



**Sandra Sofia Mota Rodrigues**

# **Modelização matemática do fenómeno de dispersão em sistemas de fluxo de interface única**

Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade

**Orientador:** Professor Doutor João Luís Machado dos Santos

**Co-Orientador:** Doutor João Pedro Martins de Almeida Lopes

Porto, Junho de 2009

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação apenas para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

“Não, não tenho um caminho novo; o que  
tenho de novo é o jeito de caminhar.”

Thiago de Mello

## **Agradecimentos**

Ao longo destes dois anos de mestrado, várias foram as pessoas que me apoiaram, que ouviram as minhas lamúrias, frustrações e tristezas (sempre que regressava da escola), mas que também partilharam as minhas alegrias, méritos e conquistas. Pessoas que sentiram a perseverança e dedicação no alcance de mais um sonho! Todas elas deixaram as suas marcas e, sem dúvida, ajudaram-me a crescer como pessoa! Não posso apresentar este trabalho como completo sem antes lhes agradecer o quanto me ajudaram na sua concretização.

O meu primeiro agradecimento dirige-se à instituição que me aceitou como aluna de mestrado, a Faculdade de Farmácia, e, em particular, ao serviço de Química-Física pelo agradável ambiente de trabalho que me proporcionou e pelos meios disponibilizados para a realização do mesmo.

Agradeço em especial:

Ao Professor Doutor Costa Lima, pela minha escolha por este departamento e além disso pela sua orientação durante a realização deste trabalho. Agradeço também a paciência, disponibilidade, apoio e entusiasmo em todos os aspectos referentes ao desenvolvimento desta dissertação e o modo amigo como sempre me tratou. O seu acolhimento único e a sua exigência de qualidade fazem com que me sinta uma privilegiada por ter integrado a sua equipa.

Aos meus orientadores, Professor Doutor João Santos e Professor Doutor João Lopes, pelo apoio transmitido e interesse demonstrado, bem como pelas críticas detalhadas e sugestões essenciais à consecução desta dissertação. O trabalho aqui apresentado só foi possível conjugando as suas experiências, argumentações, opiniões, conhecimentos e visões complementares. Agradeço também a disponibilidade, simpatia e a boa disposição, sempre demonstradas.

Aos restantes Professores do Departamento de Química-Física, pela sua amabilidade, simpatia e receptividade. Não podia deixar de personalizar estes agradecimentos nas pessoas da Professora Doutora Salette Reis e Professor Doutor Rui Lapa. À primeira agradeço os ensinamentos científicos transmitidos e a boa disposição e ao

segundo deixo um agradecimento particular pela atenção que teve para comigo desde o primeiro contacto e pela sua simpatia, amabilidade e ajuda.

A todos os meus professores deste mestrado e à Professora Doutora Beatriz Oliveira, coordenadora do curso, pelo que me ensinaram e sobretudo pela metodologia de investigação que me inculcaram, o meu muito obrigada.

À D. Manuela, pela simpatia e apoio demonstrados e, também, pelos chocolates e capuccinos que me aqueceram nos dias mais frios.

Não podia esquecer os diversos amigos que caminharam ao meu lado durante estes dois intensos anos estando sempre presentes para o melhor e para o ... “menos bom”. Aos amigos do passado, presente e futuro um muito obrigada por TUDO, estarão sempre nas minhas reminiscências e na minha vida.

A todos os colegas de Química-Física pela forte solidariedade com que me acolheram e me têm continuamente encorajado a seguir em frente. Muito obrigada por todo o apoio e incentivo.

Um beijinho especial à Mafalda, pela sua amizade e ajuda disponibilizada desde sempre e, também, pelas leituras críticas que fez deste trabalho. Tu sabes tudo, amiga! A tua ajuda não tem fronteiras! Ao Jorge pela paciência e disponibilidade permanente demonstrada, mesmo depois das 18 e 45! Vocês foram os meus Anjinhos da Guarda! Os meus agradecimentos para convosco são inefáveis! À Karine agradeço a ajuda e companhia solidária e amiga no laboratório! Ao André, à Marieta, à Cláudia Nunes e à Cristina agradeço o companheirismo, o apoio e a amizade.

À Cláudia Carneiro, colega e amiga de mestrado, obrigada pela cumplicidade, pela partilha de confidências, pelo carinho, pela força e ânimo e pela amizade que se manterá, mesmo que os nossos caminhos se separem. À Rita pelo apoio nos momentos difíceis, pelo carinho demonstrado, pela boa disposição e pela amizade gerada.

A todas as pessoas que passaram e deixaram uma palavra de conforto, esperança, sabedoria e energia.

Aos meus pais e à minha irmã, com os quais aprendi a viver com energia, entusiasmo e empatia, agradeço o carinho, amor, estímulo e apoio incondicional em todas as fases da minha vida. Ao marido da minha irmã! Obrigada pela paciência e por suportarem tantas ausências físicas! Um beijinho muito ternurento para a Loloi que é uma “avó” muito querida! Ao Lúcio por me encorajar a ir atrás dos meus sonhos. Obrigada por confiares e acreditares em mim! Obrigada por estares sempre comigo!

Por último quero agradecer a uma amiguinha muito especial, a Gigi, por ser das melhores companhias que alguém pode ter.

Enfim, não consigo exprimir o quanto considero difícil nomear apenas algumas pessoas a quem gostaria de agradecer. Acredito que se quiser ser justa, terei que agradecer a todos os que atravessaram o meu caminho. Li recentemente numa tese um provérbio que expressa com a máxima veracidade o que sinto:

“When one is blessed with too many people to thank, one should thank God!”

Bem-haja!

Sofia

## **Resumo**

Este trabalho propõe a optimização da mais recente estratégia de gestão de fluidos, designada por análise em fluxo com interface única (SIFA), usando modelos matemáticos. A metodologia SIFA representa uma inovação relativamente à noção tradicional de análise em fluxo contínuo. Esta metodologia não implica a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens analíticas, baseando-se na interpenetração entre amostra e reagente numa interface única de reacção. O desenvolvimento desta reacção depende tanto da penetração mútua das zonas adjacentes de amostra e reagente na interface, como do estabelecimento de gradientes de concentração.

Os parâmetros estimados a partir dos perfis experimentais de SIFA (declive máximo, largura da interface e coeficiente de dispersão axial) foram estimados através dos parâmetros físicos do sistema. Para isso foram testados modelos distintos baseados na regressão linear múltipla (MLR) e em redes neuronais artificiais (ANN). Foi ainda proposto um modelo multiplicativo para estimativa do coeficiente de dispersão axial. As características dos sistemas que serviram de base a estes estudos foram determinadas a partir de um desenho experimental D-óptimo, construído com três propriedades do tubo reactor (comprimento, configuração e diâmetro interno), o volume da célula de fluxo e o caudal.

Neste estudo foi utilizada como amostra uma solução de um composto corado, o verde de bromocresol e as medidas de absorvância foram realizadas a 614 nm.

Os resultados demonstraram que os modelos linear e não-linear são capazes de estimar o declive máximo e a largura da interface com coeficientes de determinação superiores a 0.96. Relativamente ao coeficiente de dispersão axial, o coeficiente de determinação foi superior a 0.85 para o modelo MLR e superior a 0.91 para o modelo ANN. Não foram observadas diferenças significativas entre os modelos linear e não-linear em termos de exactidão e precisão para o declive máximo e largura da interface. No entanto, para o coeficiente de dispersão axial o modelo ANN mostrou ser mais exacto, apresentando coeficientes de determinação mais elevados. O modelo baseado na dispersão axial da amostra mostrou boa concordância entre os valores experimentais e os previstos.

### **PALAVRAS-CHAVE:**

SIFA; Optimização; Regressão linear múltipla; Redes neuronais artificiais; Modelação matemática

## **Abstract**

This work aims at the optimization of the recently proposed fluid management Single Interface Flow Analysis (SIFA), using mathematical models. The SIFA methodology represents an innovation regarding the traditional notion of continuous flow analysis. This methodology does not require the insertion of defined volumes of sample and reagents in the analytical path, based on the interpenetration between sample and reagent in a single interface-reaction. The development of this reaction depends on the mutual penetration of the adjacent segments of the sample and reagent at the interface as the establishment of concentration gradients.

The estimated parameters from the experimental profiles of SIFA (maximum slope, interface width and axial dispersion coefficient) were estimated from the physical parameters of the system. For that, different models were tested based on multiple linear regression (MLR) and artificial neural networks (ANN). It was also proposed a multiplicative model to estimate the axial dispersion coefficient. The systems characteristics that formed the basis of these studies were determined from a D-optimal experimental design, built with three properties of the reactor coil (length, shape and inner diameter), the volume of the flow-cell and flow rate.

Bromocresol green was used as the analyte in the sample solution, with the absorbance measurements being made at 614 nm.

Results showed that the linear and non-linear models were able to estimate the maximum slope and the interface width with coefficients of determination exceeding 0.96. For the axial dispersion coefficient, the coefficient of determination was above 0.85 for the MLR model and above 0.91 for the ANN model. There were no significant differences between the linear and non-linear models in terms of accuracy and precision for the maximum slope and interface width. However, for the axial dispersion coefficient, the ANN model proved to be less biased, providing higher values for the coefficient of determination. The axial dispersion model showed good agreement between experimental and estimated values.

## **KEYWORDS**

SIFA; Optimization; Multivariate linear regression; Artificial neural networks; Mathematical modeling

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas .....	xii
Abreviaturas e símbolos.....	xiii
Objectivos .....	1
1. Características das interfaces em sistemas de análise em fluxo contínuo.....	2
1.1 Introdução .....	2
1.2 Métodos automáticos de análise.....	2
1.2.1 Métodos descontínuos .....	3
1.2.2 Métodos robotizados .....	3
1.2.3 Métodos de fluxo contínuo .....	3
1.3 As interfaces em análise por injeção em fluxo (FIA) .....	5
1.4 As interfaces em análise por injeção sequencial (SIA).....	8
1.5 As interfaces em sistemas baseados no conceito de multicomutação (MCFA) .....	14
1.6 As interfaces em sistemas baseados na estratégia multiseringa (MSFIA).....	18
1.7 As interfaces em sistemas de fluxo multi-impulsão (MPFS).....	21
1.8 A interface em fluxo com interface única (SIFA).....	24
2. Modelação matemática .....	29
2.1 Aspectos gerais.....	29
2.2 Modelação mecanística.....	31
2.2.1 Subsistemas de transferência de massa .....	31
2.3 Modelação empírica .....	36
2.3.1 Regressão linear múltipla (MLR) .....	36
2.3.2 Redes neuronais artificiais (ANN).....	39
3. Parte experimental .....	47
3.1 Soluções .....	47
3.2 Componentes do sistema de fluxo.....	47
3.2.1 Dispositivos de propulsão e inserção .....	48
3.2.2 Dispositivo comutador .....	48

3.2.3 Tubagem e outros componentes da montagem.....	49
3.2.4 Sistema de detecção .....	49
3.2.5 Controlo informático do sistema .....	50
3.3 Montagem de fluxo.....	50
3.4 Desenho experimental.....	51
3.5 Processamento do sinal da interface.....	55
3.6 Modelação matemática .....	56
3.6.1 Método mecanístico .....	57
3.6.2 Regressão linear múltipla .....	57
3.6.3 Redes neuronais artificiais .....	58
3.6.4 Modelo multiplicativo .....	59
4. Resultados e discussão.....	60
4.1 Sinais analíticos SIFA.....	60
4.2 Estimativa dos parâmetros $S_{max}$ , $W$ e $D_L$ , $\alpha$ e $\beta$ a partir dos sinais analíticos.....	61
4.3 Modelação dos parâmetros analíticos .....	64
4.3.1 Modelação do $S_{max}$ .....	66
4.3.2 Modelação da largura da interface ( $W$ ).....	72
4.3.3 Modelação de $D_L$ .....	78
5. Conclusão .....	86
Referências Bibliográficas .....	88

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática de uma montagem FIA	6
Figura 1.2 - Representação esquemática do perfil da amostra	6
Figura 1.3 - Representação esquemática dos fenómenos de dispersão	7
Figura 1.4 - Representação esquemática de uma montagem SIA	9
Figura 1.5 - Representação da sobreposição mútua de zonas	11
Figura 1.6 - Fotografia e representação de um módulo de análise LOV	13
Figura 1.7 - Representação esquemática de um MCFA	15
Figura 1.8 - Representação esquemática uma válvula solenóide	16
Figura 1.9 - Representação esquemática do perfil de inserção amostra e reagente	17
Figura 1.10 - Representação esquemática de uma multiseringa	19
Figura 1.11 - Representação esquemática de um sistema MPFA	22
Figura 1.12 - Representação esquemática do fluxo pulsado	22
Figura 1.13 - Representação esquemática de um sistema SIFA	25
Figura 1.14 - Representação esquemática do sinal analítico num sistema SIFA	26
Figura 2.1 - Curva de distribuição RTD	33
Figura 2.2 - Analogia de um neurónio humano com um neurónio artificial	41
Figura 2.3 - Diferentes tipos de funções de activação	42
Figura 2.4 - Tipos de redes neuronais	43
Figura 2.5 - Treino em função da capacidade de generalização da rede	46
Figura 3.1 - Válvula solenóide de 3 vias	49
Figura 3.2 - Esquema da montagem de fluxo de interface única	51
Figure 3.3 - Sinal da interface (linha a cheio) e correspondente primeira derivada	56
Figura 4.1 - Sinais analíticos obtidos para as 60 experiências	61
Figura 4.2 - Sinais analíticos obtidos para o ajuste do modelo de dispersão axial	64
Figura 4.3 - Superfície de resposta para o modelo de $S_{max}$	68
Figura 4.4 - Correlação entre os valores experimentais e previstos para o modelo de $S_{max}$	69
Figura 4.5 - Média de $r^2$ para diferente número de nodos da camada oculta para o modelo de $S_{max}$	70
Figura 4.6 - Topologia da rede neuronal otimizada para $S_{max}$	71
Figura 4.7 - Correlação entre os valores experimentais e previstos para o modelo de $W$	72
Figura 4.8 - Resíduos normalizados antes da transformação da variável $W$	73

Figure 4.9 - Superfície de resposta para o modelo de W	74
Figura 4.10 - Correlação entre os valores experimentais e previstos para o modelo MLR de $\log(W)$	76
Figura 4.11 - Média de $r^2$ para diferente número de nodos da camada oculta para o modelo de Log (W)	77
Figura 4.12 - Topologia da rede neuronal otimizada para Log (W)	77
Figura 4.13 - Histogramas para os valores de $D_L$	79
Figure 4.14 - Superfície de resposta para o modelo de Log ( $D_L$ )	81
Figura 4.15. Correlação entre os valores experimentais e previstos para o modelo MLR de Log ( $D_L$ )	82
Figura 4.16 - Média de $r^2$ para diferente número de nodos da camada oculta para o modelo de Log ( $D_L$ )	83
Figura 4.17 - Topologia da rede neuronal otimizada para $D_L$	83

## Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Estudos publicados sobre aplicações de redes neuronais	40
Tabela 2.2 - Analogia entre neurónios biológicos e neurónios artificiais	41
Tabela 3.1 - Resumo dos parâmetros controlados e correspondentes níveis variação	52
Tabela 3.2 - Experiências produzidas através desenho experimental	53
Tabela 4.1 - Estimativa dos parâmetros $S_{max}$ , $W$ , $D_L$ , $\alpha$ e $\beta$	61
Tabela 4.2 - Coeficientes de regressão do modelo MLR da variável $S_{max}$	67
Tabela 4.3 - Média $r^2$ de calibração e teste para o modelo MLR de $S_{max}$	69
Tabela 4.4 - Média de $r^2$ de calibração e teste, para o modelo ANN de $S_{max}$	71
Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão estimados do modelo MLR da variável Log ( $W$ )	74
Tabela 4.6 - Média de $r^2$ de calibração e teste para o modelo MLR de Log ( $W$ )	75
Tabela 4.7 - Média de $r^2$ de calibração e teste, para o modelo ANN de Log ( $W$ )	78
Tabela 4.8 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo MLR da variável Log ( $D_L$ )	80
Tabela 4.9 - Média $r^2$ de calibração e teste para o modelo MLR de Log ( $D_L$ )	81
Tabela 4.10 - Média de $r^2$ de calibração e teste, para o modelo ANN de $D_L$	84
Tabela 4.11 - Coeficientes de regressão do modelo multiplicativo da variável Log ( $D_L$ )	85

## Abreviaturas e símbolos

<b>SFA</b>	Análise em fluxo segmentado
<b>FIA</b>	Análise por injeção em fluxo
<b>SIA</b>	Análise por injeção sequencial
<b>LOV</b>	Lab-on-valve
<b>CSPU</b>	Unidade central de processamento da amostra
<b>MCFA</b>	Análise em fluxo por multicomutação
<b>MSFIA</b>	Análise em fluxo baseada em multiseringa
<b>MPFS</b>	Análise em fluxo por multi-impulsão
<b>SIFA</b>	Análise em fluxo de interface única
<b>ICS</b>	Sociedade Internacional de Quimiometria
<b>RTD</b>	Distribuição do tempo de residência
<b>MLR</b>	Regressão linear múltipla
<b>ANN</b>	Rede neuronal artificial
<b>AG</b>	Algoritmo genético
<b>PLS</b>	Mínimos quadrados parciais
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno

$\bar{u}$	velocidade linear média	$t_m$	tempo de residência
$r$	raio interno	$w_i$	pesos da rede neuronal
$\mu$	viscosidade dinâmica	$c$	concentração
$\rho$	densidade	$D$	coeficiente de difusão
$Re$	número de Reynolds	$D_L$	coeficiente de dispersão axial
$J_r$	difusão de massa radial	$L$	comprimento do tubo reacto
$J_x$	difusão de massa axial	$D$	diâmetro interno do tubo reactor
$Pe_L$	número de Péclet	$C$	configuração do tubo reactor
$\tau$	número de Fourier	$V$	volume da célula de fluxo
$\alpha$	ponto central da interface	$Q$	caudal
$\beta$	parâmetro relacionado com $D_L$	$W$	largura da interface
$\gamma$	parâmetro de escala	$S_{max}$	declive máximo
$b_k$	desvios sistemáticos		
$\hat{b}_{MLR}$	coeficientes de regressão para o modelo MLR		

## Objectivos

A optimização das condições experimentais é um passo essencial para o desenvolvimento e aplicação de uma metodologia SIFA. O método clássico, baseado na análise univariada, pode ser uma solução de optimização destes sistemas analíticos. No entanto, este método requer um grande número de experiências independentes e, por vezes, as melhores condições experimentais não são conseguidas.

Já foi demonstrado, nomeadamente para as metodologias FIA e SIA, que o uso de modelos matemáticos se torna útil no desenvolvimento e optimização de sistemas analíticos. Contudo, os modelos propostos para a injeção em fluxo, baseados na dispersão axial de um segmento ou volume definido de amostra, são de utilização limitada no caso do SIFA, devido à especial natureza desta metodologia, em que não se estabelecem duas ou múltiplas interfaces de reacção mas apenas uma única interface. Por outro lado, devido à sua origem relativamente recente, ainda não foram propostos modelos matemáticos para esta técnica de fluxo.

No trabalho desenvolvido e agora apresentado, considerando apenas o fenómeno físico da dispersão em SIFA, foram propostos os seguintes objectivos:

- ⇒ Modelar, pela primeira vez, o sinal analítico de um sistema SIFA com base em parâmetros físicos do sistema;
- ⇒ Aplicar um desenho experimental para gerar sinais analíticos de SIFA;
- ⇒ Estimar os parâmetros característicos do sinal SIFA: declive, largura da interface e coeficiente de dispersão axial;
- ⇒ Modelar os parâmetros estimados com os parâmetros físicos do sistema usando modelos com estruturas distintas: regressão linear múltipla, redes neuronais artificiais “feedforward” e um modelo multiplicativo.

# **CAPÍTULO 1 – Características das Interfaces em Sistemas de Análise em Fluxo Contínuo**

---

## **1. Características das interfaces em sistemas de análise em fluxo contínuo**

### **1.1 Introdução**

A crescente necessidade de obter de forma célere e eficiente as informações analíticas provenientes de amostras clínicas, ambientais e industriais, nas quais vários analitos são determinados em concentrações muito baixas, com maior eficiência na exactidão e precisão das medidas, com reduzidos tempos de análise, menor custo possível e com a mínima intervenção humana, influenciou fortemente o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos e técnicas de análise.

Nas últimas décadas, têm sido visíveis alterações bastante significativas na instrumentação e automatização analítica, que, actualmente, é capaz de fornecer informação de forma contínua, *in situ*, em tempo real e, simultaneamente, ser solidária com o ambiente. De um modo geral, desde as primeiras contribuições, os sistemas automatizados têm experimentado uma grande evolução e diversificação. A automatização tem-se destacado como uma eficiente alternativa em diversas áreas da ciência, principalmente em Química Analítica, tendo conduzido ao desenvolvimento e implementação dos métodos automáticos de análise.

