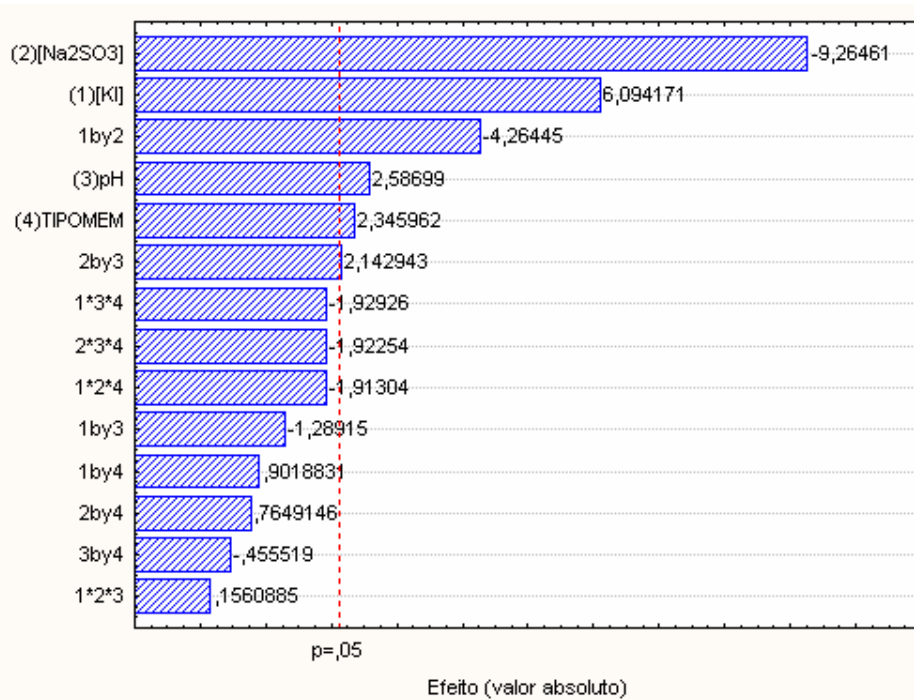


Figura 17. Gráfico de Pareto o planejamento fatorial 2^4 .

O gráfico apresenta na hierarquia dos efeitos, o pH, tipo de MEM e as interações de segunda e terceira ordem como negligenciáveis, e as concentrações de KI e Na_2SO_3 (únicos pontos fora da reta) como os fatores mais relevantes.

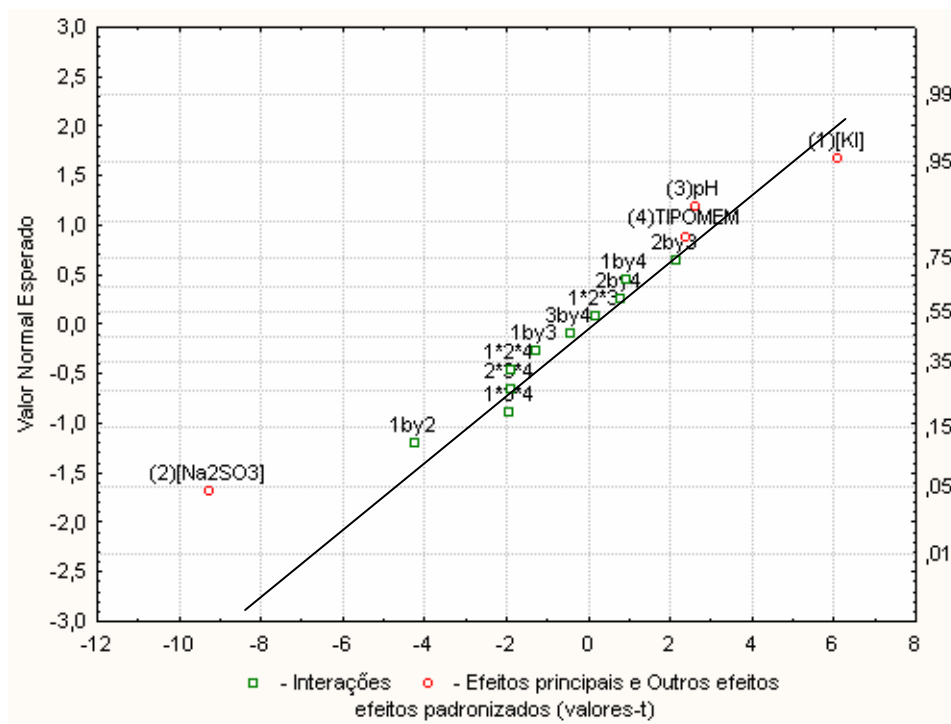


Figura 18. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos.

Pelo anteriormente exposto a equação que descreve o modelo linear neste caso é:

$$\text{Intensidade} = 133 + 16x_1 - 25x_2 + 7x_3 + 6x_4 - 11x_1x_2 + 6x_2x_3$$

onde x_1 = concentração de KI e x_2 = concentração de Na_2SO_4

Fazendo o teste F para avaliar a falta de ajuste, se pode constatar que o modelo linear ainda apresenta falta de ajuste por ter o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ ($4,93 > 4,49$). O gráfico de valores preditos contra valores observados mostra relativamente que o modelo linear é ainda inadequado (Figura 19).

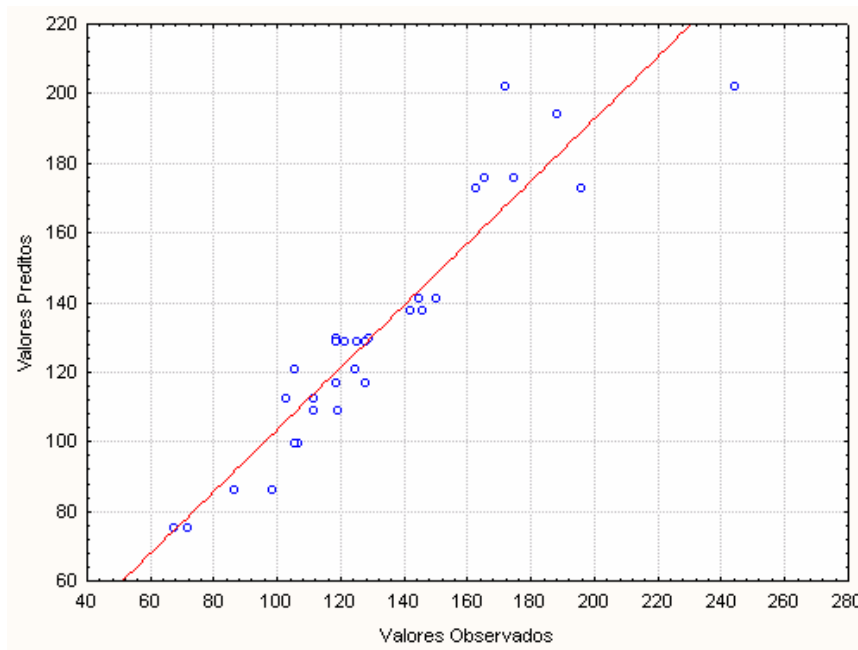


Figura 19. Gráfico de valores preditos versus valores observados.

Adicionalmente, os gráficos, normal dos resíduos e de resíduos versus valores preditos (Figura 20), permitem perceber que os resíduos têm distribuição normal, e sua distribuição aleatória permite considerar a variância constante. Ainda neste ponto o modelo não está otimizado. O número de fatores a estudar foi reduzido a dois, os quais de acordo com os resultados exercem efeitos contrários sobre o sinal fosforescente do CBZ. No novo planejamento, um aumento da

concentração do KI é sugerido em prol da maximização do sinal, assim como o uso de concentrações menores das já avaliadas são propostas para o Na_2SO_3 .