### **1.2 Métodos automáticos de análise**

A crescente complexidade dos procedimentos analíticos e consequente desenvolvimento dos métodos automáticos de análise, conduz a uma cada vez mais difícil classificação dos mesmos. No entanto, segundo Valcárcel et al [1], de acordo com a metodologia usada no que diz respeito ao processamento da amostra, os métodos

automáticos de análise podem ser divididos em três categorias essenciais: métodos descontínuos, métodos robotizados e métodos contínuos.

### **1.2.1 Métodos descontínuos**

Nos métodos automáticos descontínuos (do inglês “discrete” ou “batch methods”) as amostras são transportadas mecanicamente ao longo do processo analítico, mantendo-se, no entanto, separadas em recipientes nos quais se realizam as diferentes operações analíticas, tais como diluições, adição de reagentes, misturas, aquecimentos entre outras. Posteriormente, após a realização de todas as operações, as amostras são encaminhadas para o detector, que mede a grandeza que se relaciona com a concentração da amostra. O resultado é um conjunto de sinais discretos correspondendo cada um deles a uma das amostras processadas automaticamente. Pode-se dizer que os métodos descontínuos não são mais do que versões mecanizadas dos métodos manuais de análise [1].

### **1.2.2 Métodos robotizados**

Os métodos robotizados baseiam o seu funcionamento no uso de um mini-robô que mimetiza as ações de um operador durante o processo analítico, realizando uma série de manipulações físicas programadas. De uma forma geral, estes métodos usam braços mecânicos, controlados por um microprocessador, que para além de programar as operações e ajustá-las durante o processo também regista os dados e fornece todas as medidas analíticas [1].

### **1.2.3 Métodos de fluxo contínuo**

Os métodos de fluxo contínuo são aqueles em que “a determinação da concentração da espécie a analisar é realizada sem interrupções sobre um fluxo líquido ou gasoso” [1].

Nestes métodos, introduz-se sucessivamente um determinado volume de amostra num canal, por onde passa um fluxo, designado por solução transportadora. Esta solução pode conter um reagente que se deseje adicionar ou, alternativamente, um ou mais reagentes poderão ser adicionados no decorrer do percurso através de canais auxiliares. Em muitas situações, o fluxo funciona como um simples transportador da amostra até ao detector.

Forma-se, assim, uma zona de reacção que é encaminhada para um sistema de detecção onde, cada amostra, produz um sinal analítico contínuo, transiente em forma de curva, cuja intensidade é correlacionada com alguma propriedade física ou química da solução analisada.

A estes métodos podem acoplar-se sistemas intermédios durante o percurso que permitam que a amostra seja sujeita a uma ou mais reacções químicas ou operações unitárias.

Os métodos de fluxo contínuo são os métodos automáticos de análise mais utilizados em procedimentos analíticos. Este facto deve-se, sobretudo, à elevada versatilidade destas técnicas, uma vez que o mesmo equipamento base permite efectuar um elevado número de montagens adaptáveis às necessidades de cada determinação analítica, o que se traduz em baixos custos de instalação e manutenção, sendo, também, fáceis de operar e controlar. Além disso, apresentam reduzido consumo de amostras, reagentes e tempo de análise.

Estes métodos podem ser divididos em dois grupos distintos: métodos de fluxo contínuo segmentado e de fluxo contínuo não segmentado [2,3].

O método de fluxo contínuo segmentado (SFA, do inglês “Segmented Flow Analysis”), foi proposto pela primeira vez em 1957 por Skeggs [4], sendo a firma Technicon a precursora do equipamento necessário à realização deste tipo de análises, com o AutoAnalyser®, e também a responsável pela sua divulgação e pela generalização do seu uso.

Este método baseia-se na aspiração sequencial das amostras para um canal introduzindo-se, entre elas, bolhas de ar que as separam e que devem ser eliminadas antes da chegada ao detector, para que não interfiram com o sinal analítico. Depois da sua eliminação segue-se um ciclo de lavagem do sistema, inserindo-se, de forma alternada com a amostra, uma solução de lavagem intercalada com bolhas, a qual na maioria das vezes é efectivamente o branco. Este ciclo de lavagem pretende evitar a contaminação das amostras seguintes pelos resíduos das anteriores. A função das bolhas é evitar a contaminação cruzada entre as amostras, impedir a dispersão e facilitar a mistura da amostra com os reagentes [5]. Os reagentes são introduzidos por pontos de confluência, os quais permitem a adição de soluções durante o processo de transporte, sendo a mistura conduzida até um reactor a fim de facilitar a completa reacção. A mistura é então transportada até ao detector obtendo-se um sinal quase rectangular, cuja altura é proporcional à concentração da espécie a analisar. Na verdade, o efeito de “carryover” produz um arredondar nos vértices do rectângulo. Este efeito ocorre quando se forma uma película líquida resultante da

acumulação de resíduos de amostra e reagente nos tubos, o que afecta o equilíbrio físico e fomenta a contaminação da amostra seguinte pela acumulação de resíduos da amostra anterior [6].

Na vanguarda dos métodos automáticos de análise de fluxo contínuo não segmentado encontra-se a análise por injeção em fluxo [7]. Nesta técnica o fluxo não se encontra segmentado por bolhas de ar. Apresenta grande reprodutibilidade nos processos de amostragem e detecção uma vez que não é necessário atingir condições de equilíbrio químico ou físico, já que tanto os padrões como as amostras estão sujeitos ao mesmo nível de dispersão. Além disso, a sua configuração fechada facilita a reprodução das condições de análise. Esta técnica permitiu automatizar ensaios em série a custo reduzido.

Por todas estas potencialidades, desde a década de 70, tem-se assistido ao aparecimento de novas técnicas de gestão de fluidos e à utilização das mesmas nas mais diversas áreas, tais como a análise por injeção sequencial [8], a análise por fluxo multi-comutado [9], a análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa [10], a análise em sistemas de fluxo multi-impulsão [11] e, mais recentemente, a análise em sistemas de fluxo de interface única [12].

Seguidamente, enfatizando as singularidades das interfaces que são criadas entre soluções nas montagens analíticas, são descritas as técnicas de análise em fluxo contínuo não segmentado.

### **1.3 As interfaces em análise por injeção em fluxo (FIA)**

A análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) foi introduzida na literatura em 1975 por J. Ruzicka e E. H. Hansen [7], e apresentada como uma alternativa aos métodos de fluxo contínuo segmentado.

Baseia-se na injeção de um segmento de amostra num fluxo transportador não segmentado, em movimento contínuo, conduzido até um detector. O volume de amostra injectado é definido em função das dimensões da alça (loop) do dispositivo de injeção (vulgarmente uma válvula rotativa). Durante o percurso analítico, desde a introdução da amostra até ao detector, a amostra pode reagir com o transportador ou, apenas, dispersar-se nele, ou, ainda, reagir com outros fluidos se eventualmente forem adicionados ao canal principal [7,13].

O fluxo transportador, além de apresentar um movimento contínuo, exhibe, também, características de um fluxo laminar, ou seja, a solução flui num tubo cujas características admitem um número de Reynolds inferior a 2100 [13].

Segundo Ruzicka e Hansen, as três principais características dos sistemas FIA são: injeção da amostra num fluxo contínuo, reprodutibilidade no tempo de permanência do segmento de amostra no interior da montagem e a dispersão controlada da amostra [14].

A figura seguinte representa esquematicamente uma montagem FIA.

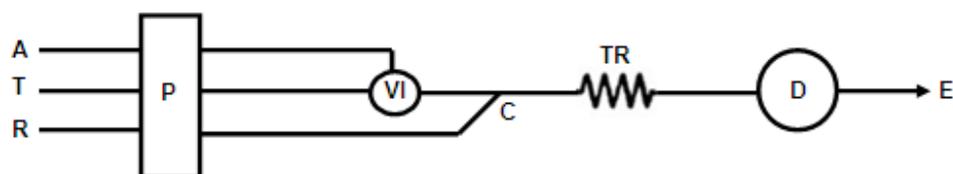


Figura 1.1 - Representação esquemática de uma montagem FIA. P: dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI: válvula de injeção; C: ponto de confluência; TR: tubo reactor; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: transportador; R: reagente; A: amostra.

O sistema pode compreender um dispositivo de propulsão (habitualmente uma bomba peristáltica, capaz de permitir caudais reprodutíveis e facilmente ajustáveis), uma válvula injectora, um ponto de confluência, que permite a adição de reagente durante o processo de transporte, uma porção de tubo onde ocorre a formação do gradiente de concentração, um detector que monitoriza a espécie a medir, um registador e o esgoto, para onde são enviados os resíduos após a determinação [14].

A metodologia FIA baseia-se, fundamentalmente, no controlo da dispersão física e/ou química do segmento de amostra no fluxo transportador, desde que a amostra é injectada até ao sistema de detecção.

No instante imediato à injeção do segmento de amostra, forma-se uma zona de amostra de perfil rectangular. Esta zona sofre um alargamento, à medida que ocorre o processo de transporte, consequência da dispersão do segmento de amostra no fluxo transportador, evoluindo até atingir um perfil parabólico.

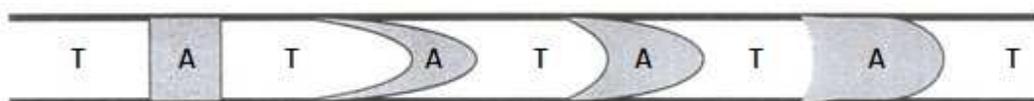


Figura 1.2 - Representação esquemática do perfil da amostra imediatamente após a injeção e durante o processo de transporte. T: transportador; A: amostra.

Para a dispersão do segmento de amostra contribuem dois processos: o transporte por convecção, condicionado pelas dimensões da tubagem e o transporte por difusão. O transporte por convecção predomina no início do transporte, ocorrendo em condições de fluxo laminar, resultando um perfil parabólico pelo facto das moléculas que se movem junto à parede do tubo apresentarem uma velocidade limiar nula e as que se movem no centro o dobro da velocidade média. O transporte por difusão radial e axial acontece dada a presença de gradientes de concentração no decorrer do transporte por convecção. A difusão radial contribui para a eficiente mistura entre a zona de amostra e o reagente ao longo do percurso analítico, movimentando as partículas adjacentes às paredes do tubo para o centro e vice-versa, impedindo a sobreposição de amostras adjacentes, contrariando o efeito provocado pela dispersão por convecção e preservando a identidade da amostra [5,1].

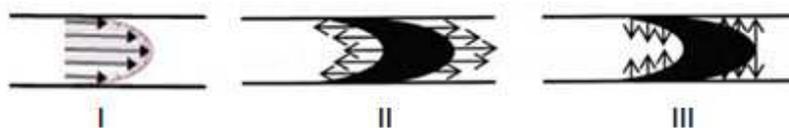


Figura 1.3 - Representação esquemática dos fenómenos de convecção (I) e de difusão axial (II) e radial (III) num sistema FIA.

O gradiente de concentrações é monitorizado num detector, sendo a forma do sinal analítico obtido dependente dos processos que ocorrem entre o local da injeção e o detector. Estes processos podem ser processos físicos de dispersão da zona de amostra e processos químicos de formação da espécie detectável [15]. O produto da reacção forma-se, gradualmente, na interface entre a zona de amostra e a zona do fluxo transportador com reagente. Assim, num sistema FIA, o sinal analítico apresenta um valor constante, enquanto a solução transportadora atravessa o sistema detector e transiente na forma de uma curva gaussiana distorcida aquando da passagem da espécie a detectar, devido à formação do referido gradiente de concentrações durante o processo de transporte da amostra até ao detector [16].

É possível falar em reprodutibilidade das determinações analíticas quando a extensão da dispersão e o tempo de reacção, assim como os parâmetros físicos do sistema, forem constantes durante o processo de transporte.

Para que a dispersão de um segmento de amostra atinja a extensão pretendida, convém saber que pode ser controlada através de diferentes variáveis: o volume de amostra introduzido no sistema (dimensões do loop), as dimensões e configuração do reactor, o

tempo de residência (tempo que decorre desde a injeção da amostra e o aparecimento do máximo do sinal analítico, para essa amostra) e o volume da célula [13].

O tempo de reacção entre a amostra e o reagente pode alterar-se recorrendo ao método de paragem de fluxo ou à alteração do caudal e/ou das dimensões do reactor [16, 17].

A análise por injeção em fluxo em regime laminar reduz o perigo da mistura de amostras pelo que não é necessária a introdução de bolhas de ar, que tornam o equipamento mais complexo dificultando a miniaturização. As montagens FIA apresentam uma configuração simples e económica, oferecendo grande versatilidade e flexibilidade em várias determinações analíticas já que utilizam equipamento de uso comum nos laboratórios de Química [8,18].

Estas vantagens associadas ao facto de uma análise num sistema FIA requerer pequenos volumes de amostra (na ordem de 10-100  $\mu$ L em vez de 0,2-2 mL como em SFA), apresentar elevado ritmo de amostragem (cerca de 120 determinações por hora em vez de 80 determinações por hora trivial em SFA), elevada reprodutibilidade, reduzidos tempos de resposta e permitir que a leitura do sinal analítico se efectue sem que a reacção química alcance as condições de equilíbrio físico e químico, evidenciam a ampla utilização desta metodologia na automatização de procedimentos analíticos em diversas áreas de investigação [19].

Apesar desta técnica ter sido o impulso para muitas metodologias e apresentar as vantagens já mencionadas, também manifesta algumas desvantagens que se reflectem nomeadamente no elevado consumo de reagentes, causado pela circulação contínua dos mesmos nas montagens, na necessidade de uma reconfiguração física dos sistemas para que possam ser usados em diferentes determinações analíticas, bem como a fragilidade dos tubos de impulsão da bomba peristáltica, que conduzem à frequente substituição dos mesmos. Estes factos envolvem, ainda, a consequente recalibração do sistema [8].

#### **1.4 As interfaces em análise por injeção sequencial (SIA)**

A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) teve a sua origem em 1990 com J. Ruzicka e G. Marshall [8] e surge da necessidade de implementação de metodologias mais versáteis, robustas, fiáveis e flexíveis, que impliquem baixa manutenção e não envolvam reconfiguração do sistema na automatização de procedimentos analíticos complexos [20].

Esta metodologia mantém os mesmos princípios das metodologias FIA no que diz respeito à precisão na introdução da amostra, controlo da dispersão e manipulação reprodutível da amostra [15, 21]. Contudo, uma das características básicas dos sistemas SIA é que praticamente todos os componentes são controlados por computador, acessório frequentemente ausente nas montagens FIA [21].

Uma montagem SIA apresenta semelhanças com uma montagem FIA diferindo, no entanto, ao nível do sistema de injeção da amostra e introdução de reagentes, que nos sistemas SIA é uma válvula selectora de fluidos multiposição. Estas válvulas possuem uma porta central com ligação a várias portas laterais (mas só uma de cada vez) e a um dispositivo de propulsão, geralmente uma bomba peristáltica. A localização do dispositivo de propulsão possibilita o acesso ao tubo reactor de armazenamento, aos reagentes, à amostra, ao detector e a outros dispositivos adicionais, com ligação a cada uma das portas laterais.

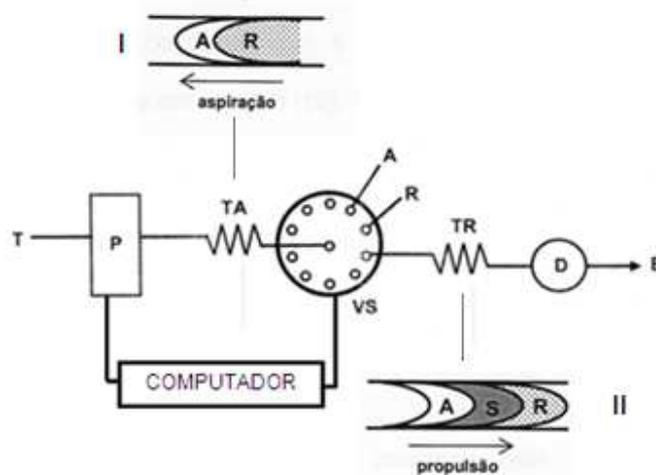


Figura 1.4 - Representação esquemática de uma montagem SIA. P: dispositivo de propulsão; VS: válvula selectora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: transportador; R: reagente; A: amostra; I: Aspiração sequencial de A e R a partir de VS; II: Sobreposição das zonas que são dirigidas para o detector; S: zona de sobreposição.

O funcionamento de uma montagem SIA baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagente(s) para um tubo de armazenamento [15]. Esta aspiração ocorre por comutação da válvula selectora multiposição a qual permite a ligação da porta central a cada uma das portas laterais (por onde são aspiradas as soluções). É efectuada e controlada por um computador numa sequência previamente estabelecida, para que a válvula selectora e o dispositivo de propulsão funcionem de modo sincronizado

possibilitando, simultaneamente, a definição de parâmetros como o volume, o sentido e velocidade de escoamento das diferentes soluções, tempo de residência e ordem de introdução dos reagentes, entre outros.

A aspiração sequencial de amostra e reagente gera uma zona de segmentos adjacentes de diferentes soluções (Figura 1.4-I). A dispersão que ocorre nesta zona deve-se ao transporte por convecção, que ocorre com o escoamento, e ao processo de difusão molecular nas interfaces das zonas adjacentes. Sendo o escoamento predominantemente laminar, inicialmente um segmento de amostra inserido no sistema fica sujeito a um perfil parabólico de velocidades devido à formação de gradientes de concentração responsáveis pela difusão radial e axial. Depois de se efectuar a aspiração de todas as soluções para o tubo de armazenamento e quando é invertido o sentido de rotação do dispositivo de propulsão, ocorre inversão do sentido do fluxo (Figura 1.4-II), diminuição da dispersão axial dos segmentos e sobreposição reproduzível das zonas de amostra e reagente [5, 20 e 22]. Cria-se uma zona composta resultante da penetração mútua dos segmentos que é encaminhada para o detector onde é monitorizada, resultando um sinal analítico cuja magnitude é proporcional à concentração da espécie a analisar [15].

A obtenção dos diferentes graus de mistura amostra e reagente, durante o processo de transporte, deve-se à sucessiva inversão do sentido do fluxo bem como aos fenómenos de dispersão axial e radial, os quais também têm lugar na metodologia FIA [5, 20 e 22].

No entanto, enquanto em FIA o tempo de residência é função do caudal e do percurso da amostra no interior da montagem, em SIA este tempo é definido à custa do programa informático, o qual é capaz de fixar o escoamento do fluxo num dado sentido bem como proporcionar paragem e inversão do sentido do fluxo, garantindo aspirações e propulsões reproduzíveis sem que seja necessário alterar a configuração da montagem analítica [21]. Os volumes em SIA são definidos à custa do caudal e do tempo de aspiração ou propulsão.

Tal como acontece em FIA, os parâmetros referentes ao sistema SIA e às soluções envolvidas na determinação analítica devem ser optimizados de forma a promoverem o grau de dispersão ideal para a determinação em causa [23].

Apesar da metodologia SIA possuir características que facultam a implementação de procedimentos analíticos complexos sem reconfiguração física do sistema, como já foi mencionado, e de oferecer a possibilidade de aspirar sequencialmente um maior número de reagentes, apresenta uma restrição quanto ao número de zonas que podem ser misturadas por inversão de fluxo, no reactor. Um dos requisitos para a metodologia SIA ser bem

sucedida consiste em alcançar a máxima penetração de zonas provocada pelo aumento da dispersão radial obtida pela inversão do sentido de fluxo [2, 22]. Contudo, a sobreposição de zonas de amostra e reagentes, mesmo após a inversão do sentido, é apenas parcial, como se observa na figura 1.5.

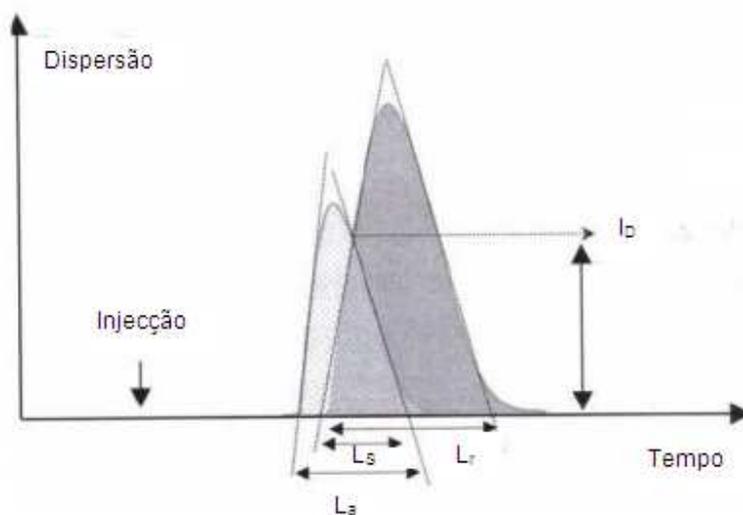


Figura 1.5 - Representação da sobreposição mútua de zonas.  $L_s$ : largura da base do pico da zona sobreposta;  $L_a$ : largura da base do pico da zona de amostra;  $L_r$ : largura da base do pico de reagente;  $I_D$ : ponto de isodispersão.

Atendendo a que o número de zonas que pode ser misturado por inversão do fluxo constitui uma limitação desta técnica, para fazer a rentabilização máxima de uma montagem SIA, é fundamental fazer um estudo sobre a sobreposição de zonas, o que justificou o aparecimento de um parâmetro designado por grau de sobreposição ( $P$ ), que corresponde ao intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa com base na altura ou área do pico [20, 24]. O grau de penetração [24] é definido como:

$$P = \frac{2L_s}{L_a + L_r} \quad (1.1)$$

Na equação anterior  $L_s$  corresponde à largura da base do pico da zona sobreposta e  $L_a$  e  $L_r$  correspondem, respectivamente, à largura das bases dos picos de amostra e reagente. O valor de  $P$  está relacionado com a dispersão sofrida por cada uma das zonas aspiradas no interior do sistema. Para uma completa sobreposição de zonas de amostra e reagente o  $P$  tem o valor unitário, para uma ausência de sobreposição o valor de  $P$  é igual a

zero. Valores intermédios surgirão para uma sobreposição parcial [20, 24]. Como é óbvio, a dispersão sofrida pela solução aspirada em primeiro lugar é superior à segunda, dependendo o grau de sobreposição da ordem de aspiração das soluções, da relação de volumes das soluções, do caudal, do diâmetro e comprimento dos tubos usados e da configuração do reactor [25,26].

Nas situações em que a dispersão é parcial observa-se a ocorrência de um ponto de isodispersão,  $I_D$ , que corresponde a dispersão idêntica de amostra e reagente e, também, à razão de concentrações amostra reagente igual à razão antes da injeção [20].

O facto das variáveis hidrodinâmicas serem controladas pelo sistema informático permite a utilização de uma mesma montagem SIA em diferentes determinações, sem necessidade de efectuar reconfigurações físicas do sistema, bastando simplesmente alterar o programa informático em função da espécie a ser determinada. A elevada versatilidade da metodologia SIA quando comparada com a metodologia FIA, associada à eficiente utilização das soluções, reduzido consumo de amostras e reagentes e consequente diminuição de resíduos para além da inerente compactação dos equipamentos constituem as principais vantagens da técnica SIA [8, 22, 27]. Há ainda a acrescentar que a versatilidade da válvula selectora multiposição juntamente com o uso do computador oferecem uma grande flexibilidade ao sistema, uma vez que se podem programar muitas operações que mimetizam os sistemas manuais, realizando-as em linha sem grandes dificuldades. Esta metodologia permite acoplar num mesmo sistema mais do que um dispositivo de selecção, multiplicando, desta forma, o número de operações a realizar.

No entanto, a metodologia SIA apresenta alguns aspectos menos favoráveis frequentemente referidos na literatura. O ritmo de amostragem é mais baixo do que na técnica FIA, facto que se deve ao tempo gasto para que a válvula selectora multiposição efectue a comutação entre as diferentes portas laterais e também, devido às soluções terem que ser previamente aspiradas para um tubo de armazenamento ocorrendo, eventualmente, posterior inversão do movimento dos fluidos dentro deste tubo. Existem limitações no que concerne à extensão da mistura entre amostra e reagente, uma vez que a junção dos segmentos destas soluções acontece necessariamente “topo a topo”. Esta metodologia exige, também, equipamento de custo mais elevado [28].

Durante a última década, a crescente procura pela miniaturização e compactação dos sistemas de análise em fluxo levaram ao aparecimento dos módulos de análise “Lab-on-valve” (LOV), os quais correspondem a uma versão miniaturizada da metodologia SIA apresentando, portanto, os mesmos princípios de funcionamento. A miniaturização é

conseguida através da concepção de uma estrutura designada por unidade central de processamento da amostra (CSPU do inglês “central sample processing unit”), cujo componente principal é uma válvula selectora multiposição de uma montagem SIA [27]. Esta válvula, controlada por computador, possui uma porta central que se encontra ligada a uma bureta automática, através de um tubo de armazenamento, uma porta de injeção de amostra, canais de acesso para reagentes e uma célula de fluxo que permite o acoplamento de vários sistemas de detecção (Figura 1.6) [27, 29].

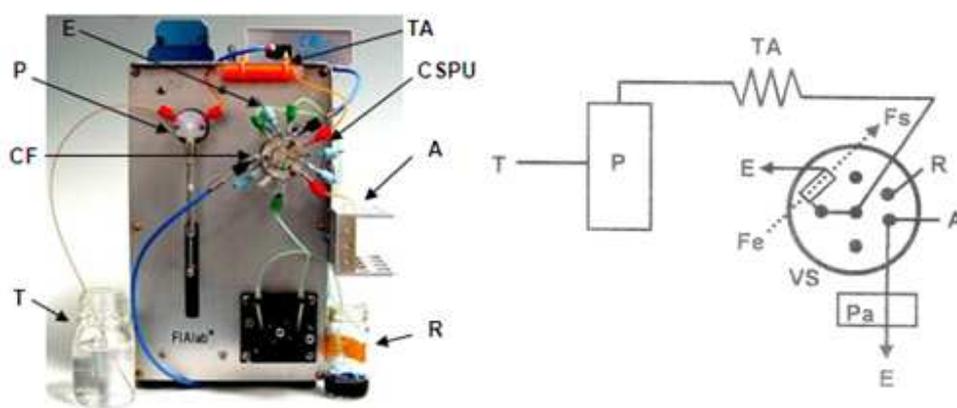


Figura 1.6 – Fotografia de um módulo de análise LOV (à esquerda) e sua representação esquemática (à direita). T: transportador; P: dispositivo de propulsão; TA: tubo de armazenamento; A: amostra; R: reagente; VS: válvula selectora multiposição; CF: célula de fluxo; Fe: feixe de entrada; Fs: feixe de saída; Pa: dispositivo de propulsão auxiliar; CPSU: unidade central de processamento da amostra.

A bureta apresenta como funções o transporte das soluções para o tubo de armazenamento, para posterior mistura das mesmas, e o transporte da zona de reacção para o detector.

Os módulos de análise tipo LOV são desenhados de forma a possibilitar diferentes manipulações da amostra (diluição, adição de reagentes, mistura, incubação, separação) e até mesmo a detecção [27, 30].

A miniaturização e compactação do equipamento, o controlo informático de todos os passos do procedimento experimental, a integração de todos os componentes da montagem numa estrutura rígida, reforçando a repetibilidade das operações de processamento das amostras, para além da forte redução do consumo de amostra e reagentes, importantíssimo quando se está na presença de pequenas quantidades de amostra e reagentes ou quando

os reagentes possuem custo elevado, apresentam-se como as verdadeiras vantagens dos módulos LOV [27].

À semelhança do que acontece na técnica SIA, as principais desvantagens surgem associadas ao baixo ritmo de amostragem e às limitações na extensão da mistura nas interfaces de contacto das diferentes soluções, uma vez que a junção dos segmentos de amostra e reagente acontece “topo a topo”.

### **1.5 As interfaces em sistemas baseados no conceito de multicomutação (MCFA)**

A análise em fluxo por multicomutação (MCFA, do inglês “Multicommutation in Flow Analysis”), é uma metodologia relativamente recente em análise de fluxo, proposta em meados da década de noventa por Reis et al [9]. Consiste na inserção da amostra e reagente num fluido transportador recorrendo, geralmente, ao uso de dispositivos de comutação, tais como válvulas solenóides de três vias, (válvulas electromecânicas activadas por um solenóide), com actuação independente e controladas por computador. Este aspecto possibilita a comutação, garantindo elevada flexibilidade bem como facilidade e versatilidade na manipulação de amostras [31, 32]. Quase sempre presentes na multicomutação, as válvulas solenóides são consideradas um dispositivo muito importante nesta metodologia [33].

O controlo electrónico do tempo de activação/desactivação da válvula solenóide, mediante a utilização de um computador, permite seleccionar o número de ciclos de amostra e reagente e sincronizar o início de cada ciclo analítico possibilitando a inserção reprodutível do volume das diferentes soluções. Logo, a substituição dos volumes de inserção por tempos de inserção traduz a inovação dos métodos de análise em fluxo por multicomutação, o que possibilita o desenvolvimento de estratégias baseadas em tempos mais precisos e reprodutíveis [32, 33]. Havendo um controlo electrónico do tempo e um caudal constante e conhecido, o erro nos volumes inseridos depende, principalmente, da precisão com que o tempo é controlado.

Uma montagem MCFA consiste num conjunto de válvulas solenóides, com diferentes disposições espaciais [34-36], de forma a criar uma rede de fluxo que possibilite diversos percursos analíticos [33], ampliando a versatilidade desta metodologia no que concerne à manipulação da zona de amostra, sem que seja necessário reconfigurar fisicamente o sistema analítico.

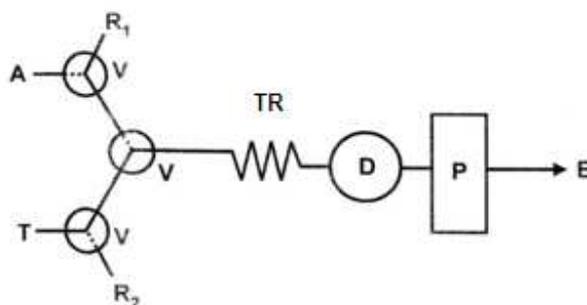


Figura 1.7 – Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo por multicomutação. P: dispositivo de propulsão; V: válvula solenóide; TR: tubo reactor; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: transportador; R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>: reagentes; A: amostra.

Na análise em fluxo por multicomutação, a inserção das alíquotas de amostra e reagente pode realizar-se num único canal onde ocorrem as reacções químicas, bastando, para isso, posicionar o dispositivo de propulsão após o detector (Figura 1.7), funcionando em modo de aspiração, e seleccionar as posições das válvulas. De salientar que na maioria dos trabalhos com multicomutação existe apenas um dispositivo para aspiração das soluções, o que é vantajoso a nível económico mas proporciona pressão negativa dentro do sistema, promovendo o aparecimento de bolhas gasosas. Em alternativa, o sistema de propulsão poderá ser colocado antes das válvulas de comutação, funcionando como dispositivo de impulsão [37], contribuindo para a redução do aparecimento de bolhas de ar no sistema, devido à pressão positiva. Contudo, neste tipo de configuração a complexidade do sistema aumenta devido à necessidade de utilizar um canal para cada solução de amostra e reagente e, conseqüentemente, o custo do equipamento envolvido também se torna mais elevado. Este facto é ultrapassado utilizando bombas peristálticas multicanal, as quais permitem a recirculação das soluções diminuindo o seu consumo.

A multicomutação conduziu à introdução de um novo conceito de gestão de fluidos denominado de amostragem binária [9, 33 e 38], principal potencialidade desta metodologia [39]. Consiste na inserção sequencial de pequenas alíquotas de amostra (na ordem dos  $\mu\text{L}$ ) intercaladas com pequenas alíquotas de reagente no percurso analítico, formando a partir do ponto de inserção uma sequência binária. No entanto, esta estratégia de gestão de fluidos só é possível na medida em que a comutação entre as duas posições da válvula é muito rápida, ocorrendo mais de 10 comutações por segundo.

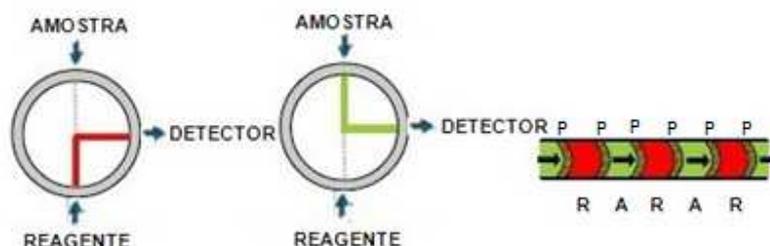


Figura 1.8 – Representação esquemática da parte superior de uma válvula solenóide e respectivo perfil de inserção (amostragem binária). R: reagente; A: amostra; P: produto.

Assim, os segmentos adjacentes misturam-se rapidamente enquanto são transportados através do tubo reactor, ocorrendo dispersão das interfaces e célere homogeneização da mistura, o que favorece o desenvolvimento de reacções químicas [9]. A consequência evidente desta estratégia de gestão de fluidos é a mais rápida e eficiente homogeneização da zona de amostra com menor dispersão e, ainda, o aumento da velocidade de formação do produto, já que a mistura das soluções tem início na fase de amostragem [31, 38] aumentando, desta forma, o ritmo de amostragem.

À medida que se aumenta o número de segmentos de alíquotas, para o mesmo volume de amostra e reagente, aumenta-se o número de zonas de contacto entre soluções e, conseqüentemente, melhora-se a mistura entre elas. De salientar que se obtém uma mistura mais eficaz, para um volume total de amostras e reagentes constante, quando se diminui o volume das alíquotas de amostra e reagente inseridas e se aumenta o número de segmentos intercalados.

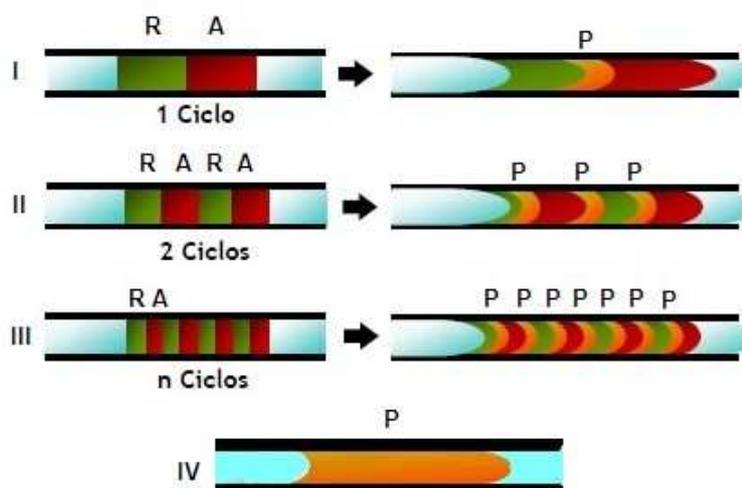


Figura 1.9 – Representação esquemática do perfil de inserção amostra e reagente seguindo uma estratégia de amostragem binária. (I) Intercalação de pequenos segmentos de amostra (A) e reagente (R) e formação do produto da reacção (P); (II) e (III) Transporte das duas soluções; (IV) Homogeneização da zona de amostra.

O perfil de dispersão alcançado pela mistura amostra/reagente, usando um sistema multicomutado, se por um lado contribui para a optimização da mistura entre as soluções, aumentado a sensibilidade, por outro causa diluição originando alargamento do sinal analítico e reduzindo o ritmo de amostragem. É necessário estabelecer uma relação de compromisso entre ambos os efeitos.

O controlo electrónico, a flexibilidade e a versatilidade das montagens MCFA conferem à análise em fluxo por multicomutação um lugar privilegiado nos laboratórios de Química Analítica, uma vez que, recorrendo, apenas, ao uso de válvulas solenóides, é possível implementar, num só sistema, diversos procedimentos e estudar uma série de conceitos explorados pelas diferentes técnicas de fluxo [31]. Esta técnica facilita a ocorrência simultânea de várias determinações analíticas [40] sem necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema e sem que o perfil de inserção seja afectado, bastando, para isso, ajustar o tempo de inserção e alterar a sequência da comutação. Permite, também, uma optimização dos recursos utilizados, na medida em que apenas uma válvula solenóide pode ser responsável pela inserção de uma ou duas soluções, sendo possível adaptar o número de válvulas às necessidades do sistema ao contrário do que acontece em análise por injecção sequencial, onde na maioria da vezes existem canais não utilizados [33].

São vistos como sistemas económicos na medida em que integram equipamento de baixo custo, de simples implementação e possibilidade de miniaturização. Além disso, o

consumo de amostra e reagente é reduzido uma vez que a inserção do volume de amostra e reagente é controlada pelos tempos de inserção, de forma muito precisa [33]. A reprodutibilidade e automação são valorizadas uma vez que as válvulas solenóides requerem intervenção mínima por parte do operador, sendo o processo controlado por computador de forma reprodutível. Este facto reflecte-se na redução dos tempos de análise, superando a metodologia SIA [8], e no aumento do número de determinações por hora (cerca de 100 determinações por hora) [5].

Como principais desvantagens da análise em fluxo por multicomutação destacam-se as restrições na inserção de volumes uma vez que se está a falar da inserção de volumes muito reduzidos devendo as operações do sistema de propulsão estar sincronizadas com as inserções, caso contrário serão introduzidas distorções irreprodutíveis nos perfis de inserção. As válvulas solenóides oferecem menos robustez do que as válvulas SIA, sendo mais susceptíveis a falhas durante a sua utilização, apresentando menor reprodutibilidade.

### **1.6 As interfaces em sistemas baseados na estratégia multiseringa (MSFIA)**

A análise por injeção em fluxo baseada em multiseringa (MSFIA, do inglês “Multisyringe Flow Injection Analysis”), constitui uma potente ferramenta para a inserção automática de fluidos e foi descrita por Cerdà *et al* em 1999 [10] como uma rápida e robusta alternativa aos diversos métodos automáticos de análise [19, 41]. Surgiu com a intenção de reunir as vantagens das técnicas precedentes, evitando os seus inconvenientes [19, 5] e caracteriza-se pela utilização de bombas de pistão como dispositivos de propulsão. Apresenta como elemento básico uma bureta multiseringa (Figura 1.10), construída pela empresa Crison Instruments Espanhola [10], por adaptação de uma bureta automática de seringa análoga às usadas nos sistemas automáticos de titulação, com a capacidade de mover simultaneamente quatro seringas, que podem ter capacidades diferentes. Este facto simplifica o sistema uma vez que evita a necessidade de dispor de quatro buretas em paralelo a trabalhar independentemente [5].

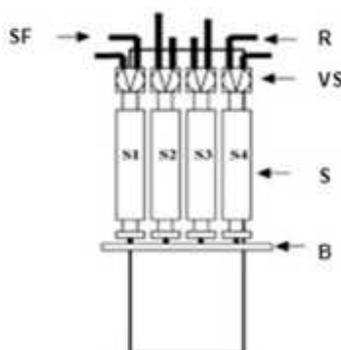


Figura 1.10 – Representação esquemática de uma multiseringa. VS: válvula solenóide; S: seringas (S1-S4); B: barra condutora dos êmbolos; R: reservatório de solução; SF: sistema de fluxo (adaptado de [5]).

Um sistema MSFIA dispõe de quatro seringas com os êmbolos solidários ligadas em bloco a um motor de uma seringa automática convencional (Figura 1.10), controlada através do software de um computador. À saída de cada seringa existe acoplada uma válvula solenóide de três vias com a função de ligar a seringa ao sistema de fluxo ou ao reservatório da solução que retém, gerindo as soluções para que não sejam introduzidas no percurso analítico simultaneamente. A presença da válvula possibilita o reencaminhamento das soluções aos reservatórios viabilizando a solução de cada seringa [42]. Este facto contribui para o aumento da flexibilidade do sistema e para a redução considerável do consumo de reagentes, uma vez que estes são introduzidos na montagem analítica apenas quando necessário [18, 28 e 43]. Na extremidade oposta localiza-se o êmbolo responsável pelo enchimento ou esvaziamento da seringa. O movimento do motor propulsiona simultaneamente os êmbolos das quatro seringas, trabalhando em modo multicanal [10], próprio das bombas peristálticas utilizadas em FIA, com a vantagem de não se usarem os tubos de impulsão flexíveis [5] e, ainda, permitir a selecção de volumes exactos, através do computador, característico das bombas de pistão [42].

O facto de se trabalhar com pressões positivas diminui a probabilidade de aparecimento de bolhas de ar que poderiam entrar no sistema [42], como já foi mencionado na técnica anterior.

A grande variedade de seringas disponíveis no mercado (0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 25 mL de capacidade) associada ao número de passos do motor da bureta permite que os diferentes canais da multiseringa apresentem caudais muito diversificados [42, 44]. Este sistema

possibilita a obtenção de diferentes configurações e alternativas para inserção de volumes de amostra e reagente na rede de fluxo, com elevada precisão.

O facto do funcionamento das seringas de pistão requerer o seu reenchimento periódico com as soluções que foram entretanto consumidas, pode comprometer o ritmo de amostragem [42, 43], embora as válvulas solenóides efectuem uma rápida comutação entre as duas posições, demorando cerca de 35 ms, sem que ocorra paragem de movimento do êmbolo [18, 42].