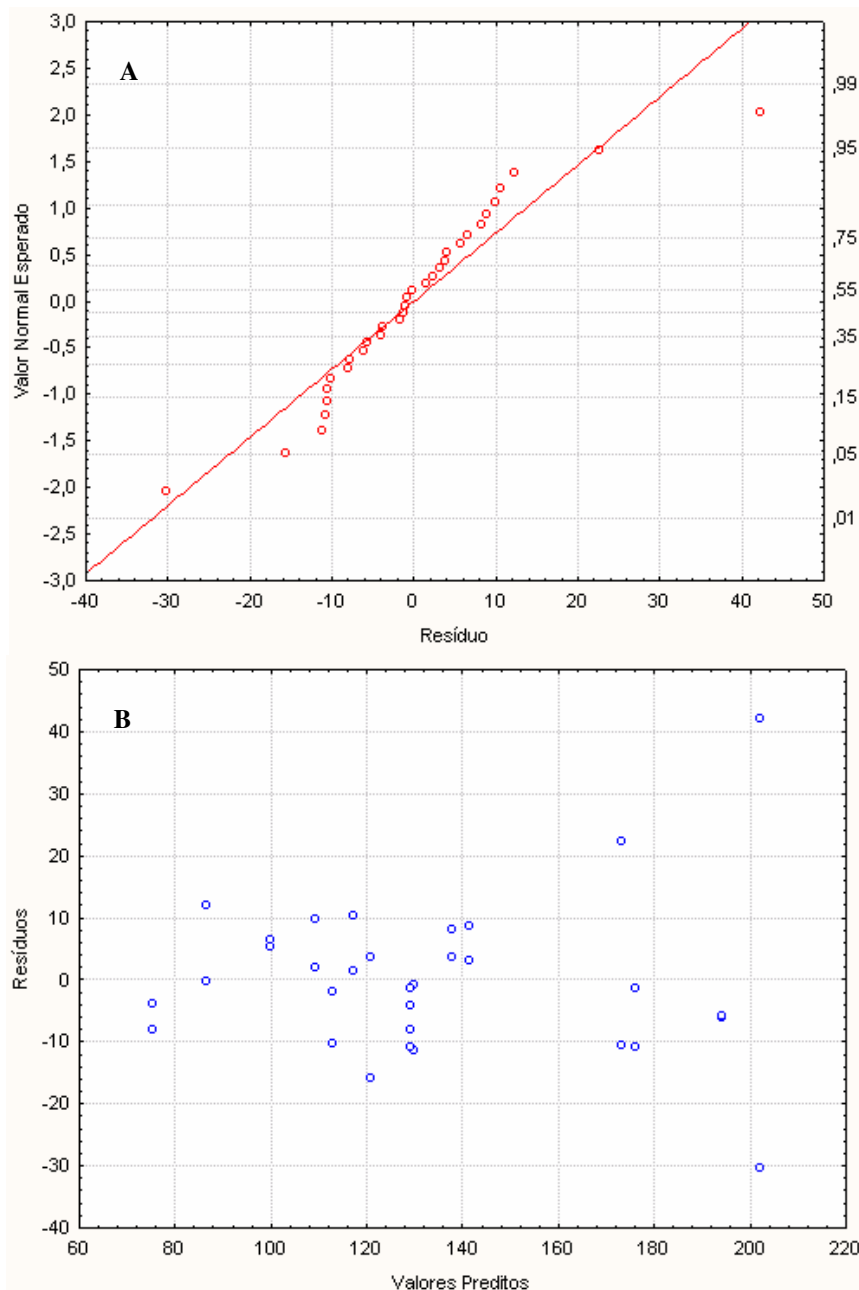


Figura 20. (A) Gráfico normal dos resíduos. (B) Gráfico de resíduos versus valores preditos.

Como passo seguinte, o planejamento fatorial composto central foi realizado com o alvo de verificar a existência de termos quadráticos significativos no modelo de regressão. Nesse tipo de planejamento, dois parâmetros devem ser especificados, sendo o primeiro a distância α a partir do centro do planejamento e o segundo o número de pontos centrais n_C . O valor de α foi obtido aplicando a

formula $\alpha = (n_F)^{1/4}$. Como o número de fatores neste caso é igual a 2 (n_F) o valor de $\alpha = 1,414$. No caso de n_C foram escolhidos 5 para ter uma boa estimativa do erro experimental.

Uma representação esquemática deste tipo de planejamento se apresenta Figura 21. Na mesma são mostrados os valores codificados deste planejamento considerando dois fatores, do KI e concentração de Na_2SO_3 .

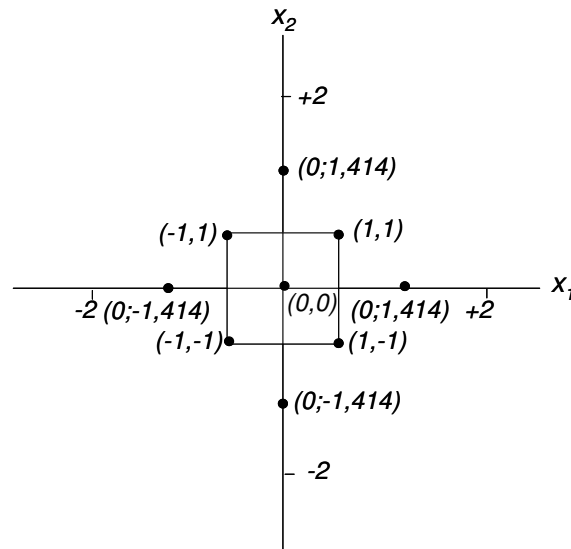


Figura 21. Pontos experimentais para o planejamento composto central.

Na Tabela 12, se apresentam os valores normais correspondentes do planejamento fatorial composto central. O valor associado ao pH corresponde ao valor médio da faixa analisada no planejamento anterior. No caso do tipo de MEM foi escolhida a do álcool isopropílico por seu efeito positivo sobre o sinal fosforescente do CBZ.

Tabela 12. Valores normais das variáveis consideradas no planejamento composto central.

Variável	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
[KI] mol L ⁻¹	2,19	2,50	2,75	3,50	3,81
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,0005	0,0030	0,009	0,015	0,0175
pH	7,6				
Tipo de MEM	2-P				

A matriz de planejamento foi construída fazendo todas as combinações possíveis entre os níveis dos dois fatores, neste caso, seguindo o modelo do composto central. Na Tabela 13 a seguir se mostra a matriz analisada.

Tabela 13. Matriz do planejamento composto central.

Ensaio	[KI]	[Na ₂ SO ₃]	Intensidade
1	1	-1	201,7
2	-1,414	0	147,3
3	1	-1	174,51
4	1,414	0	184,35
5	-1	1	125,91
6	1,414	0	203,25
7	0	1,414	128,01
8	1	1	156,1
9	0	0	187,05
10	1	1	156,12
11	0	1,414	3,41
12	0	-1,414	3,43
13	0	1,414	150,88
14	0	-1,414	3,47
15	-1,414	0	199,53
16	-1	1	180,09
17	-1	-1	247,98
18	0	0	207,4
19	0	1,414	154,93
20	0	0	214,02
21	1	1	197,02
22	1	-1	260,86
23	1,414	0	225,57
24	-1,414	0	235,33
25	-1	-1	280,48
26	-1	1	194,22
27	-1	-1	285,22

Observando-se a Tabela 14, percebe-se que só o termo quadrático associado ao fator concentração de Na₂SO₃ é o único que tem importância estatística ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, e de $p < 0,05$).

Tabela 14. Resultados da ANOVA do planejamento composto central.