Neste sistema não é hábito utilizar uma das seringas como reservatório de amostra para posterior introdução no sistema de fluxo, uma vez que este procedimento originaria prejuízos tais como contaminação da amostra seguinte por resíduos das anteriores (carryover), levando a lavagens rigorosas e morosas, comprometendo não só o volume de amostra de cada determinação mas também o ritmo de amostragem. Assim, para efectuar a introdução da amostra recorre-se, habitualmente, a dispositivos adicionais tais como válvulas de injeção [10], válvulas selectoras [45] e válvulas solenóides [46], conectadas à multiseringa e com o propósito de automatizar a amostragem, podendo, este processo, ser realizado quer em termos de tempo (em função da relação tempo/caudal usada durante a fase de amostragem) quer em termos de volume (em função do volume interno de uma porção de tubo bem definida) [47].

A zona de amostra estabelecida com os sistemas MSFIA ocorre de forma semelhante à que acontece em MCFA, sendo possível o estabelecimento da estratégia de amostragem binária. Assim, a zona de amostra é constituída por vários segmentos de amostra e reagente intercalados, o que favorece a homogeneização da mistura durante o transporte e o consequente desenvolvimento das reacções químicas.

Como já foi referido, com as montagens MSFIA é possível obter diversas vantagens relativamente às técnicas de fluxo precedentes. Uma vez que a adição de amostra e reagentes é realizada em paralelo atinge-se a elevada frequência de amostra dos sistemas FIA [48], o que também conduz a uma melhor mistura dos mesmos, facto que não se alcança com a metodologia SIA.

É evidente a robustez apresentada pelo facto de não se usarem bombas peristálticas, cujos tubos apresentam grande vulnerabilidade a soluções agressivas e orgânicas.

Sendo a amostra e reagentes adicionados somente no momento em que se pretende fazer a determinação o consumo dos mesmos é baixo, à semelhança do que acontece na metodologia SIA.

Falta, ainda, referir que é comum encontrar críticas, na literatura, quanto à designação de MSFIA como um novo processo de gestão de fluidos uma vez que no essencial trata-se de uma técnica igual à multicomutação.

### **1.7 As interfaces em sistemas de fluxo multi-impulsão (MPFS)**

Os sistemas automáticos de fluxo multi-impulsão (MPFS, do inglês “Multi-pumping Flow Systems”), surgiram na literatura em 2002 com Lapa *et al* [11], oferecendo novidades tanto a nível da natureza hidrodinâmica do fluxo, como do desenho, concepção, e implementação de metodologias de fluxo contínuo para manipulação de soluções de amostra e reagente e para automatização de procedimentos analíticos [49]. O seu funcionamento baseia-se na utilização de micro-bombas solenóides unidireccionais de dimensões reduzidas, operando individualmente e proporcionando a impulsão individual da amostra e reagentes. As micro-bombas são dispositivos de baixo custo, robustos, confiáveis e capazes de produzir fluxos pulsados reproduzíveis [50]. Uma vez que actuam como elementos propulsores e comutadores das soluções é desnecessária a utilização de dispositivos adicionais para realizar estas funções, estando, assim, diminuída a complexidade da configuração da montagem do sistema analítico e, conseqüentemente a forma de operar, o controlo analítico e a automatização [50]. As micro-bombas solenóides são responsáveis por todas as etapas características da análise em fluxo contínuo, tais como estratégias de inserção de amostra e reagentes, transporte da zona de reacção até ao detector e controlo do caudal e do volume de amostra. Todas estas operações fundamentais, controladas por computador, conferem ao sistema elevada flexibilidade [49].

Uma montagem analítica de um sistema MPFS é extremamente simples (Figura 1.11). Envolve a existência de uma micro-bomba solenóide para cada solução, as quais são responsáveis pela introdução da amostra e pelo controlo não só do volume mas também do tempo, da sequência de inserção e do respectivo transporte até ao detector [11]. O sistema não necessita de qualquer componente adicional para inserção e selecção de soluções, no entanto, por vezes recorre-se ao uso de válvulas solenóides, em sistemas mais complexos, para redireccionar as soluções [49].

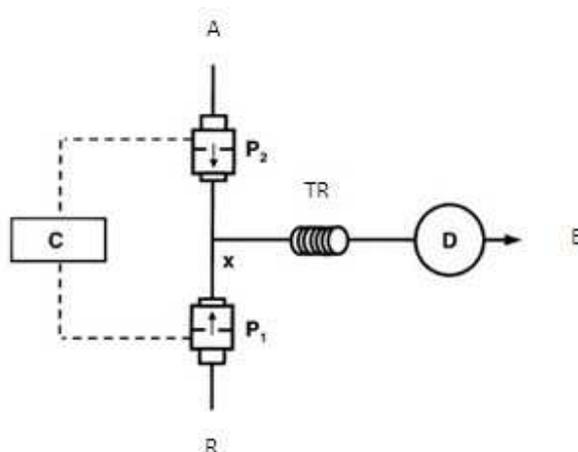


Figura 1.11 – Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo por multi-impulsão. C: interface de controlo; P1 e P2: micro-bombas solenóides; A: amostra; R: reagente; TR: tubo reactor; D: detector; E: esgoto; x: ponto de confluência. Adaptado de [11]

A principal característica das micro-bombas solenóides reside na forma como actuam, originando múltiplos fluxos pulsados ocasionados pelo deslocamento brusco do diafragma da micro-bomba.

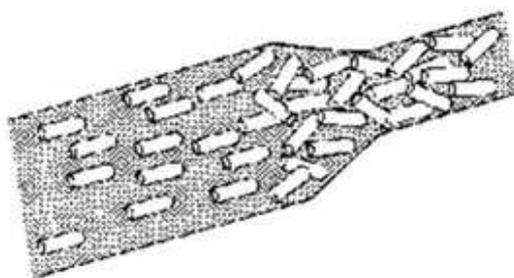


Figura 1.12 – Representação esquemática do movimento de um fluido em regime de fluxo pulsado.

Estes dispositivos possuem na sua estrutura interna um solenóide que, quando é aplicada uma diferença de potencial, é activado aspirando um volume fixo da amostra ou reagente para uma câmara interna. Depois de desligado, o solenóide volta à sua posição inicial provocando a impulsão da solução contida na câmara interna para o sistema, dando origem a um pulso de volume fixo, correspondente ao seu volume interno.

As micro-bombas solenóides apresentam-se como os primeiros dispositivos que condicionam o volume uma vez que cada micro-bomba apresenta um volume de pulso fixo determinado pelas características estruturais da mesma, estando comercialmente disponíveis micro-bombas de 3, 8, 20, 25 e 50  $\mu\text{L}$  [49, 5]. Assim, é possível controlar de forma efectiva e precisa os volumes de amostra e reagente inseridos no percurso analítico

uma vez que estes são definidos pelo número de pulsos e pelo volume de pulso da micro-bomba. A frequência de pulso pode ajustar-se até 250 pulsos por minuto, implicando caudais máximos de 0.75, 1.25, 2.0, 6.25 e 12,5 mL por minuto.

Uma vez que estes sistemas agregam dispositivos mono-comutadores e auto-propulsores, bastante versáteis e fáceis de controlar, é possível recorrer a diferentes estratégias de amostragem tais como volumes únicos, amostragem binária [49, 9] ou estratégia de zonas confluentes, pois o fluxo gerado promove uma extensa mistura no ponto onde ocorre a confluência de soluções [49, 51], estando, também, em vantagem a implementação de métodos cinéticos ou estratégias de paragem de fluxo [49]. O controlo individual das micro-bombas permite assegurar alta flexibilidade em termos de adição de amostra e reagentes, geralmente mais do que um, e, deste modo, no estabelecimento da zona de reacção [50]. Podem, também, ser avaliadas numa mesma determinação várias estratégias sem necessidade de reconfiguração física do sistema, sendo o seu accionamento controlado por computador [11].

Ao contrário do que sucede em regime de fluxo laminar, o fluxo pulsado, originado pelas micro-bombas, produz um movimento caótico das soluções em todas as direcções, importante característica das micro-bombas solenóides (embora este regime de fluxo também possa ter origem em outros tipos de dispositivos), o qual contribui para uma mais rápida e eficaz homogeneização da mistura entre amostra e reagente do que a que se consegue obter em condições de fluxo laminar. Esta homogeneização reflecte-se no aumento da reprodutibilidade do sinal analítico e, conseqüentemente, na sensibilidade, mesmo em condições de dispersão limitada [11]. Assim, o tamanho do tubo reactor pode ser reduzido, minimizando-se a dispersão axial da amostra e aumentando-se a dispersão radial [49, 50]. A extensão da mistura nestes sistemas é superior à que ocorre nas metodologias que apresentam estritamente fluxo laminar, onde a interpenetração das soluções resulta dos fenómenos de difusão e convecção. Este facto faz com que para volumes idênticos, os sinais analíticos obtidos com o fluxo pulsado exibam intensidade superior aos obtidos com fluxo laminar [5], sendo tão mais evidente quanto maior for o volume de amostra. Devido às melhores condições de mistura, o ritmo de amostragem é significativamente superior. A amplitude do sinal analítico depende não só do volume do pulso mas, também, da frequência de pulso [51], das dimensões do reactor e do volume interno da célula de fluxo do detector. Para volumes de pulso pequenos a mistura amostra reagente é facilitada e quase imediata [49], possibilitando a diminuição do comprimento do reactor [50]. O volume de pulso desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da mistura das soluções.

O facto dos sistemas MPFS incorporarem apenas um tipo de dispositivo, torna-os muito robustos, viabilizando a sua implementação na automatização de procedimentos analíticos [50]. O seu controlo independente associado às variadas tarefas realizadas pelas mesmas (inserção de amostra, adição de reagentes, mistura das soluções e transporte da respectiva zona de reacção) fazem desta técnica uma mais-valia quando comparada com as estratégias de gestão de fluidos mais convencionais.

O fluxo pulsado, característica que distingue a multi-impulsão das outras técnicas de fluxo, o controlo automático e individual das micro-bombas solenóides e a simplicidade e baixo custo das montagens analíticas, concedem a este tipo de metodologia possibilidade de implementação de sistemas analíticos caracterizados por rápido estabelecimento da zona de reacção, baixo consumo de amostra e reagente, redução da produção de resíduos com diminuição do impacto ambiental, minimização da intervenção do operador [49] e várias possibilidades de intervir na zona de amostra, sem envolver alterações físicas da montagem analítica.

### **1.8 A interface em fluxo com interface única (SIFA)**

As diferentes metodologias descritas, embora baseadas em diferentes estratégias de gestão de fluidos, baseiam-se na introdução de um determinado volume de amostra num fluxo transportador, com combinação em linha de soluções reagentes, e posterior encaminhamento da zona de reacção para o detector, em condições reprodutíveis de dispersão e temporização. O segmento de amostra introduzido no fluxo transportador estabelece duas interfaces de reacção com o transportador, podendo estabelecer múltiplas interfaces no caso da aplicação da estratégia de amostragem binária [52].

O volume de amostra surge como um parâmetro fundamental na medida em que condiciona o estabelecimento da zona de reacção requerendo, portanto, um controlo e optimização sistemática.

A mais recente estratégia de gestão de fluidos, designada por análise em fluxo com interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”), foi proposta por Ribeiro *et al* em 2005 [12]. Diverge do conceito tradicional de análise em fluxo contínuo pelo facto de não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagente no percurso analítico mas por se basear na penetração mútua de zonas de amostra e reagente numa interface única de reacção, encontrando-se a zona de reacção antes do sistema de detecção. O

desenvolvimento da reacção depende da penetração mútua de zonas adjacentes de amostra e reagente e do estabelecimento de gradientes de concentração.

Uma montagem analítica de um sistema SIFA típico (Figura 1.13) envolve dispositivos de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagente, que podem ser buretas automáticas, possibilitando a ocorrência de um fluxo laminar, e ainda válvulas solenóides que permitem direccionar o fluxo. De realçar que o funcionamento deste sistema é independente do dispositivo de impulsão utilizado, podendo recorrer-se, também, a microbombas solenóides para inserção e propulsão das soluções verificando-se, nesta situação, a ocorrência de um fluxo pulsado.

A montagem apresentada difere das usadas nas técnicas de fluxo contínuo precedentes pelo facto do detector ocupar a posição central e não a posição terminal. Esta localização combinada com a actuação dos dispositivos de inserção e propulsão e das válvulas solenóides possibilita a realização de diversas manipulações da interface de reacção, tais como inversões parciais, multideteccções da zona de amostra através de múltiplas inversões do sentido do fluxo e a monitorização do desenvolvimento da reacção. Os dois reactores, colocados em cada um dos lados do detector, ajudam ao nível das intervenções anteriormente referidas sendo a extensão da reacção determinada pelo percurso da interface dentro de cada reactor, através de uma rotina de controlo baseada em tempo.

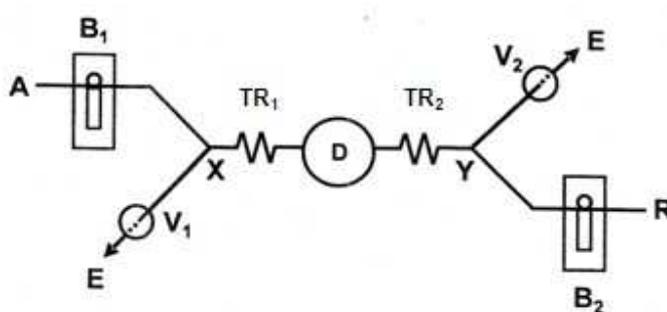


Figura 1.13 - Representação esquemática de um sistema SIFA. B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: buretas automáticas; V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub>: válvulas solenóides de duas vias; A: amostra; R: reagente; TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub>: tubos reactores; D: detector; E: esgoto (adaptado de [12]).

Ao inserir a amostra e o reagente no percurso analítico obtêm-se duas zonas adjacentes em movimento contínuo. O facto da velocidade do fluxo no centro do tubo ser superior à velocidade média do fluxo gera uma zona composta, sofrendo a primeira zona uma sobreposição da segunda (figura 1.14 - II). Este conceito, conhecido por penetração de

zonas, foi proposto por Ruzicka e Hansen [16] e adquiriu relevância com o aparecimento da metodologia SIA, ao implicar a aspiração sequencial e a inversão do sentido do fluxo para alcançar diferentes graus de penetração das zonas de amostra e reagente.

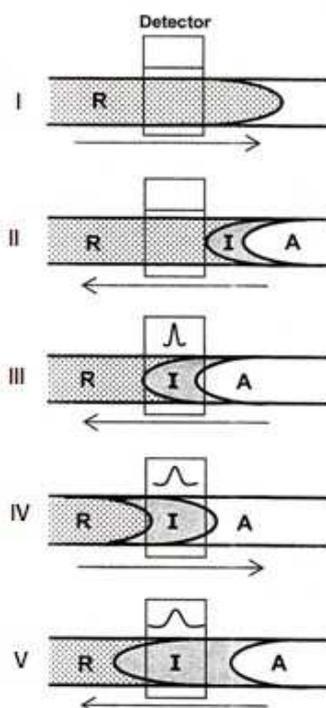


Figura 1.14 – Representação esquemática do desenvolvimento do sinal analítico num sistema SIFA. R: reagente; A: amostra; I: interface única de reacção; I) introdução de reagente; II) inserção de amostra e estabelecimento da interface única de reacção; III) primeira detecção; IV) e V) múltiplas inversões do sentido do fluxo.

À medida que a penetração de zonas aumenta é estabelecido um gradiente de concentrações ao longo da interface de reacção, não sendo necessário, no entanto, que os equilíbrios físico e químico se atinjam.

Tal como acontece na metodologia SIA, a junção dos segmentos de soluções de amostra e reagente acontece “topo a topo”, pelo que existem limitações na extensão da sobreposição de zonas adjacentes destas soluções, o que influencia a dispersão e a formação da zona de reacção. Esta sobreposição nunca é total uma vez que as zonas de amostra e reagente não apresentam limites definidos. O recurso a múltiplas inversões do sentido do fluxo (figura 1.14 – IV e V), a ajustamentos no comprimento dos reactores e à utilização de um fluxo pulsado, próprio dos sistemas MPFS, são parâmetros que podem contribuir para o aumento do grau de sobreposição de zonas adjacentes.

Embora a metodologia SIFA apresente algumas semelhanças com a estratégia SIA, particularmente na forma como ocorre a mistura entre a amostra e os reagentes, revela, também, algumas diferenças. Um exemplo é a ausência de um tubo de armazenamento, característico dos sistemas SIA, que evita a contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas.

Nos sistemas SIFA o volume de amostra inserido no percurso analítico não constitui um factor crítico uma vez que o desenvolvimento da zona de reacção é condicionado pela extensão da sobreposição de zonas adjacentes de amostra e reagente e pela formação de gradientes dinâmicos de concentração, em contraste com o que acontece nas estratégias de gestão de fluidos anteriores onde o volume de amostra se apresenta como um parâmetro fundamental, condicionando o estabelecimento da zona de reacção e exigindo um controlo e uma optimização constante.

A maior parte dos sistemas de análise em fluxo apresentam o detector no final da montagem analítica, quando operam de modo tradicional, originando uma única leitura da amostra, o que por vezes não é suficiente como no caso de determinações cinéticas [53] podendo, também, não compensar a ocorrência de eventuais erros operacionais. A informação obtida através de multideteccões efectuadas numa única zona de amostra, como acontece nos sistemas SIFA, pode ser usada para recolha de informação cinética da interface ou o estabelecimento do perfil cinético de uma zona específica, na determinação de multi-componentes, eliminação de espécies interferentes e para o ajuste da sensibilidade e do estabelecimento do intervalo de concentrações onde se verifica uma relação linear entre o sinal analítico e a concentração do analito [54]. A localização central do detector e a bi-direccionalidade do fluxo possibilitam a recolha de variada informação relativamente a uma zona específica ou mesmo a toda a interface de reacção.

A utilização de reactores de pequenas dimensões nas montagens analíticas reduz os volumes de amostra e reagente, não afectando o desenvolvimento da reacção, uma vez que o tempo de reacção pode ser aumentado recorrendo a múltiplas inversões no sentido do fluxo, sem que isso origine um aumento da dispersão e conseqüente diminuição do sinal analítico, como ocorre nas estratégias de gestão de fluidos em fluxo contínuo anteriores. De salientar que com esta técnica as medidas são efectuadas no estado estacionário.

Esta estratégia revela um elevado grau de reprodutibilidade e oferece facilidade na implementação, controlo e optimização destes sistemas, estando minimizada a importância do controlo do volume das soluções de amostra e reagentes para obtenção de um determinado grau de dispersão.

Apesar de ser uma metodologia bastante recente, os trabalhos já desenvolvidos permitem concluir que se trata de uma técnica que poderá constituir uma alternativa vantajosa, relativamente às estratégias descritas anteriormente, principalmente no que diz respeito às suas características operacionais [52].

## CAPÍTULO 2 – Modelação Matemática

---

### 2. Modelação matemática

#### 2.1 Aspectos gerais

O crescente aperfeiçoamento dos métodos instrumentais de análise química, impulsionado pela expansão dos microprocessadores e microcomputadores, promoveu o desenvolvimento de técnicas de tratamento de dados mais complexas, do ponto de vista matemático e estatístico, para processamento de diferentes tipos de sinais analíticos [55]. O aumento da quantidade e qualidade da informação experimental disponível fez emergir um conjunto de novas metodologias, desenvolvidas para extrair o máximo de conhecimento útil dos dados experimentais disponíveis [56].

A utilização num dado processo químico da análise univariada, na qual se faz variar o valor de um determinado parâmetro mantendo os restantes constantes, torna os processos de obtenção de dados muito morosos e pouco eficientes, dificultando de forma acentuada o processo de optimização de uma dada metodologia. Nas últimas décadas, foi introduzida a análise multivariada no tratamento de dados químicos, a qual, permitindo medir simultaneamente múltiplas variáveis [57], possibilita a avaliação e triagem de uma quantidade muito superior de informação. Este tipo de análise ganhou rapidamente enorme popularidade dando origem a um novo conceito: a quimiometria [58, 59].

Segundo a Sociedade Internacional de Quimiometria (ICS), “a quimiometria é a ciência que relaciona medidas de um sistema químico ou processo químico com o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos.” Por outras palavras, a quimiometria é a disciplina que se refere à aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e lógicos, a problemas de origem química, possibilitando a obtenção do máximo de informação a partir dos dados experimentais [60, 61]. Desde o seu aparecimento, no início

dos anos 70, encontrou um grande campo de aplicação na química analítica, sendo por demais evidente a sua crescente importância na resolução de problemas analíticos [62] quer no âmbito do planeamento experimental, reconhecimento de padrões, processamento de sinais, optimização, calibração multivariada e na estimativa de parâmetros. [63].

Nos procedimentos que envolvem a análise multivariada, a conversão da resposta instrumental em dados de natureza química com interesse analítico, requer a aplicação de métodos que conduzam à construção de modelos matemáticos com capacidade para descrever o desempenho ou comportamento do sistema. De acordo com Kolev [64], os modelos matemáticos propostos para a análise por injeção em fluxo, dividem-se em duas categorias principais: modelos analítico-experimentais e modelos de caixa preta.

Os modelos analítico-experimentais são assim denominados devido ao facto de poderem incorporar tanto constantes físicas fundamentais como parâmetros empíricos que só podem ser determinados experimentalmente. Dependendo da escala com que os processos físicos e químicos estudados no sistema são considerados, os modelos analítico-experimentais podem ser divididos em modelos probabilísticos e determinísticos [64]. Os modelos determinísticos operam a um nível macroscópico, e são utilizados com mais frequência na descrição matemática dos sistemas de análise por injeção em fluxo. Dentro dos modelos determinísticos, os modelos de dispersão são os que dominam a literatura científica na teoria dos sistemas FIA [64], uma vez que têm em conta as variações de comportamento de todo o sistema que descrevem.

Os modelos de caixa preta são frequentemente aplicados devido à sua flexibilidade. De uma maneira geral, estes modelos são utilizados quando é extremamente difícil, ou mesmo impossível, estabelecer a-priori a estrutura de relações entre os parâmetros de um sistema. No entanto, estes sistemas apresentam algumas limitações, que estão relacionadas com a necessidade de um elevado número de experiências para o seu desenvolvimento, da sua aplicação estar confinada à região de dados experimentais utilizados para o seu desenvolvimento e, ainda, a incapacidade de permitirem um conhecimento mais profundo sobre os processos físico-químicos que descrevem, surgem como os seus inconvenientes. Ao contrário dos modelos analítico-experimentais, os modelos de caixa-preta descrevem os sistemas baseando-se nas relações entre as variáveis de entrada e de saída, sem ter em conta os verdadeiros processos responsáveis pelas transformações entre ambas as variáveis. Estes modelos podem ser divididos em vários subgrupos dependendo da abordagem específica que utilizam, destacando-se métodos de regressão linear e redes neuronais [64].

## 2.2 Modelação mecanística

A análise por injeção em fluxo é uma metodologia cujos princípios se encontram bem compreendidos e amplamente aplicados em práticas analíticas. No entanto, o desenvolvimento dos seus fundamentos teóricos, resumidos em inúmeros livros [1, 13 e 16] e artigos de revisão [65-68] encontram-se ainda em discussão. A principal razão está relacionada com a complexidade de fenómenos físico-químicos que ocorrem nos sistemas de análise por injeção em fluxo. Representam, também, obstáculos à sua compreensão, a variedade de configurações e modos de operação desta metodologia [64].

Do ponto de vista dos processos de análise, um sistema FIA pode ser considerado como um conjunto de subsistemas, sendo o seu desempenho determinado não só pelas características dos subsistemas individuais, como pelas suas interações. Os principais subsistemas típicos de sistemas FIA, são: fenómenos de transferência de massa, fenómenos relacionados com a cinética das reacções químicas e o mecanismo envolvido na produção do sinal analítico [69].

A análise dos subsistemas referidos anteriormente, assim como das suas inter-relações, permite fazer uma representação formal do sistema, diversas vezes referida como o modelo físico. Um modelo matemático de um sistema consiste numa descrição matemática do correspondente modelo físico. Depois de validado, o modelo matemático providencia uma compreensão profunda do funcionamento do sistema, permitindo também a optimização dos parâmetros do mesmo, através de simulações numéricas [69].

### 2.2.1 Subsistemas de transferência de massa

O subsistema de transferência de massa é aquele que mais diferencia as técnicas de análise em fluxo, já que produz efeitos na formação e perfil dos sinais analíticos. Este subsistema é essencialmente responsável pela definição da função Distribuição do Tempo de Residência (do inglês, RTD), a qual descreve a distribuição dos elementos do fluido no interior de uma montagem FIA em função do tempo de residência, entre o momento da injeção da amostra e da detecção [69].

Os dois principais fenómenos de transferência de massa, responsáveis pelo transporte da amostra através dos sistemas FIA, são a convecção e a difusão, como já foi referido no Capítulo 1.

Os sistemas de transporte, em grande parte dos sistemas FIA, são constituídos predominantemente por tubos abertos de configuração linear. Considere-se um sistema de coordenadas cilíndricas para descrever os processos físico-químicos que têm lugar dentro destes tubos. Neste sistema, a posição de cada ponto, é determinada por uma coordenada radial ( $r$ ) e outra axial ( $x$ ) e, por conseguinte, a transferência de massa possui uma componente radial e outra axial. Num tubo com raio ( $a$ ), dependendo da velocidade linear média do fluxo ( $\bar{u}$ ), da viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) e da densidade ( $\rho$ ) do líquido, o fluxo pode ter uma natureza hidrodinâmica laminar ou turbulenta. Sob as condições de fluxo laminar, representado por um conjunto regular de linhas de corrente paralelas e estáveis no tempo, o perfil de velocidade, descrito pela equação (2.1) tem uma forma parabólica (Figura 2.1 - I).

$$u = 2\bar{u} \left[ 1 - \left( \frac{r}{a} \right)^2 \right] \quad (2.1)$$

A velocidade linear do fluxo ( $u$ ) nas paredes do tubo é zero e atinge o valor máximo, o qual é o dobro da velocidade média, no centro do tubo ( $r = 0$ ).

A transição entre o fluxo laminar e o fluxo turbulento ocorre quando o número de Reynolds (Equação 2.2) excede 2100 [13].

$$R_e = \frac{2a\bar{u}\rho}{\mu} \quad (2.2)$$

Os caudais e diâmetros internos das tubagens tipicamente usados em FIA ( $< 5 \text{ mL min}^{-1}$ ; 0,5 - 0,8 mm, respectivamente), contribuem para que a natureza hidrodinâmica do fluxo resultante seja essencialmente laminar ( $R_e < 150$ ).

Assim sendo, após a inserção da amostra e no início do transporte da mesma (Figura 2.1 - I), uma vez que o único mecanismo de transferência de massa é a convecção, verifica-se um perfil parabólico de velocidades, resultante do facto das moléculas que se movem junto às paredes do tubo ( $r = a$ ) apresentarem uma velocidade linear nula, enquanto que as que se movem no centro ( $r = 0$ ) exibem o dobro da velocidade média.

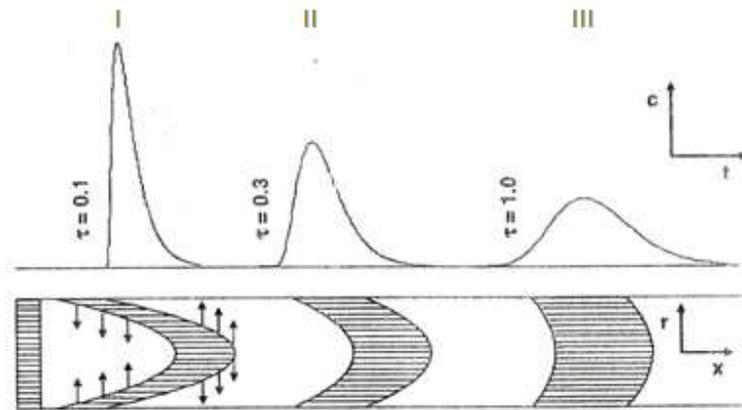


Figura 2.1 – Curva de distribuição RTD e representação da zona de amostra nos casos de: (I) Dispersão dominada por convecção; (II) Dispersão controlada por convecção e difusão; (III) Dispersão controlada por difusão. As setas representam a difusão radial. Adaptado de [69]

O subsistema de transferência de massa representado na figura 2.1-I, é caracterizado por importantes gradientes de concentração entre a zona de amostra e a solução transportadora. Estes gradientes promovem o transporte de massa por difusão. A difusão da massa quer radial ( $J_r$ ) quer axial ( $J_x$ ) pode ser descrita pela primeira Lei de Fick (Equação 2.3).

$$J_x = -D \frac{\partial c}{\partial x}; J_r = -D \frac{\partial c}{\partial r} \quad (2.3)$$

Na equação anterior  $c$  é a concentração e  $D$  o coeficiente de difusão das espécies químicas em solução.

Na maioria dos casos, devido ao baixo valor do coeficiente de difusão ( $D \sim 10^{-9} - 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ), a transferência de massa axial será completamente dominada pela convecção laminar. Portanto, a difusão radial pode-se considerar o único mecanismo de transferência de massa responsável pelo transporte da amostra entre as linhas de fluxo. Como resultado deste processo, as partículas que se encontram próximo das paredes do tubo são transportadas para o centro, onde a velocidade é superior, enquanto as que se encontram no centro são transportadas em direcção às paredes do tubo [69]. Esta movimentação das partículas promove a eficiente mistura entre as soluções presentes e provoca, simultaneamente, um alargamento gradual do perfil parabólico, formado durante a transferência de massa por convecção, produzindo curvas mais simétricas [70].

O efeito da difusão radial na dispersão da amostra será mais pronunciado nas seguintes situações: tubagens com diâmetro interno (raio) reduzido; elevados coeficientes de

difusão e longos tempos de residência da amostra no percurso analítico. Os parâmetros de transferência de massa mencionados, isto é, raio da tubagem, coeficiente de difusão e tempo de residência  $t_m$  ( $t_m = L/u$ , onde  $L$  é o comprimento), determinam a magnitude da transferência de massa por convecção e difusão e o seu efeito na dispersão da amostra. Estes parâmetros encontram-se geralmente ligados através de um modelo matemático, desenvolvido para condições de fluxo laminar (Equação 2.4), conhecido por equação de convecção-difusão [69].

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) - 2\bar{u} \left( 1 - \frac{r^2}{a^2} \right) \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.4)$$

onde  $t$  é o tempo.

Para caracterizar os sistema de transferência de massa num fluxo laminar, podem ser usados dois parâmetros adimensionais: a média do tempo de residência reduzida à escala da difusão molecular, denominada por número de Fourier (Equação 2.5) e o número de Péclet (Equação 2.6), relacionado com o raio do tubo e com o coeficiente de dispersão axial [64].

$$\tau = \frac{t_m D}{a^2} \quad (2.5)$$

$$P_{eL} = \frac{\bar{u}L}{D_L} \quad (2.6)$$

Simulações numéricas da equação de convecção-difusão revelam que sob condições FIA típicas a dispersão não é afectada por  $P_{eL}$ , sob típicas condições FIA, podendo ser caracterizada somente pelo número de Fourier. Dependendo deste valor, podem ser distinguidas três fases no desenvolvimento do processo de dispersão da amostra.

- Dispersão dominada por convecção ( $\tau < 0,1$ ): Imediatamente após a injeção da amostra no fluxo transportador, a dispersão é devida somente a transferência de massa por convecção. A zona de amostra tem um perfil parabólico (Figura 2.1 - I). À medida que aumenta a contribuição da difusão radial, as partículas começam a ser transportadas das paredes do tubo para o centro e vice-versa.

- Dispersão controlada por processos de convecção e difusão ( $0,1 < \tau < 0,8$ ): Para altos valores do número de Fourier, a dispersão da amostra é influenciada por ambos os

processos de transferência de massa, convecção e difusão. O perfil parabólico da zona de amostra é gradualmente alterado, sofrendo um alargamento (Figura 2.1 - II).

- Dispersão dominada pela difusão ( $\tau > 0,8$ ): Se a média do tempo de residência é suficientemente elevada, o estabelecimento do perfil de concentração na direcção radial torna-se altamente uniforme, embora não se verifique a mesma uniformidade na direcção axial (Figura 2.1 - III). A zona de amostra origina um sinal analítico com forma de uma curva Gaussiana [69].

Várias soluções têm sido propostas para a equação 2.4, admitindo diferentes valores para  $\tau$  e  $P_{eL}$  [71-74]. Taylor [69] resolveu analiticamente a equação 2.4, para altos números de Péclet e Fourier. Sob tais condições, esta equação pode ser reduzida a um modelo mais simples, do ponto de vista matemático, baseado na dispersão axial do segmento de amostra, representado pela equação 2.7 [75]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \bar{u} \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.7)$$

O parâmetro  $D_L$ , frequentemente referido como coeficiente de dispersão axial, é definido pela equação 2.8 [69].

$$D_L = \frac{a^2 \bar{u}^2}{48D} \quad (2.8)$$

Tendo em conta que os fenómenos de transferência de massa descritos para a metodologia FIA são os mesmos que ocorrem na metodologia SIFA, quando realizada sob condições de fluxo laminar, integrando a equação 2.7 obtém-se a seguinte equação:

$$c(t) = \frac{1}{2} \left[ \operatorname{erfc} \left( \frac{\alpha - t}{2\sqrt{\frac{t}{Pe}}} \right) \right] = \frac{1}{2} \left[ 1 + \operatorname{erf} \left( \frac{t - \alpha}{2\sqrt{\frac{t}{Pe}}} \right) \right] \quad (2.9)$$

De uma forma simplificada podemos escrever a equação 2.9 como:

$$c(t) = \frac{\gamma}{2} \left[ 1 + \operatorname{erfc} \left( \frac{t - \alpha}{\beta\sqrt{t}} \right) \right] \quad (2.10)$$

Sendo  $\alpha$  o ponto central da interface de reacção do sistema SIFA,  $\beta$  um parâmetro relacionado com o coeficiente de dispersão axial, e  $\gamma$  um parâmetro de ajuste da altura máxima do sinal analítico. O coeficiente de dispersão é dado pela equação 2.11:

$$D_L = \frac{\bar{u}_L \beta^2}{4} \quad (2.11)$$

## 2.3 Modelação empírica

Um modelo empírico baseia-se unicamente na análise estatística relativa às observações experimentais, recorrendo a técnicas de regressão, sem necessitar *a priori* do conhecimento teórico das relações entre as variáveis que definem o sistema. Neste tipo de modelos são os resultados experimentais que ditam a forma do modelo. Para este trabalho foram utilizados dois tipos de modelos empíricos, regressão linear múltipla (MLR) e redes neuronais artificiais (ANN).

### 2.3.1 Regressão linear múltipla (MLR)

A regressão linear múltipla é um método de análise multivariada que permite identificar um modelo promovendo uma relação funcional linear entre uma ou mais variáveis dependentes (respostas) e diversas variáveis independentes [76, 77]. É um dos tipos de regressão mais utilizados uma vez que é de obtenção simples. A previsão da variável dependente ( $y$ ), a partir das variáveis independentes ( $x$ ), pode ser descrita através do seguinte modelo matemático:

$$y = x\hat{b}_{MLR} + e \quad (2.12)$$

Onde  $\hat{b}_{MLR}$  representa o vector que contém os coeficientes de regressão, ajustados a partir dos dados experimentais,  $y$  a variável dependente,  $x$  uma matriz contendo todas as variáveis independentes e  $e$  os resíduos devido a factores de incerteza [77].

A determinação dos coeficientes de regressão do modelo é efectuada segundo o método dos mínimos quadrados, que minimiza o erro entre o valor da variável dependente, obtido através do modelo, e o valor experimental. Assim, de acordo com este método:

$$\hat{b}_{MLR} = X^+y \quad (2.13)$$

Sendo  $X^+$  a matriz pseudo-inversa de  $X$ . A pseudo-inversa de  $X$  obtém-se através da equação:

$$X^+ = (X^t X)^{-1} X^t \quad (2.14)$$

Sendo  $X^t$  a transposta de  $X$  e  $X^{-1}$  a matriz inversa de  $X$ .

Substituindo a equação 2.14 na 2.13, a solução é dada pela equação seguinte:

$$\hat{b}_{MLR} = (X^t X)^{-1} X^t y \quad (2.15)$$

Após encontrada uma estimativa para os vectores de regressão é fundamental analisar o modelo para que possa ser validado. Para quantificar o grau de aproximação entre os valores experimentais de  $y$  e os previstos pelo modelo encontrado utilizam-se essencialmente dois valores,  $r^2$  e  $q^2$ . O primeiro é o coeficiente de determinação entre os valores experimentais e os previstos e o segundo a fracção da variação da resposta que pode ser prevista pelo modelo.

$$r^2 = \frac{SQReg}{SQT} \quad 0 < r^2 < 1 \quad (2.16)$$

$$q^2 = \frac{SQT - PRESS}{SQT} \quad (2.17)$$

Na equação 2.16,  $SQT = \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2$  corresponde à soma quadrática total e mede a variação total das observações em torno da média ( $\bar{y}$ ) e  $SQReg = \sum_{j=1}^n (\hat{y}_j - \bar{y})^2$  corresponde à soma quadrática da regressão, medindo o desvio do valor ajustado ( $\hat{y}$ ) em relação à média [site 2]. O valor de *PRESS*, a soma do quadrado dos resíduos da previsão, é dado por:

$$PRESS = \sum_j \frac{(y_j - \hat{y}_j)^2}{(1 - h_j)} \quad (2.18)$$

Sendo  $h_j$  o elemento de índice  $j$  da diagonal da matriz  $H = Z(Z^t Z)^{-1} Z^t$  [77].

O coeficiente de determinação apresenta como inconveniente o facto de o seu valor aumentar à medida que aumentam o número de variáveis independentes incluídas no

modelo, descurando o número de graus de liberdade perdidos em cada parâmetro estimado. Assim, é preferível utilizar o coeficiente de correlação adjunto, calculado pela seguinte equação:

$$r_{adj}^2 = 1 - \frac{SQRes}{\frac{SQT}{gl}} \times \frac{n-1}{n-p} \quad (2.19)$$

Na equação 2.19  $SQRes = \sum_{j=1}^n (y_j - \hat{y}_j)^2$  corresponde à soma quadrática dos resíduos e representa o desvio do valor observado em relação ao valor ajustado, ou seja, mede a variação não explicada pelo modelo de regressão,  $n$  representa o número de experiências,  $p$  o número de variáveis independentes e  $gl$  os graus de liberdade do problema. O  $r_{adj}^2$  considera o número de variáveis independentes do modelo e é útil quando se pretende comparar modelos com diferentes números de variáveis [77].

Para verificar se o modelo desenvolvido apresenta boa capacidade de ajuste recorre-se à análise de variância (ANOVA). Esta técnica estatística baseia-se em dividir a variância total de uma determinada variável dependente em duas partes: uma devida ao modelo de regressão e outra devida aos resíduos (erros).

$$\sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2 = \sum_{j=1}^n (\hat{y}_j - \bar{y})^2 + \sum_{j=1}^n (y_j - \hat{y}_j)^2 \quad (2.20)$$

Na equação anterior, o primeiro termo da igualdade corresponde à soma quadrática total, o segundo termo à soma quadrática dos resíduos e o último termo à soma quadrática da regressão, como já foi referido.

É possível comparar os valores das variâncias usando a estatística F de Snedecor. A comparação é efectuada através do valor- $p$  na estatística F, o qual averigua se as variâncias provêm da mesma distribuição. Considera-se o limite deste valor igual a 0,05 para um grau de confiança de 95 %. O modelo da regressão aceita-se como significativo quando o valor- $p$  for inferior a 0,05. Na prática, quanto menor for este valor melhor será o modelo.

Este método, além de verificar a significância do modelo de regressão, também analisa o ajuste originado pelo modelo. No teste do erro de ajuste ("lack of fit"), divide-se a variância não modelada em duas partes: uma devida à imperfeição do modelo e outra devida à variação natural na repetição de experiências [60]. Nesta situação pretende-se que o valor de  $p$  seja superior ao valor crítico 0,05. Quando tal acontece as duas variâncias têm

magnitude idêntica. Diz-se, então, que o modelo tem erro reduzido e não demonstra erro de ajuste [77].

### **2.3.2 Redes neuronais artificiais (ANN)**

As redes neuronais artificiais são ferramentas de modelação computacional que foram amplamente aceites em diversas áreas, para modelação de problemas complexos do mundo real [78].

Podem ser consideradas estruturas maciças paralelamente distribuídas, constituídas por unidades de processamento simples, com capacidade de aprender e resolver problemas complexos, em larga escala [79]. Possuem a capacidade de aprender, de forma célere, padrões complexos e tendências presentes num conjunto de dados e de se adaptar rapidamente a mudanças que surjam. A história das redes neuronais artificiais surge como uma tentativa de modelar a actividade do cérebro humano, detendo as características fundamentais que o tornam mais poderoso do que qualquer computador existente [80]. O poder atractivo das ANN provém da forma notável como ocorre o processamento da informação, típico dos sistemas biológicos [78]. Entre as características que melhor explicam o potencial das redes neuronais destacam-se a capacidade de uma rede neuronal se adaptar a qualquer função linear ou não-linear [81], construindo modelos em torno das relações não-lineares entre os resultados experimentais e os parâmetros seleccionados; alto paralelismo; robustez; tolerância às falhas; capacidade de lidar com informações imprecisas e capacidade de generalização, a qual permite a aplicação do modelo a novos dados [82]. Apesar destas vantagens, as ANN são, facilmente, afectadas por fenómenos de sobreajustamento (“overfitting”) e os seus coeficientes (pesos e “bias”) não são de interpretação imediata, sendo exigida uma análise adicional para se compreender a forma como a informação é extraída [83].

Em síntese, o objectivo das ANN, inspiradas na estrutura biológica do cérebro humano, é o desenvolvimento de algoritmos matemáticos que permitam simular, mesmo que de forma rudimentar, o modo como o cérebro humano aprende, recorda e processa a informação.