ANOVA; Var.:Intensidade; R-sqr=,3774; Adj.: 2 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error= DV: Intensidade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)[KI] (L)	638,1	1	638,10	0,39638	0,536874
[KI] (Q)	1953,0	1	1953,03	1,21320	0,285210
(2)[NaSO ₃] (L)	838,7	1	838,67	0,52098	0,479698
[NaSO ₃] (Q)	18421,8	1	18421,77	11,44345	0,003315
1L by 2L	2871,5	1	2871,54	1,78378	0,198330
Lack of Fit	60269,1	3	20089,69	12,47955	0,000119
Pure Error	28976,6	18	1609,81		
Total SS	143342,4	26			

Os efeitos e os coeficientes do modelo de regressão, em função das variáveis escalonadas, são dados a seguir:

Tabela 15. Estimativa dos efeitos e coeficientes do modelo de regressão para o planejamento composto central.

Effect Estimates; Var.:Intensidade; R-sqr=, 2 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error= DV: Intensidade					
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(18)	p	
Mean/Interc.	202,7829	23,16469	8,75397	0,000000	
(1)[KI] (L)	-10,3134	16,38115	-0,62959	0,536874	
[KI] (Q)	29,9439	27,18580	1,10146	0,285210	
(2)[NaSO ₃] (L)	-12,0779	16,73338	-0,72179	0,479698	

De acordo com os dados apresentados acima a equação que descreve o modelo é:

$$\text{Intensidade} = 203 - 46 x_2^2$$

em que x_2 =concentração de Na₂SO₄

No teste da falta de ajuste do modelo ou *lack of fit* as réplicas do ponto central foram consideradas pelo que o modelo de análise considerou o erro puro. Na Tabela de ANOVA pode observar-se este termo destacado em negrito indicando, que a variabilidade residual foi significativamente maior que o erro puro, o qual denota que o modelo não está bem ajustado. O teste F foi realizado

para confirmar esta falta de ajuste. Pode-se constatar o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ ($12,48 > 3,16$), o que indicam que os dados não se ajustam a um modelo quadrático.

A superfície de resposta e o diagrama de contorno podem ser finalmente visualizados na Figura 22. Estes dois gráficos servem para definir a região de máximo sinal fosforescente para o CBZ. Pode-se observar que a intensidade aparentemente apresenta dois máximos, gerando um ponto de sela. O sinal parece ser mais sensível a mudanças na concentração do KI do que à concentração do Na_2SO_3 .

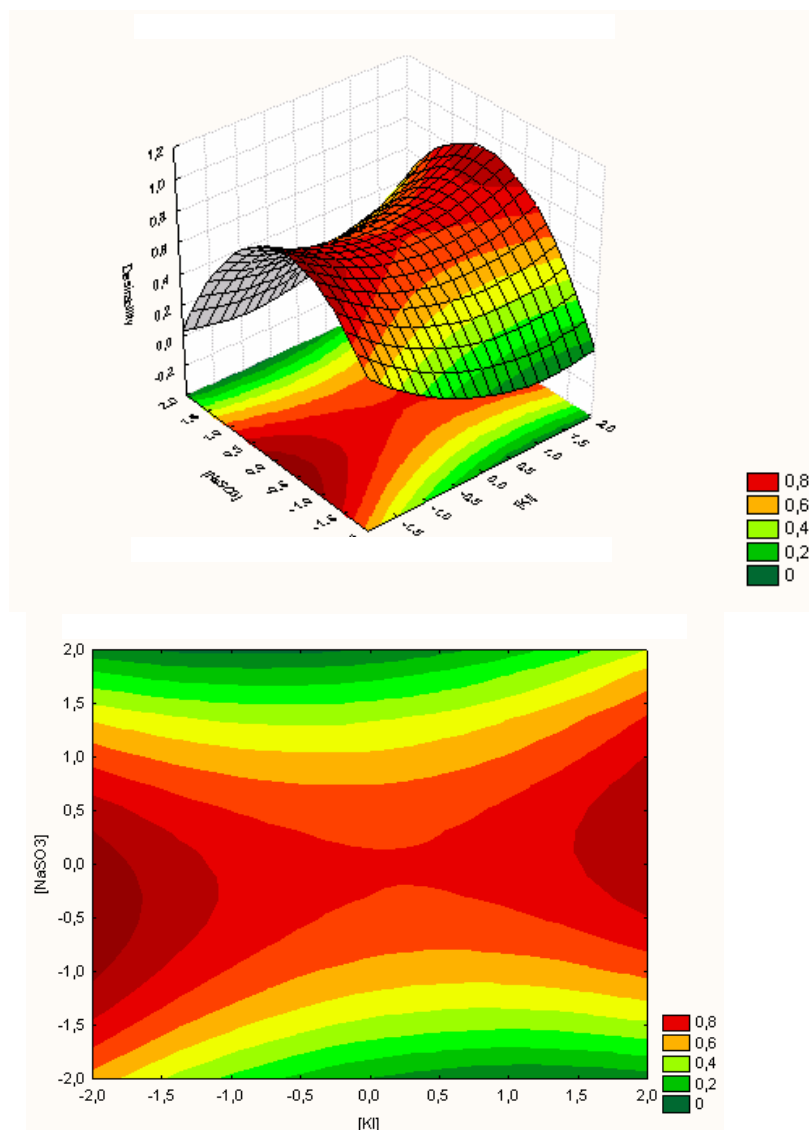


Figura 22. Superfície de resposta e diagrama de contorno para o planejamento composto central.

Os níveis ótimos destes fatores podem ser obtidos pela opção do programa Estatística nomeada *Profiles for Predicted Values and Desirability* (Figura 23). Dois grupos de gráficos podem ser observados. Nos localizados acima se apresentam os valores desejáveis para os dois fatores de interesse considerando o limite de confiança respectivo ao valor ótimo. No segundo grupo, apresentam-se só as tendências reveladas pelos fatores onde a linha azul pespontada representa o valor ótimo. Os gráficos correspondentes indicam que um estudo univariado da concentração de KI ainda precisa ser realizado, pois a partir destes resultados não se pode sugerir o melhor valor. Já no caso da concentração de Na_2SO_3 , o intercepto das linhas pespontadas com o máximo do gráfico assinala claramente sua concentração ótima, a qual corresponde ao valor codificado 0, ou normal de $0,009 \text{ mol L}^{-1}$.

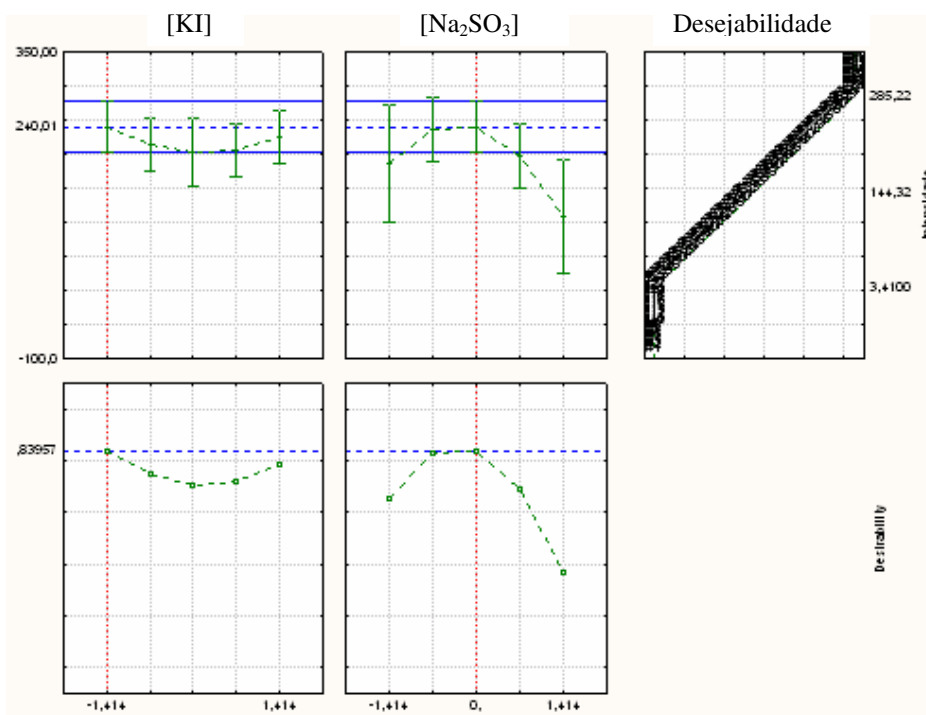


Figura 23. Gráfico de desejabilidade para o planejamento composto central.

O estudo univariado da concentração de KI cobriu uma faixa de concentração de 1 mol L^{-1} até 4 mol L^{-1} baseado nos resultados do planejamento fatorial. Como se pode observar na Figura 24, a concentração ótima achada foi $2,75 \text{ mol L}^{-1}$, a qual por razões de praticidade foi aproximada a 3 mol L^{-1} .

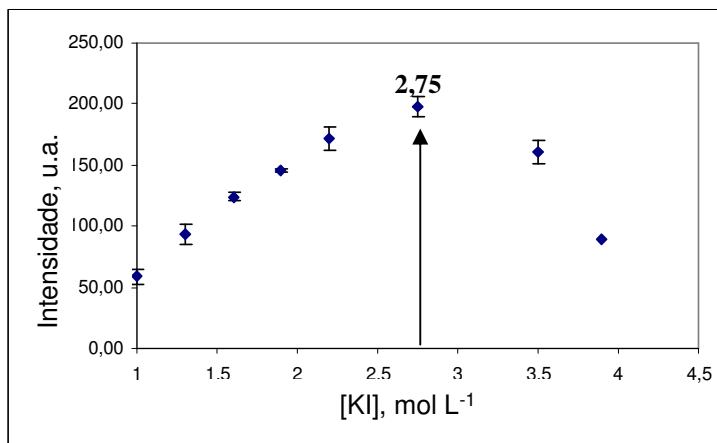


Figura 24. Gráfico de concentração de KI versus intensidade.

O modelo que melhor representa o sistema, em função do estudo univariado apresentado anteriormente, é um polinomial de terceira ordem, o qual vem dado pela equação:

$$\text{Intensidade} = -17,887x^3 + 77,662x^2 - 10,918x + 12,421$$

Neste ponto já é possível indicar quais são as condições experimentais nas quais se espera chegar a obter máxima intensidade no sinal fosforescente do CBZ. Na Tabela 16 a seguir se reúnem os dados.

Tabela 16. Valores normais ótimos dos fatores avaliados pelo planejamento fatorial.

Fator	Valor otimizado
[KI] mol L ⁻¹	3,0
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,009
pH	7,5 (natural da solução)
Tipo de MEM	Álcool isopropílico

Nas condições otimizadas, são mostrados, na Figura 25, os espectros fosforescentes do CBZ em duas dimensões (comprimento de onda vs intensidade) e em três dimensões (comprimento de onda de excitação vs comprimento de onda de emissão vs intensidade), sendo este último obtido a partir do programa MathLab versão 6.5 release 12 PLS Toolbox.

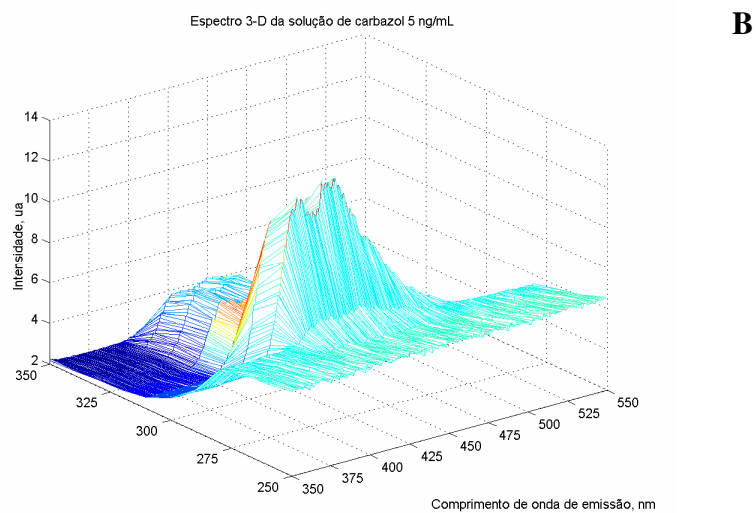
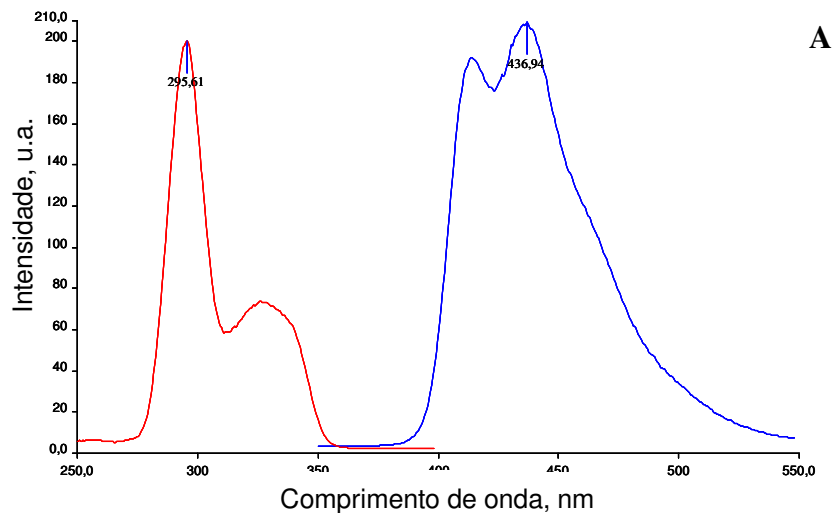


Figura 25. Espectro do CBZ nas condições otimizadas. **A**: em duas dimensões e **B**: em três dimensões.

5.3. Otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais para a determinação do DBT

Por considerar que o DBT seria caracterizado fosforimetricamente em um sistema semelhante ao do CBZ, decidiu-se na aplicação direta de um estudo multivariado para a otimização dos fatores experimentais já identificados: concentração do átomo pesado e sulfito de sódio. Adicionalmente, dada a relevância do pH sobre a eficiência da desoxigenação do meio pelo Na_2SO_3 , o mesmo também foi considerado.

5.3.1. Primeira Fase: Planejamento Fatorial 2³

Nesse estudo, foram analisados 3 fatores em 2 níveis (planejamento fatorial 2³), como resultado, um total de 24 ensaios foram realizados considerando duas réplicas. Na Tabela 17 a seguir, apresentam-se os valores codificados e normais associados a cada variável.

Tabela 17. Variáveis consideradas na primeira fase do planejamento fatorial 2³.

Variável	Níveis	
	-1	+1
[KI] mol L ⁻¹	0,6	3,5
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,006	0,015
pH	4	12
Tipo de MEM	2-P	

A matriz de planejamento foi construída fazendo todas as combinações possíveis entre os níveis dos três fatores seguindo o modelo recomendado por Box & Hunter, resultando nos valores indicados na Tabela 18.

Tabela 18. Matriz do planejamento fatorial 2³.

Ensaio	[KI] mol L ⁻¹	[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	pH	Intensidade		
				I	II	III
1	-1	-1	-1	38,64	25,97	20,40
2	1	-1	-1	44,72	26,22	35,82
3	-1	1	-1	45,20	47,13	42,87
4	1	1	-1	29,35	29,26	25,29
5	-1	-1	1	36,39	14,81	12,15
6	1	-1	1	20,01	39,73	36,72
7	-1	1	1	19,98	25,03	21,29
8	1	1	1	22,82	21,74	21,65

Para realizar a análise estatística dos dados foram usadas as mesmas condições que no planejamento fatorial do CBZ. Lembrando, foram usados os valores codificados dos fatores nos dois níveis a serem avaliados e se assumiu como primeiro modelo a testar o linear. Neste caso também se selecionou o

modelo que inclui interações de terceira ordem. O tipo de erro escolhido para o ANOVA foi erro puro por ter sido considerado duas réplicas autênticas na definição do tamanho da amostra. Nas Tabelas 19 e 20 se mostram os resultados obtidos. Segundo os quais pode se evidenciar que só o pH e a interação entre as concentrações de KI e Na₂SO₃ que possuem significância estatística ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, e de $p < 0,05$) sobre a intensidade do sinal fosforescente do DBT.