Foram vários os autores que publicaram trabalhos acerca da teoria de redes neuronais, existindo aplicações deste conceito em várias áreas do conhecimento. A formulação matemática mais comum é a que representa a rede neuronal como uma

sequência de camadas constituídas por nodos, simulando cada nodo um neurónio, estando os nodos das camadas adjacentes interligados [56].

<b>Tipo</b>	<b>Método de Regressão</b>	<b>Técnica de fluxo</b>	<b>Referência</b>
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[84]
<b>Artigo</b>	ANN	SIA	[85]
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[86]
<b>Artigo</b>	ANN e AG	FIA	[87]
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[88]
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[89]
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[90]
<b>Artigo</b>	ANN e PLS	FIA	[91]
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[92]
<b>Artigo</b>	ANN	SIA	[93]
<b>Artigo</b>	ANN	SIA	[94]
<b>Artigo</b>	ANN	SIA	[95]
<b>Artigo</b>	ANN	SIA	[96]
<b>Artigo</b>	ANN	SIA	[97]
<b>Artigo</b>	ANN	FIA	[98]

Tabela 2.1 – Alguns estudos publicados sobre aplicações de redes neuronais em sistemas de análise em fluxo nos últimos 10 anos.

Ao comparar uma rede neuronal com um neurónio biológico (Tabela 2.2) é visível que as conexões entre os nodos representam os axónios e as dendrites, os pesos das ligações representam as sinapses e a função de activação a actividade do corpo da célula [82].

Neurónios biológicos	Neurónios Artificiais
Sinapses	Pesos das ligações
Axónios	Sinais de saída
Dendrites	Sinais de entrada
Soma	Função de activação

Tabela 2.2: Analogia entre neurónios biológicos e neurónios artificiais (adaptado de [82]).

As redes neuronais artificiais baseiam-se, assim, num modelo com estrutura idêntica ao neurónio biológico. A figura 2.2 ilustra  $n$  neurónios biológicos com vários sinais de intensidade  $x$  e forças sinápticas  $w$  e o equivalente sistema neuronal artificial [78].

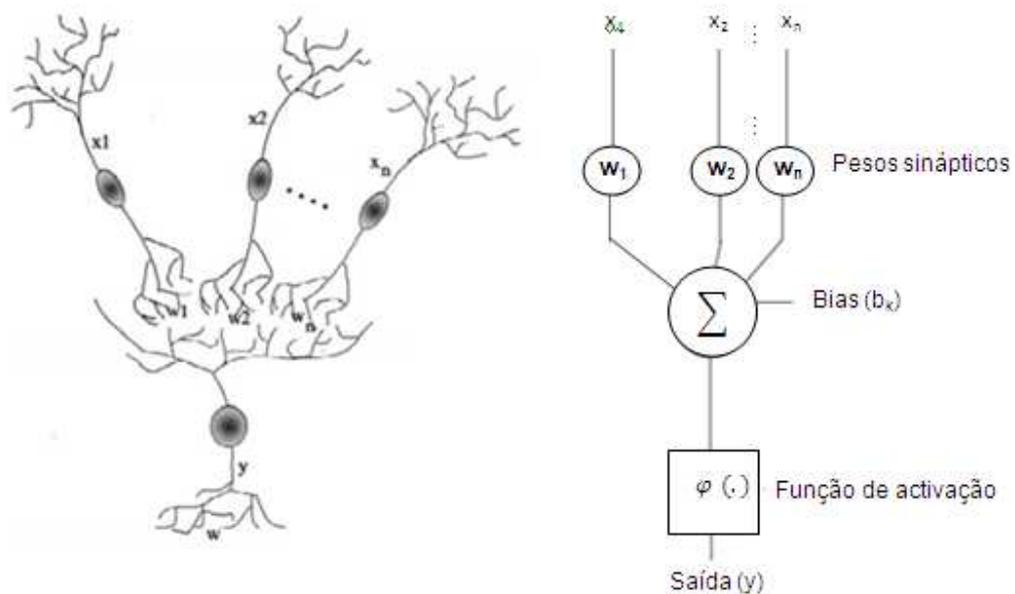


Figura 2.2 - Interação de sinais de  $n$  neurónios e analogia com a soma dos sinais num neurónio artificial compreendendo um perceptrão de camada única (adaptado de [78]).

O modelo consiste num conjunto de sinapses, cada uma delas caracterizada por um peso próprio, cuja função é activar ou desactivar uma determinada ligação, e numa função de activação para limitar a amplitude da saída do neurónio a um valor finito. Tipicamente, a amplitude normalizada da saída de um neurónio é limitada ao intervalo unitário  $[0,1]$  ou, alternativamente  $[-1,1]$ . O modelo tem ainda em conta os desvios sistemáticos (*bias*), característicos de cada neurónio (nodo).

Matematicamente, o neurónio pode representar-se através da seguinte expressão:

$$y = \varphi(\sum_i w_i x_i + b_k) \quad (2.21)$$

onde  $y$  é a saída do neurónio, isto é, o valor da função não-linear,  $\varphi$ , correspondendo às entradas  $x_i$ ,  $w_i$  os pesos das ligações e  $b_k$  é o termo designado por bias, o qual pode ou não estar presente dependendo da forma como a função de activação é definida. Quando presente, bias pode ser descrita como o peso associado a uma entrada adicional sempre igual a 1 [80].

### 2.3.2.1 Tipos de funções de activação

O modelo de McCulloch e Pitts [99], primeiro modelo fundamental sobre redes neuronais, tem sido generalizado em muitos aspectos, nomeadamente no uso de funções de activação diferentes da função “threshold”, tais como a função “piecewise linear”, sigmoideal e gaussiana (Figura 2.3) [82]. A função sigmoideal é a mais usada, uma vez que é uma função estritamente crescente, apresentando um balanço interessante entre o comportamento linear e não-linear.

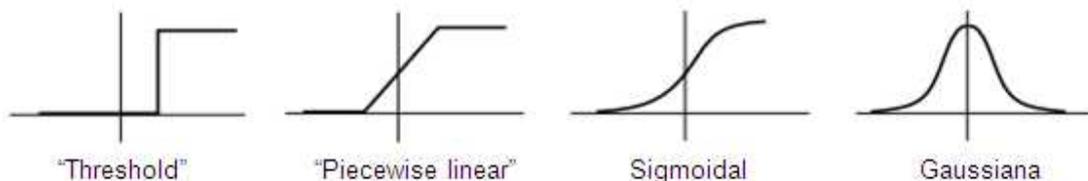


Figura 2.3 - Diferentes tipos de funções de activação (I e II – lineares; III e IV – não-lineares).

Todas as funções apresentadas são definidas no intervalo de 0 a 1. Por vezes, é útil uma função de activação definida no intervalo de -1 a +1. Para permitir que a função sigmoideal assumira valores negativos utiliza-se a função tangente hiperbólica.

### 2.3.2.2 Topologia das redes neuronais

As ANN podem ser definidas de diversos modos, com diferentes graus de complexidade. De uma forma geral, as redes neuronais apresentam-se como um sistema

composto por unidades de processamento simples (neurónios ou nodos), formando uma determinada disposição estrutural de camadas (entrada, intermédia e saída). Os nodos das camadas adjacentes encontram-se todos interligados [56, 78].

Segundo Haykin [79], a topologia ou arquitectura de uma rede neuronal é definida pela forma como os neurónios se arranjam em camadas e pelo conjunto das respectivas conexões. Atendendo aos padrões de conexão entre os neurónios, Jain agrupa as ANN em duas categorias: redes “feedforward” e redes “feedback” ou recorrentes. A figura 2.4 mostra as redes típicas de cada categoria.

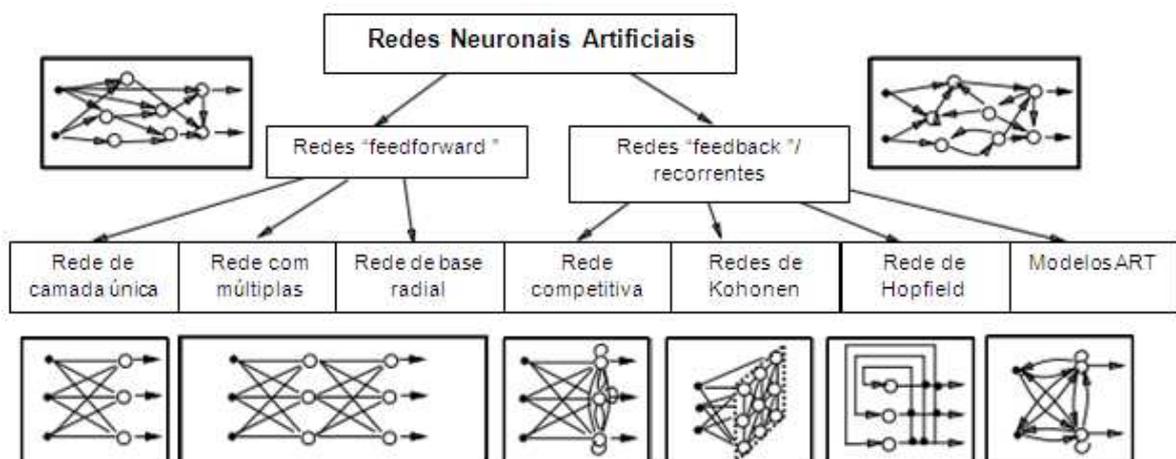


Figura 2.4 – Tipos de redes neuronais (adaptado de [82]).

Da categoria das redes “feedforward”, as mais comuns são as redes na qual os neurónios se organizam em forma de camadas. A rede de camada única, apresenta uma arquitectura com uma camada de nodos de entrada ligada a uma camada de nodos de saída. Contudo, na literatura é referida como rede de única camada, não sendo a primeira considerada, uma vez que não é formada por unidades processadoras de neurónios. Esta rede é estritamente progressiva uma vez que só existem conexões no sentido dos nodos de entrada para nodos de saída.

As redes “feedforward” com múltiplas camadas distinguem-se das primeiras, pela presença de uma ou mais camadas ocultas. Os nodos destas camadas têm como função intervir, de forma útil, entre a camada de entrada e a de saída. O conjunto de sinais obtidos na camada de saída da rede constitui a resposta global desta ao padrão de activação, fornecido pelos nodos da camada de entrada. Estas redes alcançam uma perspectiva global

devido ao aumento das ligações sinápticas e conseqüente aumento das interacções neuronais.

As redes neuronais de base radial usam a mesma arquitectura das redes com múltiplas camadas mas diferentes funções de activação (funções gaussianas).

As redes neuronais recorrentes são sistemas dinâmicos. Diferem das redes “feedforward” pelo facto de possuírem pelo menos um ciclo de realimentação. Estes, fazem com que as entradas de cada nodo sejam alteradas, levando a rede a modificar os seus parâmetros como resultado de um novo estímulo. Este processo repete-se até que haja convergência. A presença de ciclos de realimentação em redes recorrentes tem um grande impacto na capacidade de aprendizagem da rede e no seu desempenho. Estes sistemas são descritos por equações diferenciais [79, 82].

### **2.3.2.3 Aprendizagem**

A capacidade de aprender é uma característica peculiar dos sistemas inteligentes. Esta é, precisamente, a capacidade mais significativa das redes neuronais, onde a aprendizagem pode ser vista como o processo de actualização da representação interna da rede, arquitectura e pesos das ligações, em resposta a estímulos externos, para que possa executar, de uma forma eficiente, uma tarefa específica [78]. Depois de treinada, uma rede neuronal deverá ser capaz de associar uma série de valores (entradas) a uma determinada saída. Não se trata simplesmente de uma questão de memória, uma vez que as ANN possuem a capacidade de generalização, podendo encontrar respostas correctas mesmo quando os dados disponíveis para as entradas se encontram danificados ou incompletos, ou mesmo quando a relação entre a entrada e a saída não é a correcta [79].

Para se compreender e conceber um processo de aprendizagem devem ter-se em conta três aspectos [82]:

⇒ Conhecer a informação disponível para que a rede opere (paradigma de aprendizagem);

⇒ Conhecer as regras que regem o processo de actualização da aprendizagem. De salientar que os algoritmos de aprendizagem de uma ANN ajustam de forma iterativa os pesos das ligações entre os neurónios na rede, até que as relações entre as entradas e as saídas da rede possam ser estabelecidas. Portanto, as regras de treino descrevem como deve ser escolhido o conjunto de pesos iniciais para que a rede consiga aprender e executar uma tarefa específica. Se, entretanto, as condições mudarem e o desempenho da rede não

for o adequado, a rede pode ser submetida a outro treino, sob as novas condições de entrada e saída, a fim de corrigir o seu desempenho. Diferentes arquitecturas de redes requerem diferentes algoritmos de aprendizagem;

⇒ Averiguar quanto a rede pode aprender a partir dos exemplos e determinar o número de padrões de treino necessários para garantir uma generalização válida.

De uma forma geral, as redes neuronais são especificadas pela topologia da rede, pelas características dos neurónios e pelas regras de treino. Aprendem por experiência a partir de dados experimentais que contenham atributos definidos para a resolução do problema.

Existem três paradigmas de aprendizagem diferentes: supervisionado, não-supervisionado e híbrido.

Na aprendizagem supervisionada, para cada padrão de entrada é especificado um padrão de saída pretendido. A aprendizagem ocorre no momento em que uma saída gerada pela rede é diferente da desejada e o algoritmo de treino ajusta os pesos das ligações de forma a minimizar o erro. Esta dinâmica é repetida tantas vezes quantas as necessárias para se atingir a solução óptima.

A aprendizagem não-supervisionada não requer nenhuma resposta associada a cada padrão de entrada. Durante o treino a rede apenas explora correlações entre os dados, e organiza os padrões em categorias a partir destas correlações [79].

A aprendizagem híbrida combina os dois paradigmas anteriores. Geralmente, uma fracção dos pesos na rede é determinada pela aprendizagem supervisionada enquanto os outros são obtidos através da aprendizagem não-supervisionada [82].

#### **2.3.2.4 Validação de uma rede neuronal artificial**

Na implementação de uma rede neuronal, normalmente o conjunto de dados é dividido aleatoriamente em duas partes: treino (calibração) e teste. O primeiro serve para treinar a rede e ajustar os seus parâmetros, devendo conter um número estatisticamente significativo de dados, de modo a constituir uma amostra representativa do problema que se pretende estudar. O segundo conjunto testa a capacidade de generalização da rede, sob condições reais de utilização, prevendo novas amostras. Os dados do conjunto de teste não devem ser usados no ajuste dos parâmetros da rede.

As redes neuronais podem perder a capacidade de generalização, prejudicando o seu desempenho. Assim, para avaliar o desempenho de um modelo, aplicado em condições

diferentes das utilizadas durante o treino, recorre-se a um processo de validação da rede, dividindo o conjunto de treino, de forma a criar um conjunto de validação cuja finalidade é verificar a eficiência da rede quanto à sua capacidade de generalização durante o processo de treino, podendo também ser usado como critério de paragem do treino da rede. O conjunto de treino é aleatoriamente dividido num conjunto de dados de calibração eficaz (70 % do total de amostras) e num conjunto de dados de validação (30 % do total de amostras). Desta forma, o conjunto de dados experimentais é dividido em três conjuntos: treino, validação e teste.

Durante a validação é necessário ter em conta dois aspectos: a extrapolação e o sobre-ajustamento (“overfitting”). A extrapolação define-se como a capacidade da rede se poder aplicar a dados fora do intervalo do conjunto de treino. Assim, é essencial que os dados seleccionados para o conjunto de treino cubram o espaço mais alargado possível. Já o sobre-ajustamento ocorre quando os parâmetros do modelo se ajustam em demasia ao conjunto de treino. Tal facto pode acontecer em três situações: o conjunto de treino é muito pequeno; o número de parâmetros é excessivo ou o número de iterações é bastante elevado [56]. A figura 2.5 mostra que os erros de treino e teste decrescem no início deste processo. No entanto, a partir de um determinado número de iterações, o erro de treino continua a diminuir mas o erro de teste aumenta. A partir deste ponto os parâmetros da rede estão a ser sobre-ajustados e a rede está a modelar essencialmente ruído. Assim, este procedimento sugere que o mínimo da curva de validação seja usado como critério de finalização do treino.

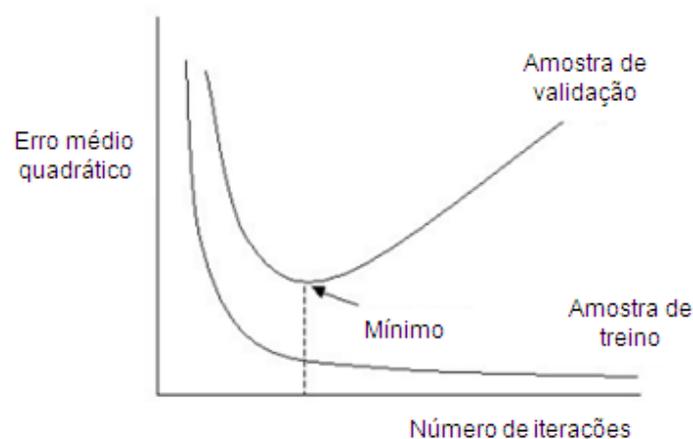


Figura 2.5 - Treino em função da capacidade de generalização da rede.

## CAPÍTULO 3 – Parte Experimental

---

### 3. Parte experimental

Neste capítulo são descritos os procedimentos utilizados na preparação das soluções, bem como os reagentes, materiais e técnicas usadas. É também referido o equipamento utilizado na concepção da montagem de fluxo, realçando-se as suas características e o modo de operação e controlo.

#### 3.1 Soluções

Nos estudos efectuados foram utilizadas como amostra soluções de um composto corado, o verde de bromocresol. Para tal, foi preparada uma solução mãe de verde de bromocresol (FLUKA), com uma concentração de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ , dissolvendo 0,1 g de corante em 50 mL de água desionizada. A água desionizada, com condutividade inferior a  $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ , foi obtida por passagem em resinas de troca iónica de leito misto, incorporadas num aparelho de desionização da marca Milli-Q, modelo RG. A água desionizada foi também usada como solução transportadora. A pesagem do corante foi realizada numa balança analítica, modelo AG 285, Mettler Toledo.

As soluções de trabalho, com uma concentração igual a  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , foram preparadas por diluição rigorosa da solução mãe em água, utilizando material de vidro de classe A.

#### 3.2 Componentes do sistema de fluxo

O sistema de fluxo implementado foi concebido recorrendo a diferentes tipos de equipamento, com diferentes características operacionais e com funções específicas na montagem analítica, nomeadamente para inserção, propulsão, comutação e transporte das soluções, e detecção e registo do sinal analítico.

### 3.2.1 Dispositivos de propulsão e inserção

A montagem analítica desenvolvida envolveu a utilização de duas buretas automáticas da marca Crison (Allella, Espanha), modelo 1S, equipadas com seringas de vidro com a capacidade de 5,0 mL (modelo 1005).

O funcionamento das buretas era baseado no movimento de um êmbolo, operado por um motor de passo, o qual era controlado externamente por um microprocessador. O curso completo do êmbolo da seringa correspondia a 40000 passos, correspondendo cada passo a um volume de 0,125  $\mu$ L. Para cada solução, o tempo de passo determinava o caudal enquanto o número de passos definia o volume introduzido na montagem analítica.

### 3.2.2 Dispositivo comutador

Na montagem estabelecida, foi utilizada uma válvula solenóide de três vias (duas entradas/uma saída), da marca NResearch Inc. (West Caldwell, USA), modelo 161 T031, como dispositivo comutador, a qual possuía uma configuração cilíndrica e reduzidas dimensões (aproximadamente 1,9 cm de diâmetro e 2,9 cm de altura). A válvula apresentava reduzido volume morto; reduzido volume interno; pressão máxima de funcionamento de 30 psi; curto tempo de resposta (5 a 20 ms para activação); elevada resistência química (revestimento em PTFE); baixo custo, baixo consumo e alimentação a 12 V.

Nesta válvula, a selecção do percurso das soluções era condicionada pela posição de duas membranas de politetrafluoretileno (PTFE) presentes na parte central da válvula (Figura 3.1). Assim, um dos percursos era seleccionado através da activação do solenóide, tendo como consequência a aplicação de uma pressão numa das membranas, enquanto que o percurso alternativo era estabelecido após o desligar da válvula, através do deslocamento de uma mola helicoidal que permitia a reposição da membrana à sua posição inicial.