Tabela 19. Resultados da ANOVA para o planejamento fatorial 2³.

ANOVA; Var.:DV_1; R-sqr=,59507; Adj:.,4179 2**(3-0) design; MS Pure Error=59,97265 DV: DV_1					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)[KI]	0,502	1	0,5017	0,008366	0,928260
(2)[Na2SO3]	0,000	1	0,0000	0,000001	0,999379
(3)pH	585,588	1	585,5876	9,764244	0,006532
1 by 2	470,378	1	470,3776	7,843202	0,012826
1 by 3	163,125	1	163,1252	2,719993	0,118590
2 by 3	124,352	1	124,3515	2,073471	0,169160
1*2*3	66,168	1	66,1676	1,103296	0,309151
Pure Error	959,562	16	59,9727		
Total SS	2369,674	23			

Tabela 20. Estimação dos efeitos para o planejamento fatorial 2³.

Effect Estimates; Var.:DV_1; R-sqr=,59507; Adj:.,41791 (PF1 D 2**(3-0) design; MS Pure Error=59,97265 DV: DV_1						
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(16)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	29,2996	1,58078	18,5349	0,00000	25,948	32,6507
(1)[KI]	0,2892	3,16156	0,0915	0,92826	-6,413	6,9914
(2)[Na2SO3]	0,0025	3,16156	0,0008	0,99938	-6,700	6,7047
(3)pH	-9,8792	3,16156	-3,1248	0,00653	-16,581	-3,1770
1 by 2	-8,8542	3,16156	-2,8006	0,01283	-15,556	-2,1520
1 by 3	5,2142	3,16156	1,6492	0,11859	-1,488	11,9164
2 by 3	-4,5525	3,16156	-1,4400	0,16916	-11,255	2,1497
1*2*3	3,3208	3,16156	1,0504	0,30915	-3,381	10,0230

Esse efeito foi também observado nitidamente no gráfico de Pareto (Figura 26). O gráfico apresenta na hierarquia dos efeitos, o pH como efeito principal. As concentrações de KI e Na₂SO₃, assim como as interações de segunda e terceira ordem são majoritariamente negligenciáveis, menos a interação entre as concentrações do átomo pesado e seqüestrador de oxigênio.

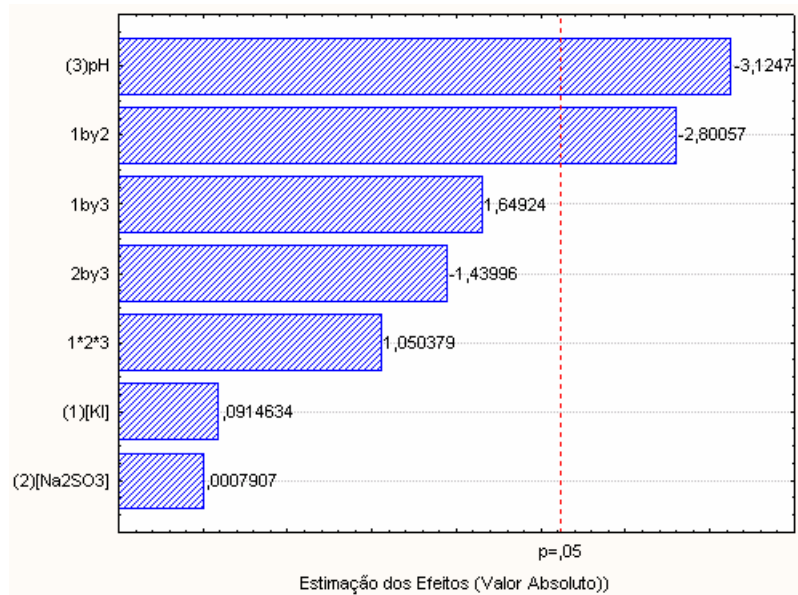


Figura 26. Diagrama de Pareto correspondente à primeira fase do planejamento fatorial 2^3 do DBT.

Embora só exista um efeito principal o modelo linear na faixa de aplicação não é o melhor para descrever seu impacto sobre a intensidade do sinal do DBT. Esta falta de ajuste pode ser observada graficamente a partir do gráfico de valores preditos contra valores observados (Figura 27).

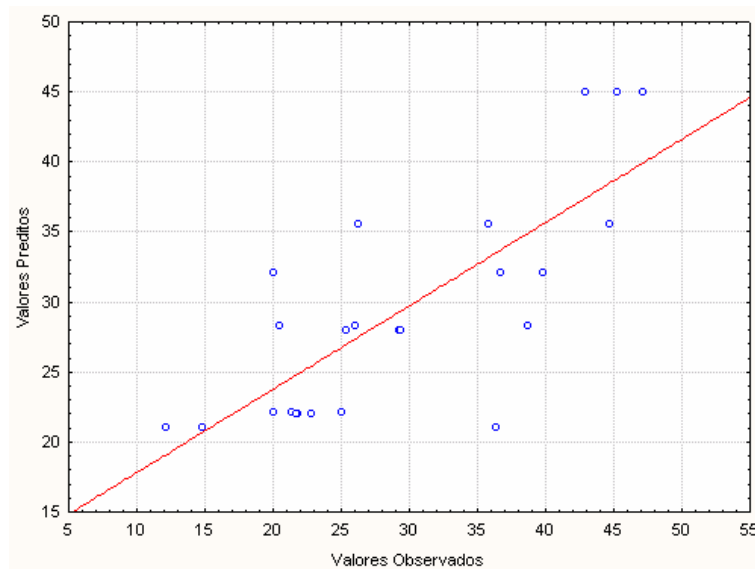


Figura 27. Gráfico de valores preditos versus valores observados.

Devido a certas dúvidas surgidas com respeito ao volume de solução tampão a se utilizar e com relação à surpreendente inexistência de relevância dos fatores relacionados à concentração de átomo pesado e de sulfito de sódio, foram realizados estudos univariados para os fatores para avaliar melhor a faixa de aplicação antes de continuar com o planejamento fatorial.

5.3.2. Estudo univariado dos fatores

Os resultados dos estudos univariados dos fatores que se apresentam a seguir não confirmam os resultados obtidos no planejamento fatorial anteriormente descrito. Como se pode ver na Figura 28, a qual reúne os gráficos de avaliação da variação do sinal com o incremento da concentração de átomo pesado e o de aumento do seqüestrador de oxigênio. Observa-se que o sinal mostra um incremento significativo na sua intensidade a partir de KI acima de 3 mol L⁻¹ e a diminuição da intensidade fosforescente do DBT em concentrações de sulfito maiores de 0,005 mol L⁻¹. Este conflito unicamente poderia ser explicado pelas possíveis interações entre as duas variáveis.

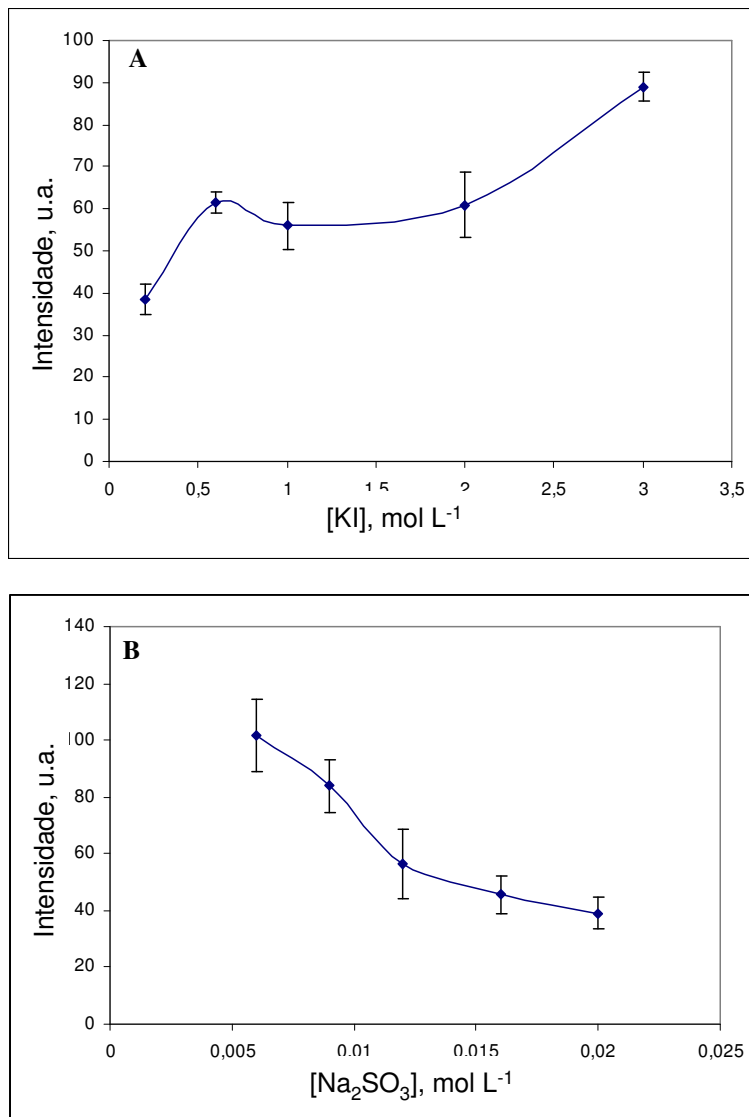


Figura 28. (A) Gráfico de concentração de KI versus intensidade. (B) Gráfico de concentração de Na₂SO₃ vs intensidade.

No caso do volume da solução tampão, se notou que o sinal fosforescente não é influenciado por este fator, no entanto manter o pH em 6,00 depende dramaticamente do volume de solução tampão utilizado (Figura 29).

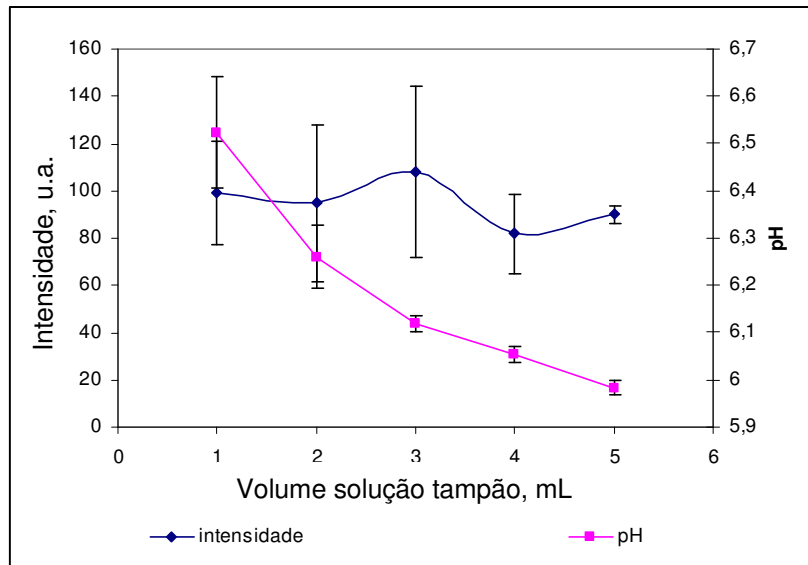


Figura 29. Avaliação do efeito do pH sobre o sinal fosforescente do DBT e do volume da solução-tampão sobre o pH da MED.

De acordo com o gráfico, o melhor volume de tampão a utilizar é igual a 5 ml. O efeito do volume da solução tampão não foi avaliado durante o estudo do CBZ, porque foram evidenciados sinais relativamente mais intensos obtidos no pH natural da MED.

Para avaliar indiretamente o efeito do volume da solução-tampão uma segunda fase do planejamento fatorial foi realizada considerando uma faixa de aplicação menor. A seguir se descrevem e discutem os resultados obtidos.

5.3.3. Segunda Fase: Planejamento Fatorial 2²

Foi definido um planejamento fatorial 2² nesta segunda fase. O pH e a concentração do sequestrador de oxigênio foram os únicos fatores a serem estudados. A razão da escolha é a interdependência que existe entre estes fatores. Vale lembrar que, baseado no conhecimento anterior, a MEM é sempre do tipo álcool isopropílico. A seguir apresentam-se na Tabela 21 os valores codificados e normais das variáveis estudadas. A seguir, a Tabela 22 contém a matriz de dados utilizada na análise estatística.

Tabela 21. Variáveis consideradas na segunda fase do planejamento fatorial (repetição).

Variável	Níveis	
	-1	+1
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,006	0,015
pH	6	11

Tabela 22. Matriz do planejamento fatorial 2².

Ensaio	[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	pH	Intensidade		
			I	II	III
1	-1	-1	31,73	20,46	43,69
2	-1	-1	78,03	72,82	43,27
3	1	-1	31,07	27,96	11,74
4	1	-1	58,22	57,55	59,61

Foi aplicado o teste de Dixon e foram detectados como outliers os valores destacados em negrito, os quais não foram considerados na análise estatística. A seguir nas Tabelas 23 e 24 são apresentados os resultados referentes à ANOVA e efeitos estimados a partir da análise de variância.

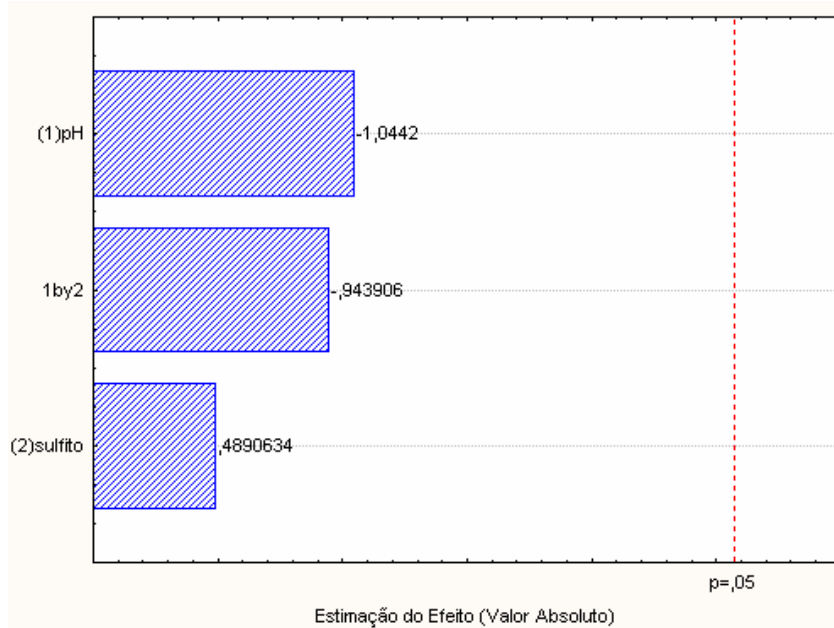
Tabela 23. Resultados da ANOVA para o planejamento fatorial 2².

Factor	ANOVA; Var.:intensidade; R-sqr=,2263; Adj:0 2 factors at two levels; MS Pure Error=422,19 DV: intensidade				
	SS	df	MS	F	p
(1)pH	460,34	1	460,339	1,09035	0,34423
(2)sulfito	100,98	1	100,982	0,23918	0,64549
1 by 2	376,16	1	376,157	0,89096	0,38856
Pure Error	2110,97	5	422,194		
Total SS	2728,40	8			

Tabela 24. Resultados da estimação dos efeitos para o planejamento fatorial 2².