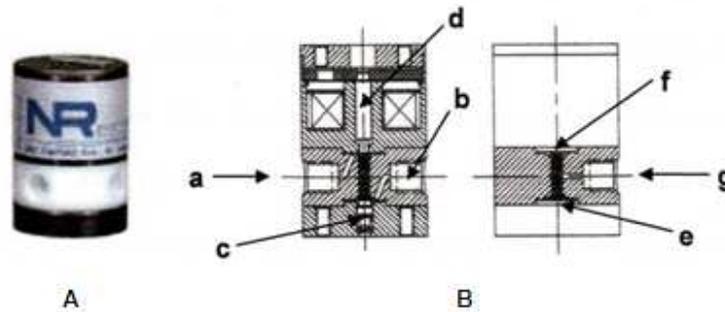


Figura 3.1 – (A) Válvula solenóide de 3 vias. (B) Representação esquemática do seu interior. a: canal de entrada 1; b: canal de entrada 2; c: mola; d: solenóide; e e f: membranas de PTFE; g: canal de saída.

Deste modo, a válvula solenóide funcionava como um interruptor, apresentando dois estados possíveis, permitindo que, em momentos diferentes, a válvula fosse activada e desactivada, alternadamente.

### 3.2.3 Tubagem e outros componentes da montagem

O sistema de tubagem para o transporte das soluções era constituído por tubos de PTFE, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm, ligados entre si por ligadores de fabrico próprio. Os reactores, com diferentes configurações (linear, espiral e figura “8”) foram construídos com tubos da mesma marca, com um diâmetro interno de 0,5 e 0,8 mm.

### 3.2.4 Sistema de detecção

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro da marca OceanOptics (Dunedin, USA) modelo USB 4000, equipado com células de fluxo Hellma (Essen, Germany) com 10 mm de percurso e com volume interno de 8, 30 ou 60  $\mu\text{L}$ . Para o estudo efectuado com a solução de verde de bromocresol as medidas de absorvância foram efectuadas a um comprimento de onda de 614 nm. Os sinais analíticos eram adquiridos através do software Spectrasuite, versão 2007 (OceanOptics, Dunedin, USA), instalado num computador Pentium-I, com o sistema operativo Windows 98.

### 3.2.5 Controlo informático do sistema

O sistema analítico desenvolvido era controlado integralmente por um computador, através de software desenvolvido no laboratório, possibilitando a selecção e o ajuste, de forma simplificada, de todos os parâmetros analíticos que condicionavam o desempenho das montagens.

Como unidade central de controlo dos componentes do sistema desenvolvido foi utilizado um computador equipado com um microprocessador Pentium I. A comunicação entre o computador e os diversos componentes da montagem de fluxo, nomeadamente os dispositivos de propulsão e inserção (buretas automáticas) e dispositivo comutador (válvula solenóide) foi efectuada através de uma interface da marca Advantech (Taipei, Taiwan), modelo PC-LabCard PCL-711B.

Para a actuação da válvula solenóide foi desenvolvido um circuito de potência, com base num circuito integrado ULN 2003 [100]. Este circuito permitia um controlo simultâneo de 7 unidades e era activado por sinais TTL através da interface anteriormente referida.

As buretas automáticas eram controladas por comunicação série usando o padrão RS-232C.

O software de controlo de dados foi elaborado especificamente para aplicação no trabalho realizado. As aplicações foram desenvolvidas com recurso a uma linguagem de alto nível (QuickBasic 4.5).

De um modo geral, o programa permitia definir a sequência de etapas para cada ensaio. As instruções dadas referiam-se à activação das buretas automáticas, sentido de funcionamento aspiração/propulsão, volume de solução, caudal e ainda à posição da válvula solenóide.

### 3.3 Montagem de fluxo

A montagem de fluxo desenvolvida, visando a implementação de um sistema de interface única (SIFA), compreendia duas buretas automáticas (Figura 3.2) responsáveis pela inserção e propulsão das soluções de corante e água. A montagem era também constituída por uma válvula solenóide  $V_s$  (duas entradas/uma saída), a qual permitia, em diferentes instantes, a introdução de solução de corante ou de solução transportadora, de forma sincronizada com os dispositivos de inserção e propulsão. O detector foi colocado na posição terminal da montagem experimental.

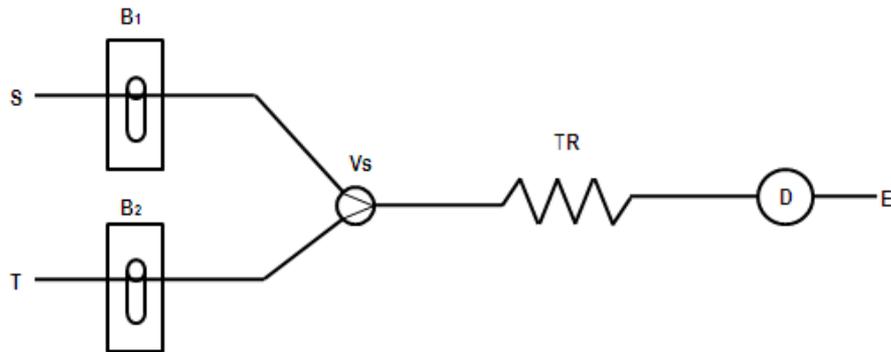


Figura 3.2 - Esquema da montagem de fluxo de interface única: S: solução verde de bromocresol; T: solução transportadora; B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>: buretas automáticas; Vs: válvula solenóide; TR: tubo reactor; D: detector; E: esgoto.

A montagem incorporava, ainda, um tubo reactor, TR, posicionado no percurso entre a válvula solenóide e o detector. A bureta B<sub>1</sub> foi utilizada para inserção e propulsão da solução de corante e a bureta B<sub>2</sub> para inserção e propulsão da solução transportadora.

O ciclo analítico tinha início com o estabelecimento da linha de base, a qual foi conseguida com a solução transportadora. Para estabelecer a linha de base, a válvula Vs era fechada e a bureta B<sub>2</sub> era activada, o que permitia a inserção da solução transportadora através do reactor, TR, para o detector. Depois de alcançar o detector a solução era encaminhada para o esgoto. Posteriormente, Vs era aberta e B<sub>1</sub> era activada, e a solução de corante era introduzida no ciclo analítico. O sinal analítico resultava da dispersão mútua das zonas adjacentes de amostra/reagente, o qual era monitorizado quando a interface única de dispersão passava através do detector. A interface era então removida para o esgoto e um novo ciclo analítico tinha início.

### 3.4 Desenho experimental

Para gerar um conjunto de dados adequados à modelação quimiométrica da interface única de reacção do sistema SIFA foi realizado um desenho experimental D-óptimo [101], com uso do programa Modde, versão 6.0 (Umetrics, Umea, Sweden). Este tipo de desenho experimental, gerado por computador, permite grande flexibilidade nas especificações do problema, apresentando grande utilidade quando se pretende restringir o número de experiências, uma vez que maximiza a informação do conjunto de experiências seleccionado, no que diz respeito a um determinado modelo (por exemplo, um modelo de

regressão). Para um determinado modelo de regressão em que  $Y$  é um vector contendo as respostas observadas nas  $N$  experiências e  $X$  uma  $(N \times p)$  matriz, sendo  $p$  o número de termos do modelo, o desenho experimental D-óptimo maximiza o determinante da matriz  $X^t X$ , que é uma medida global da informação em  $X$ . Geometricamente, isso corresponde a maximizar o volume de  $X$  num espaço  $p$  dimensional. Assim, não foi necessário recorrer ao método de análise univariada, a qual torna os processos de obtenção de resultados muito morosos.

O desenho D-óptimo, adequado ao desenvolvimento de modelos de interacção, permite a variação de vários factores simultaneamente [102]. Assim, foram variados diferentes níveis de operação dos seguintes parâmetros (factores): comprimento (L), configuração (C) e diâmetro interno (D) do reactor, volume da célula de fluxo (V) e caudal (Q). A tabela 3.1 apresenta os factores controlados e os correspondentes níveis de variação.

Abreviatura	Factor	Tipo	Níveis
<b>L</b>	Comprimento do reactor (mm)	Quantitativo	250, 500, 1000, 2000
<b>D</b>	Diâmetro interno do reactor (mm)	Quantitativo	0.5, 0.8
<b>C</b>	Configuração do reactor	Qualitativo	Linear, espiral, figura "8"
<b>V</b>	Volume da célula de fluxo ( $\mu\text{L}$ )	Quantitativo	8, 30, 60
<b>Q</b>	Caudal ( $\mu\text{Lmin}^{-1}$ )	Quantitativo	100, 500, 3000

Tabela 3.1 - Resumo dos parâmetros controlados e correspondentes níveis variação.

A concentração foi definida como um valor constante e igual a  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , uma vez que o objectivo deste trabalho era estudar a influência dos parâmetros físicos do sistema na interface da reacção. Este valor de concentração foi seleccionado com base em estudos preliminares, onde se traçou a curva de calibração, com soluções de concentração crescente de verde de bromocresol, e se estabeleceu o intervalo de concentração no qual se observava uma relação linear entre o sinal analítico e a concentração da solução, encontrando-se o valor  $15 \text{ mg L}^{-1}$  dentro do intervalo de linearidade.

No total, foram realizadas 60 experiências variando os cinco parâmetros. A tabela 3.2 mostra uma visão geral das experiências realizadas, encontrando-se a negrito as que correspondem a réplicas.

Experiência	L	V	D	C	Q
1	25	8	0,5	linear	100
2	100	8	0,5	linear	100
3	50	30	0,5	linear	100
4	200	60	0,5	linear	100
5	200	8	0,8	linear	100
6	100	8	0,8	linear	100
7	25	8	0,8	linear	100
8	200	30	0,5	linear	100
9	100	60	0,5	linear	100
10	25	8	0,5	espiral	100
11	50	30	0,8	espiral	100
12	25	60	0,8	espiral	100
13	200	8	0,8	espiral	100
14	50	30	0,5	espiral	100
15	25	60	0,5	espiral	100
16	200	8	0,5	espiral	100
17	100	30	0,5	espiral	100
18	25	60	0,8	figura "8"	100
19	100	8	0,8	figura "8"	100
20	50	30	0,8	figura "8"	100
21	200	30	0,5	figura "8"	500
22	100	60	0,5	figura "8"	500
23	25	8	0,5	figura "8"	500
24	25	8	0,8	figura "8"	500
25	200	30	0,8	figura "8"	500
26	50	8	0,8	figura "8"	500
27	25	30	0,5	figura "8"	500
28	50	60	0,5	figura "8"	500
29	200	8	0,5	linear	500
30	200	30	0,8	linear	500
<b>31</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>0,8</b>	<b>linear</b>	<b>500</b>
32	25	8	0,8	linear	500

Experiência	L	V	D	C	Q
33	100	30	0,5	linear	500
34	25	60	0,5	linear	500
35	50	8	0,5	linear	500
36	50	30	0,8	linear	500
<b>37</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>0,8</b>	<b>linear</b>	<b>500</b>
38	200	8	0,8	linear	500
39	50	30	0,5	linear	3000
40	25	60	0,5	linear	3000
<b>41</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>0,5</b>	<b>espiral</b>	<b>3000</b>
42	100	60	0,8	espiral	3000
43	200	60	0,8	espiral	3000
<b>44</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>0,5</b>	<b>espiral</b>	<b>3000</b>
45	200	30	0,5	espiral	3000
46	50	60	0,5	espiral	3000
47	25	8	0,8	espiral	3000
48	50	60	0,8	espiral	3000
49	100	8	0,8	figura “8”	3000
<b>50</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>0,5</b>	<b>figura “8”</b>	<b>3000</b>
51	50	60	0,5	figura “8”	3000
52	100	8	0,5	figura “8”	3000
<b>53</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>0,5</b>	<b>figura “8”</b>	<b>3000</b>
54	200	60	0,5	figura “8”	3000
55	200	8	0,8	figura “8”	3000
56	25	30	0,8	figura “8”	3000
57	50	30	0,8	figura “8”	3000
<b>58</b>	<b>200</b>	<b>60</b>	<b>0,8</b>	<b>figura “8”</b>	<b>3000</b>
<b>59</b>	<b>200</b>	<b>60</b>	<b>0,8</b>	<b>figura “8”</b>	<b>3000</b>
<b>60</b>	<b>200</b>	<b>60</b>	<b>0,8</b>	<b>figura “8”</b>	<b>3000</b>

Tabela 3.2 – Visão geral das experiências produzidas através desenho experimental. As réplicas encontram-se a negrito.

### 3.5 Processamento do sinal da interface

As experiências foram executadas de acordo com o desenho experimental, descrito na secção anterior. Para cada experiência foram realizados seis ciclos analíticos, obtendo-se seis réplicas do sinal da interface de reacção, através da inserção sequencial de seis segmentos de corante. Os sinais resultantes foram inicialmente filtrados, utilizando um filtro exponencial bi-direccional, para eliminar o ruído [103].

Para cada sinal  $i$ , foi estimado o valor do declive máximo ( $S_{\max,i}$ ), da largura da interface ( $W_i$ ) e do coeficiente de dispersão ( $D_{L,i}$ ). O primeiro valor foi obtido considerando-se o valor máximo da primeira derivada, o segundo por estimativa da largura do sinal da interface e o terceiro foi estimado de acordo com o modelo de dispersão controlado por difusão. Para a largura da interface impôs-se um limite igual a  $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para a primeira derivada. Para cada experiência, a média de  $S_{\max}$  e de  $W_i$  foi estimada considerando a média dos parâmetros correspondentes para as cinco réplicas finais dos sinais da interface (o primeiro sinal foi sempre eliminado).

A figura 3.3 mostra o sinal de uma experiência e a correspondente primeira derivada, onde foi sobreposta a representação do declive máximo e da largura da interface.

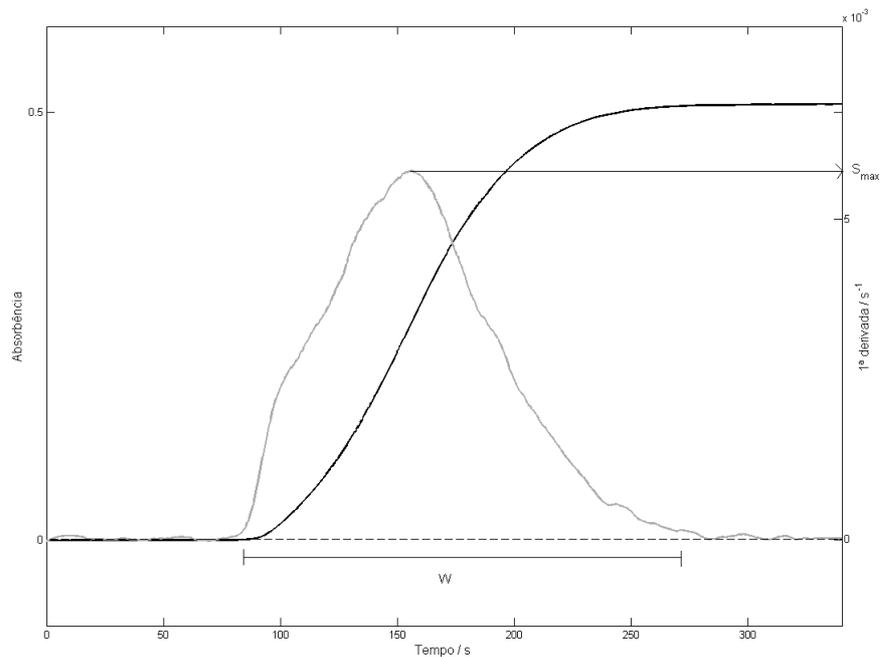


Figure 3.3 - Sinal da interface (linha carregada) e correspondente primeira derivada (linha leve) para as condições de operação  $L=250$  mm,  $V=8$   $\mu\text{L}$ ,  $D=0.5$  mm,  $C=\text{"linear"}$  e  $Q=100$   $\text{mm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ .

O processamento dos sinais foi realizado no Matlab versão 6.5 (MathWorks, Natick, MA).

### 3.6 Modelação matemática

Para modelar os parâmetros estimados a partir dos perfis experimentais de SIFA (declive máximo, largura da interface e coeficiente de dispersão axial) testaram-se modelos distintos baseados na regressão linear múltipla e em redes neuronais artificiais “feedforward”. Foi ainda ajustado um modelo multiplicativo para estimativa do coeficiente de dispersão axial [104].

Os parâmetros físicos do sistema manipulados foram usados como variáveis independentes. Uma vez que a configuração do tubo reactor era uma variável qualitativa, foi necessário substituí-la por três variáveis derivadas, cada uma contendo 0 ou 1, dependendo da configuração do reactor. Atendendo a que foram testadas três configurações diferentes, o número de regressores (variáveis independentes), para a estimativa dos modelos, passou a ser igual a sete.

Os valores  $L$ ,  $C$ ,  $D$ ,  $V$ ,  $Q$ ,  $S_{\max}$ ,  $W$  e  $D_L$  foram linearmente normalizados entre -1 e 1, antes da aplicação dos referidos métodos. Para a implementação dos modelos de regressão, os dados correspondentes às experiências produzidas foram divididos aleatoriamente em conjuntos de calibração, constituídos por 70% dos dados, e conjuntos de teste, com 30% dos dados. Os modelos foram estimados usando o conjunto de calibração e verificados usando o conjunto de teste. Sabendo que os resultados podem depender de uma determinada divisão entre calibração e teste, as previsões dos modelos foram apresentadas como a média dos resultados para o conjunto de teste, considerando 500 modelos, estimados com diferentes divisões de calibração/teste. O desempenho dos modelos foi avaliado considerando a média da raiz quadrada do erro e a média do coeficiente de determinação para os conjuntos de teste.

### 3.6.1 Método mecanístico

A interface da reacção foi inicialmente definida através do coeficiente de dispersão axial estimado a partir dos perfis experimentais. Assim, atendendo a que o modelo ajustado para cada sinal SIFA é baseado na equação 2.10, a qual inclui os parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , foi seleccionado um algoritmo de optimização de mínimos quadrados não-linear, baseado no método de Levenberg-Marquadt (lsqnonlin), para ajustar iterativamente os parâmetros de cada experiência. Os coeficientes resultantes, para cada experiência, foram calculados considerando o valor médio das diferentes réplicas. Finalmente, para cada experiência, o coeficiente  $\beta$  foi convertido em  $D_L$  usando a equação 2.11.

Este modelo foi produzido no software Matlab, versão 6.5 (MathWorks, Natick, MA).

### 3.6.2 Regressão linear múltipla

O método de regressão linear múltipla aplicado pretendeu estabelecer um modelo linear entre as variáveis independentes ( $L$ ,  $C$ ,  $D$ ,  $V$  e  $Q$ ) e as variáveis dependentes ( $S_{\max}$ ,  $W$  e  $D_L$ ). Para estimar os modelos, foi considerada uma estrutura com termos simples, de interacção e quadráticos. Os coeficientes de regressão foram estimados de acordo com o método dos mínimos quadrados.

Foi testada uma transformação logarítmica, sobre as variáveis dependentes dos modelos,  $S_{\max}$ ,  $W$  e  $D_L$ , a qual se manteve para as variáveis  $W$  e  $D_L$ , melhorando o erro de previsão. Depois de estimar os coeficientes, o modelo foi aperfeiçoado, eliminando os termos

não significativos. Para esta exclusão de termos não significativos consideraram-se os valores-p, estabelecendo um limite de 0,05 para um intervalo de confiança de 95%.

O modelo de regressão linear múltipla foi produzido usando o Modde, versão 6.0 (Umetrics, Umea, Sweden).

### 3.6.3 Redes neuronais artificiais

A maior vantagem das redes neuronais artificiais reside na sua capacidade de captar relações não-lineares entre as variáveis independentes e as variáveis dependentes. Atendendo a esta característica, foram calibradas três redes neuronais diferentes, para as variáveis dependentes em estudo, respectivamente: declive máximo; largura da interface de reacção e coeficiente de dispersão axial. A topologia considerada para modelar  $S_{max}$ ,  $W$  e  $D_L$  foi a das redes neuronais multicamadas “feedforward”, a qual considerou 3 camadas de nodos. A primeira camada, designada por camada de entrada, apresentava o número de nodos igual ao número de regressores. A segunda camada, não-linear, possuía como função de activação a função tangente hiperbólica. A terceira camada, denominada de camada de saída, era constituída por um nodo e uma função de activação linear [83]. De acordo com o teorema geral de Kolmogorov [105] sobre aproximações de funções, uma camada oculta na rede é, teoricamente, suficiente.

Após a especificação da arquitectura da rede definiu-se como algoritmo de treino o Levenberg-Marquard e os pesos e incrementos (*bias*) da rede foram estimados iterativamente usando a retro-propagação do erro, o algoritmo mais usado para treino supervisionado [106].

O conjunto de treino foi dividido aleatoriamente num conjunto de dados de calibração e num conjunto de dados de validação. O treino da rede foi interrompido sempre que o erro obtido para a validação de dados aumentava. O conjunto de teste foi, finalmente, avaliado para verificar a capacidade de generalização das redes estimadas.

As redes neuronais “feedforward”, apresentadas neste trabalho foram desenvolvidas com a toolbox de redes neuronais para o Matlab, versão 6.5 (MathWorks, Natick, MA).

### 3.6.4 Modelo multiplicativo

O coeficiente de dispersão axial foi estimado a partir do ajuste de um modelo multiplicativo, baseado na dispersão axial do segmento de amostra. Este modelo foi testado uma vez ter sido sugerido anteriormente para modelação dos coeficientes de dispersão axial obtidos para experiências FIA [104].