Effect Estimates; Var.:intensidade; R-sqr=,2263; Adj:0, (PF3_c 2 factors at two levels; MS Pure Error=422,1937 DV: intensidade						
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	54,090	7,5612	7,1536	0,00083	34,653	73,5263
(1)pH	-15,791	15,1224	-1,0442	0,34423	-54,664	23,0826
(2)sulfito	7,396	15,1224	0,4891	0,64549	-31,478	46,2693
1 by 2	-14,274	15,1224	-0,9439	0,38856	-53,148	24,5993

Não foram observados em nenhuma das tabelas valores destacados em cinza relacionados a os dois fatores avaliados. Este resultado indica que, na faixa de variação considerada, estes fatores não têm influência estatisticamente significativa sobre o sinal fosforescente do DBT ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, e de $p > 0,05$). O qual pode ser graficamente confirmado no gráfico de Pareto mostrado a continuação (Figura 30).

Figura 30. Diagrama de Pareto correspondente à segunda fase do planejamento fatorial 2² do DBT.

Uma possibilidade de estimar quais os níveis ótimos destes fatores é a opção *Profiles for Predicted Values and Desirability* (Figura 31). Os perfis de desejabilidade são apresentados a seguir:

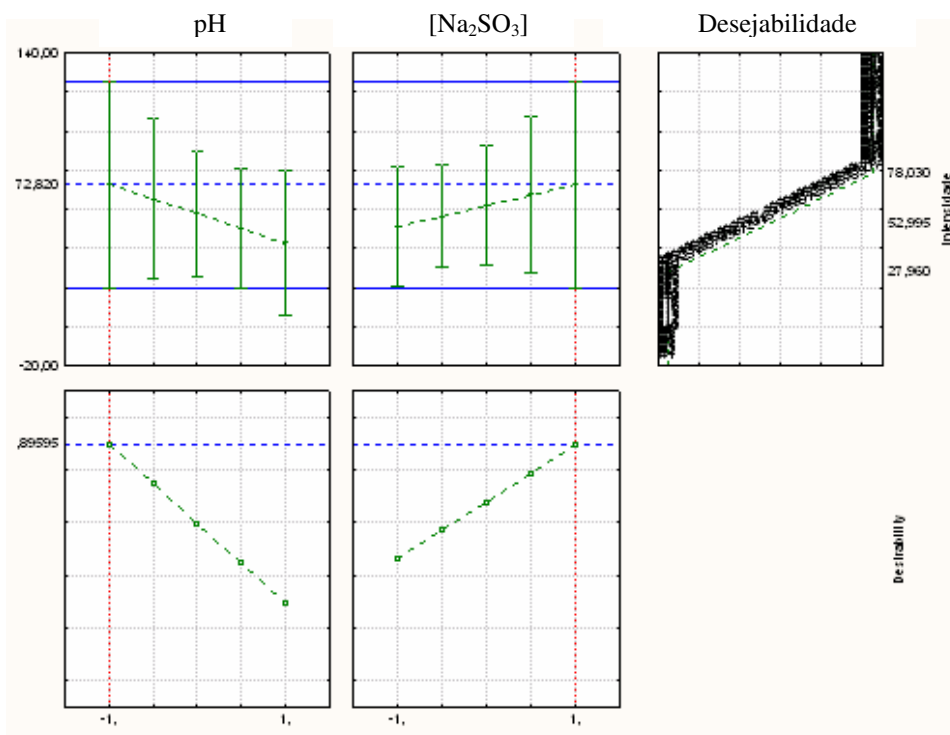


Figura 31. Perfis de desejabilidade em termos das variáveis codificadas correspondentes a segunda fase do planejamento fatorial 2^2 do DBT.

Segundo os resultados, os desvios padrões dos fatores se encontram dentro do limite de confiança do valor ótimo e a tendência seguida pelos pontos sugere, no caso do seqüestrador de oxigênio, que o nível +1 favorece a aparição de um sinal intenso para o DBT. Pelo contrário, o nível mais baixo é o recomendado para o pH. A concentração sugerida para o Na_2SO_3 é $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ a um $\text{pH} = 6,00$. Para definir o melhor modelo que representa o sistema em estudo, uma nova avaliação do pH foi realizada nestas novas condições sugeridas.

5.3.4. Estudo univariado do pH

Os resultados deste estudo confirmam o recomendado pelo programa Statistica 6.0, pois o pH onde se obtém o máximo sinal para o DBT é exatamente o mesmo sugerido na seção anterior (Figura 32).

Tentou-se definir o melhor modelo que descreva o efeito do pH sobre o sinal fosforescente do DBT, mas só os modelos polinômicos de ordem superior a 6 poderiam representar seu comportamento, pelo que nenhum modelo em concreto é sugerido.

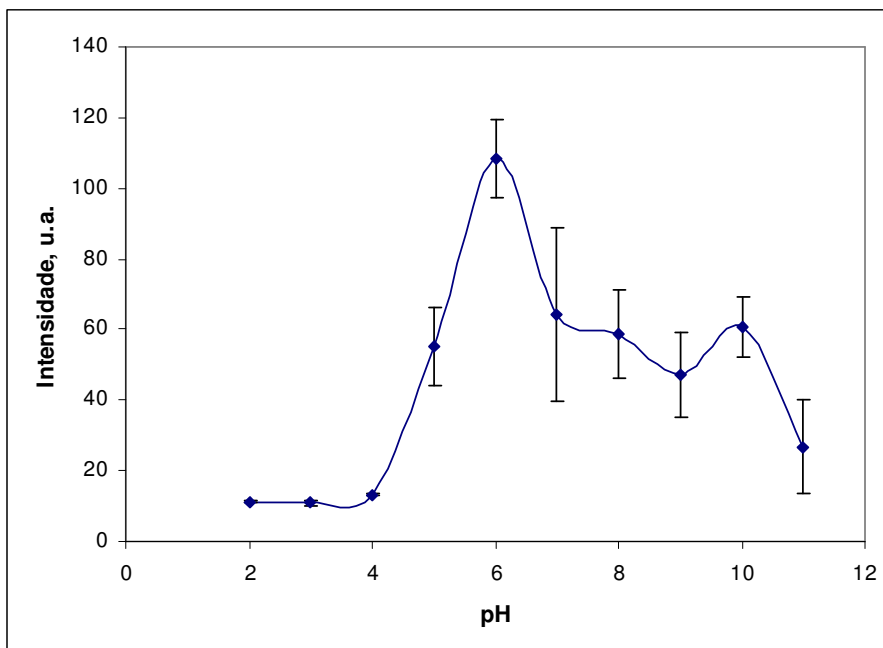


Figura 32. Estudo univariado da concentração de pH nas condições otimizadas dos outros fatores avaliados.

Neste ponto já é possível indicar quais são as melhores condições das variáveis independentes estudadas na determinação fosforimétrica do DBT. Na Tabela 25 a seguir se reúnem os dados.

Tabela 25. Valores normais ótimos dos fatores avaliados pelo planejamento fatorial.

Fator	Valor otimizado
[KI] mol L ⁻¹	1,0
[Na ₂ SO ₃] mol L ⁻¹	0,006
pH	6,00
Tipo de MEM	Álcool isopropílico

5.3.5. Otimização univariada parâmetros instrumentais

Para a otimização de parâmetros instrumentais, foi seguido o mesmo procedimento descrito na seção 5.2.1.5. Os resultados indicaram que já com um valor de 0,50 ms de tempo de retardo se tem uma atenuação quase total do sinal fosforescente do DBT. Foi escolhido um tempo de retardo igual a 0,05 ms, por garantir um ambiente livre do sinal fluorescente do próprio analito e ainda intensa magnitude do sinal do DBT. No caso do tempo de abertura, as razões entre sinal

fosforescente do DBT e o sinal de fundo permitiram selecionar como melhor *gate* 1,00 ms. Na Figura 33 se apresentam graficamente as tendências observadas para estes dois parâmetros e o espectro de potencial interferência do sinal fluorescente no sinal fosforescente com 0,01 ms de tempo de retardo.

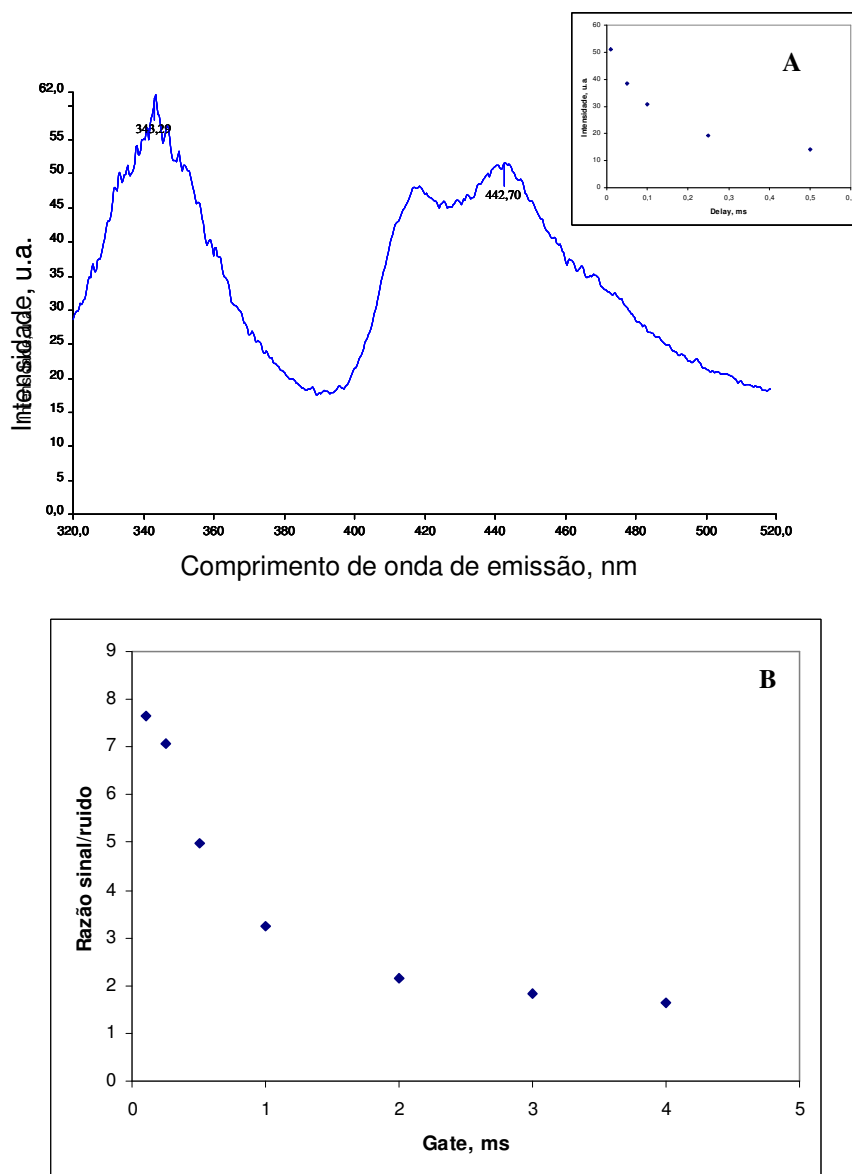
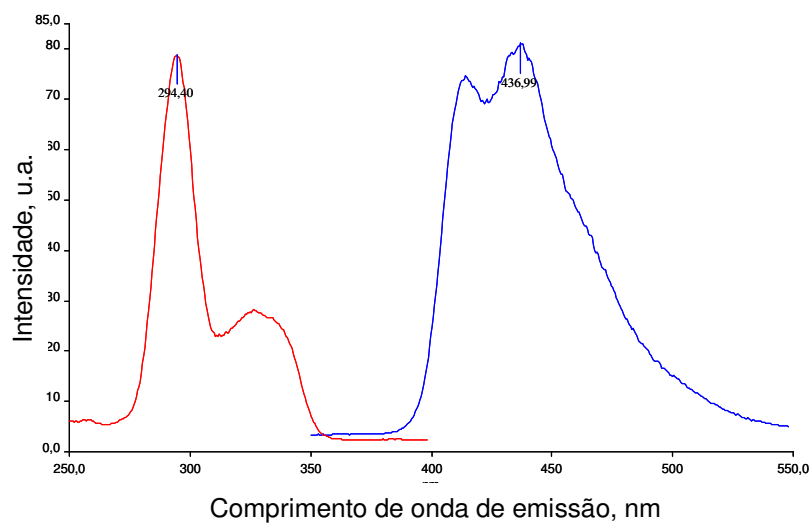
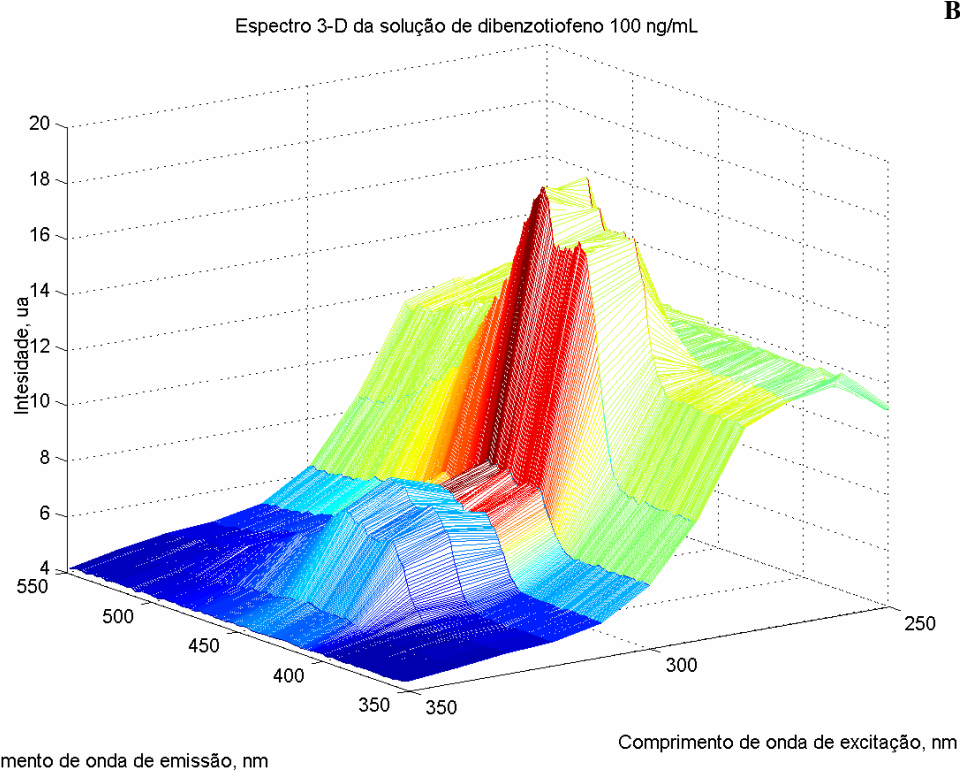


Figura 33. Avaliação da influência do tempo de retardo do detector (A) e do tempo de abertura do detector (B) na fosforescência do DBT.

Nas condições otimizadas, são mostradas na Figura 34 os espectros fosforescentes do DBT em duas dimensões (comprimento de onda vs intensidade) e em três dimensões (comprimento de onda de excitação vs comprimento de onda de emissão vs intensidade).



A



B

Figura 34. Espectro do CBZ em duas e em três dimensões nas condições otimizadas.