Uma vez estimados os valores de  $D_L$ , a partir dos perfis obtidos experimentalmente, procedeu-se ao ajuste não-linear dos coeficientes,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  e  $P_5$  ( $\text{Log}(D_L) = P_1 + P_2 L^{P_3} Q^{P_4} D^{P_5}$ ). Os parâmetros  $P_1$  a  $P_5$  foram estimados pelos mínimos-quadrados com o algoritmo de pseudo-segunda ordem Levenberg-Marquardt. O desvio padrão associado foi feito considerando diferentes subconjuntos das 60 experiências, os quais foram obtidos através de selecção com reposição. Foram gerados 500 subconjuntos distintos, dando origem a 500 conjuntos de parâmetros  $P_1$  a  $P_5$  distintos. O desvio padrão para cada parâmetro foi obtido considerando as 500 estimativas. Esta técnica designa-se por re-amostragem.

Este modelo foi produzido no software Matlab, versão 6.5 (MathWorks, Natick, MA).

## **CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussão**

---

### **4. Resultados e discussão**

Neste capítulo são apresentados os resultados da modelação da interface de reacção do sistema SIFA, seguindo as metodologias descritas anteriormente.

As 60 experiências produzidas de acordo com o desenho experimental D-ótimo, foram testadas com ordem aleatória, usando uma montagem SIFA com detecção espectrofotométrica. O desenho experimental produziu 3 experiências em duplicado e 1 em triplicado, as quais serão úteis na avaliação da reprodutibilidade do método, ou seja, no teste do erro de ajuste (lack-of-fit).

Para cada experiência, os sinais replicados foram processados de acordo com o procedimento descrito no capítulo 3 e os valores do declive máximo, largura da interface e coeficiente de dispersão axial estimados.

#### **4.1 Sinais analíticos SIFA**

Os sinais analíticos das 60 experiências SIFA, produzidas com o desenho experimental, são visíveis na figura 4.1. É clara a influência do caudal no declive do sinal analítico, sendo estes dois parâmetros directamente proporcionais.

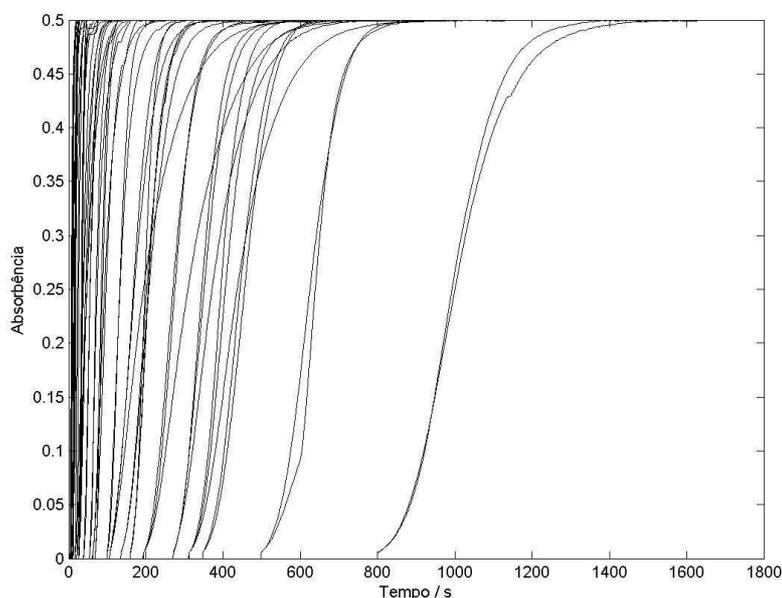


Figura 4.1 – Sinais analíticos obtidos para as 60 experiências produzidas a partir do desenho experimental.

#### 4.2 Estimativa dos parâmetros $S_{max}$ , $W$ e $D_L$ , $\alpha$ e $\beta$ a partir dos sinais analíticos

De acordo com o procedimento descrito na secção anterior, foram estimados os parâmetros  $S_{max}$ ,  $W$ ,  $D_L$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  a partir dos resultados experimentais, os quais se encontram na tabela 4.1.

Experiência	$S_{max} / s^{-1}$	$W / s$	$D_L / m^2s^{-1}$	$\alpha / s$	$\beta$
1	0,0058	162,23	0,009	167	4,01
2	0,0045	231,14	0,028	275	3,65
3	0,0044	224,13	0,022	209	4,51
4	0,0028	489,85	0,139	441	5,72
5	0,0025	506,92	0,030	995	4,25
6	0,0040	350,15	0,007	638	2,96
7	0,0029	417,49	0,006	375	5,42
8	0,0051	219,69	0,040	395	3,07
9	0,0049	233,21	0,033	272	3,95
10	0,0033	394,75	0,031	198	7,60
11	0,0034	259,11	0,006	456	3,78
12	0,0041	247,54	0,003	352	3,73

Experiência	$S_{\max} / s^{-1}$	$W / s$	$D_L / m^2s^{-1}$	$\alpha / s$	$\beta$
13	0,0024	582,24	0,039	1002	4,84
14	0,0060	178,94	0,016	203	3,85
15	0,0060	192,34	0,012	171	4,68
16	0,0041	290,42	0,056	407	3,63
17	0,0025	317,17	0,099	313	6,84
18	0,0052	184,15	0,002	346	3,28
19	0,0033	315,34	0,011	626	3,64
20	0,0037	259,50	0,006	445	3,65
21	0,0158	67,35	0,090	85	2,06
22	0,0167	60,18	0,062	56	2,41
23	0,0094	102,39	0,060	48	4,77
24	0,0201	58,08	0,004	72	2,04
25	0,0069	126,17	0,073	207	2,97
26	0,0090	75,26	0,018	97	2,91
27	0,0232	49,06	0,014	38	2,30
28	0,0167	69,16	0,044	44	2,87
29	0,0099	110,42	0,263	94	3,52
30	0,0101	102,26	0,035	198	2,04
31	0,0105	100,17	0,024	133	2,40
32	0,0140	66,72	0,007	74	2,60
33	0,0190	56,86	0,045	56	2,07
34	0,0160	70,11	0,031	39	3,45
35	0,0133	75,39	0,062	47	3,43
36	0,0166	63,61	0,008	88	1,96
37	0,0084	106,49	0,038	134	3,03
38	0,0076	131,88	0,072	207	2,94
39	0,0620	14,61	0,040	15	1,12
40	0,0562	17,09	0,028	8	1,33
41	0,0500	22,27	0,223	12	1,87
42	0,0475	21,59	0,035	27	1,18
43	0,0372	22,26	0,073	35	1,21
44	0,0577	17,16	0,095	14	1,22
45	0,0510	19,62	0,226	17	1,33
46	0,0583	12,21	0,072	9	1,51
47	0,0621	15,49	0,005	17	0,88
48	0,0597	13,22	0,012	16	0,98
49	0,0410	20,65	0,051	23	1,43
50	0,0643	13,50	0,023	11	1,21
51	0,0769	13,90	0,038	10	1,10

Experiência	$S_{\max} / s^{-1}$	$W / s$	$D_L / m^2s^{-1}$	$\alpha / s$	$\beta$
52	0,0536	20,15	0,101	18	1,26
53	0,0565	13,05	0,032	7	1,41
54	0,0340	25,41	0,467	18	1,91
55	0,0568	17,17	0,034	35	0,83
56	0,0541	16,31	0,008	17	1,13
57	0,0639	10,65	0,010	16	0,90
58	0,0466	18,13	0,052	34	1,02
59	0,0434	29,53	0,074	34	1,22
60	0,0465	31,44	0,063	34	1,12

Tabela 4.1 – Estimativa dos parâmetros  $S_{\max}$ ,  $W$ ,  $D_L$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  a partir dos sinais analíticos.

Na figura 4.2 podem observar-se três sinais analíticos, das experiências 1, 31 e 55 obtidos por ajuste do modelo de dispersão axial, a partir dos parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  calculados. É visível a boa concordância entre o sinal analítico obtido e a previsão do modelo. As curvas apresentam três declives diferentes, correspondendo a 3 experiências com caudais distintos. Com o aumento do valor do caudal verifica-se um aumento do declive, correspondente a uma menor dispersão do segmento de amostra.

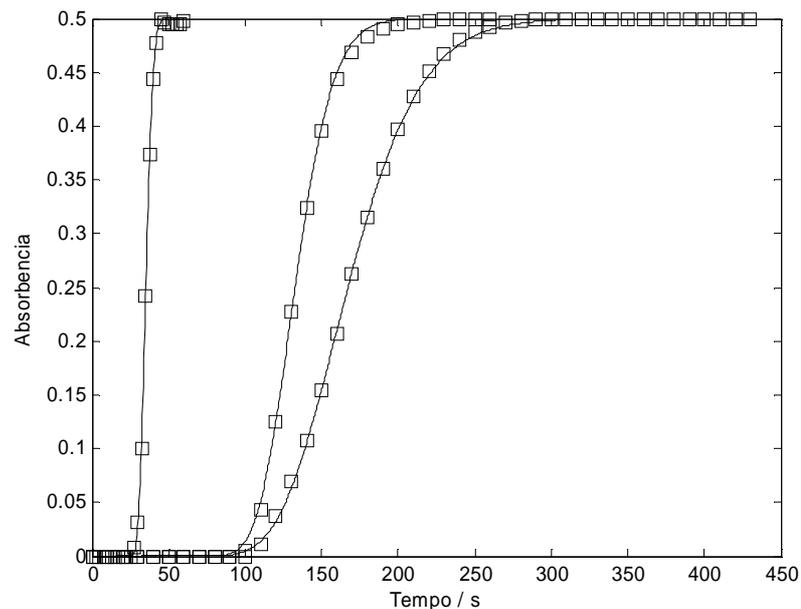


Figura 4.2 – Sinais analíticos obtidos para as experiências 1, 31 e 55 para o ajuste do modelo de dispersão axial. A linha corresponde à estimativa através do modelo de dispersão axial e os quadrados aos valores experimentais.

### 4.3 Modelação dos parâmetros analíticos

Sabendo que é comum encontrar, em trabalho experimental, situações em que na análise do conjunto de dados aparece um ou mais valores que diferem razoavelmente dos restantes, produzindo conclusões erróneas e a distorção de parâmetros [107], as experiências para o declive máximo, largura da interface e coeficiente de dispersão axial foram analisadas segundo o teste Q de Dixon. Este teste permite detectar a presença de valores discrepantes (“outliers”). Assenta em princípios matemáticos e baseia-se no quociente entre o módulo da diferença em relação ao valor mais próximo, e a amplitude de observações.

---

$$Q = \frac{\text{valor suspeito} - \text{valor mais próximo}}{\text{valor máximo} - \text{valor mínimo}} \quad (4.1)$$

As experiências 51 e 55 foram assinaladas como prováveis “outliers”, e consequentemente eliminadas, ficando 58 experiências para posterior modelação de  $S_{\max}$ ,  $W$  e  $D_L$ .

A análise de variância (ANOVA) assegurou a validação de todos os modelos MLR. Para avaliar o erro de previsão dos modelos MLR foram desenvolvidos 500 modelos, considerando a correspondente estrutura de optimização, utilizando diferentes conjuntos de calibração. Cada conjunto de calibração continha 40 amostras, seleccionadas aleatoriamente, a partir do conjunto inteiro. As restantes 18 amostras foram usadas para testar o modelo de regressão linear múltipla calibrado.

Foi calculado o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), tanto para o conjunto de calibração como para o conjunto de teste, através da mediana dos 500 coeficientes de determinação de cada conjunto. Estes dois coeficientes representam dois estimadores de qualidade do modelo, embora seja o coeficiente de determinação do teste o que reflecte a verdadeira capacidade de previsão do modelo.

No desenvolvimento de modelos baseados em redes neuronais artificiais, para os parâmetros  $S_{\max}$ ,  $W$  e  $D_L$ , foram consideradas redes com três camadas. Em termos de topologia, para implementar cada uma das redes neuronais, foi necessário optimizar o número de nodos na camada de entrada (depende das entradas da rede) e na camada interna, uma vez que estes parâmetros afectam o desempenho da ANN devendo, portanto, ser cuidadosamente escolhidos. A inclusão de variáveis não relevantes no problema em estudo (ou correlacionadas entre si) poderá prejudicar o desempenho da rede neuronal artificial.

Após a identificação das variáveis relevantes, inicialmente as mesmas seleccionadas para o modelo MLR, foram implementadas as respectivas redes neuronais artificiais para processar as variáveis escolhidas, a partir de um treino supervisionado. Para optimizar o número de nodos da camada interna foram treinadas 500 redes, sendo cada uma avaliada através do correspondente conjunto de validação. Calcularam-se os respectivos coeficientes de determinação, os quais produziram uma estimativa da precisão do modelo. O procedimento de treino foi repetido variando o número de nodos da camada interna entre 1 e 10, sendo interrompido sempre que o erro do conjunto de validação aumentava, para evitar sobre-ajustamento.

Devido à capacidade de uma rede para apreender relações não-lineares, foram seleccionados todos os parâmetros físicos, mesmo os não seleccionados para o modelo baseado na regressão linear múltipla, os quais poderiam ser estatisticamente significativos.

#### 4.3.1 Modelação do $S_{max}$

##### 4.3.1.1 Modelo utilizando a regressão linear múltipla

A partir dos resultados experimentais foi calculado o modelo de regressão linear múltipla para a variável resposta  $S_{max}$ , tendo em consideração uma estrutura de interacção.

Uma vez que a qualidade de uma inferência estatística depende da forma como os dados se aproximam de uma distribuição normal [57], iniciou-se esta etapa do trabalho analisando a distribuição do declive máximo através dos respectivos histogramas, avaliando-se o pressuposto da normalidade.

Na avaliação da contribuição dos cinco termos independentes para o modelo de  $S_{max}$  verificou-se que, devido aos valores-p do teste-t serem superiores a 0,05, para um intervalo de confiança de 95%, alguns não eram parâmetros estatisticamente significativos, nomeadamente: volume interno da célula de fluxo, configuração e diâmetro interno do tubo reactor. Após a eliminação dos termos não significativos procedeu-se à re-calibração do modelo. Este procedimento foi repetido até que só os termos com significado estatístico foram preservados. A introdução do termo de interacção  $LQ$  mostrou-se fundamental, conduzindo à melhoria do modelo, facto que se reflectiu no aumento dos coeficientes que quantificam o grau de aproximação entre os valores reais e os previstos pelo modelo.

A equação 4.2 representa a estrutura otimizada do modelo de MLR para  $S_{max}$ .

$$S_{max} = \beta_0 + \beta_1 L + \beta_2 Q + \beta_3 LQ \quad (4.2)$$

Os coeficientes e respectivos desvios padrão encontram-se apresentados na tabela 4.2.

Coeficientes de regressão	Declive máximo ( $S_{max}$ )		
	Valor	Desvio padrão	valor-p
$\beta_0$	$4.47 \times 10^{-3}$	$5.80 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-7}$
$\beta_1$	$-1.03 \times 10^{-5}$	$7.13 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-7}$
$\beta_2$	$1.98 \times 10^{-5}$	$6.28 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-7}$
$\beta_3$	$-2.87 \times 10^{-8}$	$7.73 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-7}$

Tabela 4.2 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo MLR da variável  $S_{max}$ , calibrado com as 58 experiências.

Verificou-se que  $L$  foi negativamente correlacionado com  $S_{max}$ , sendo que quanto maior for o seu valor maior será a dispersão sofrida pela amostra na interface e  $Q$  foi positivamente correlacionado com  $S_{max}$ , uma vez que quanto maior for este valor menor será a dispersão sofrida pela amostra. A figura 4.3 mostra a superfície de resposta obtida para o modelo de  $S_{max}$ .

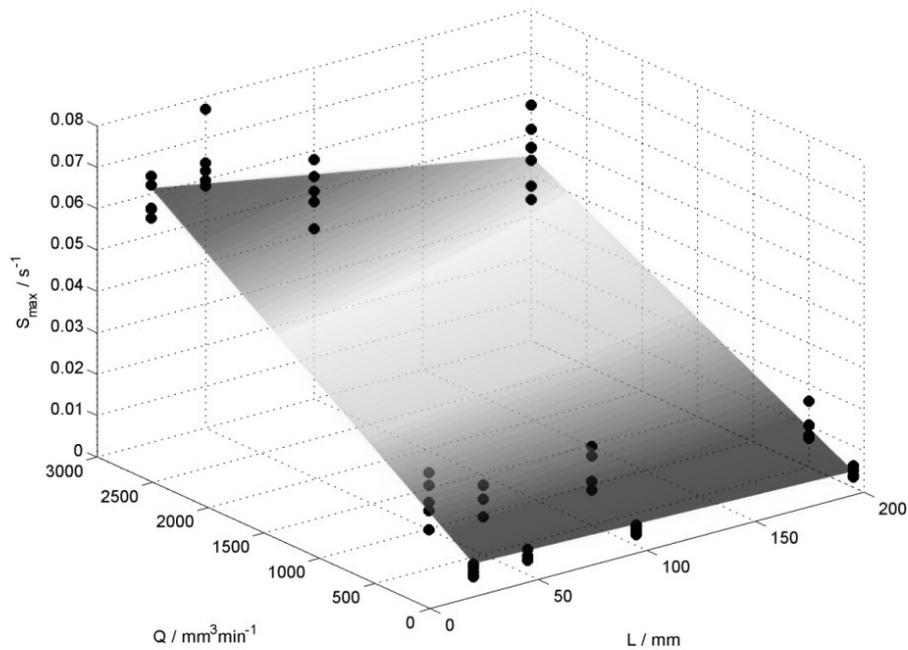


Figura 4.3 - Superfície de resposta para o modelo do declive máximo ( $S_{max}$ ) e valores experimentais correspondentes (●) para as experiências.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que se rejeita a hipótese de não haver regressão, ou seja, verificou-se que o modelo obtido para  $S_{max}$  foi estatisticamente significativo, tanto em termos de significado de regressão, como no teste do erro de ajuste. A soma quadrática da regressão foi significativamente superior à soma quadrática dos resíduos, apresentando valores-p na estatística F de Snedecor inferiores a  $1 \times 10^{-5}$  para a significância da regressão e maiores que 0,4 para o teste do erro de ajuste. O modelo estimado apresenta erro reduzido e boa capacidade de ajuste.

A tabela 4.3 sumariza os coeficientes de determinação, tanto para o conjunto de calibração como para o conjunto de teste, para o modelo de  $S_{max}$ .

MLR	
$r^2$	$S_{max}$
Calibração	0.966
Teste	0.962

Tabela 4.3 - Mediana dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de calibração e teste para o modelo de  $S_{max}$ , estimado por MLR.

Os valores do coeficiente de determinação encontrados para o conjunto de calibração foram quase idênticos aos dos correspondentes valores para o conjunto de teste, o que assegura a adequada robustez do modelo. Ambos os valores, próximos de 0,96, reflectem uma óptima concordância entre os valores previstos e experimentais, como é visível na figura 4.4.

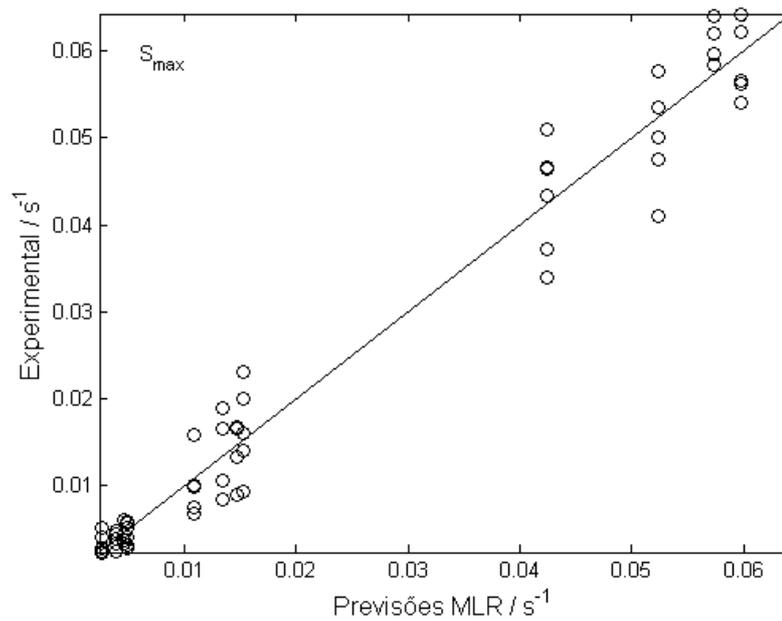


Figura 4.4 – Correlação entre os valores experimentais e os previstos para o modelo MLR do  $S_{max}$  estimado com as 58 experiências.

#### 4.3.1.2 Modelo utilizando redes neuronais artificiais

Para desenvolver um modelo para o parâmetro  $S_{max}$ , baseado em redes neuronais artificiais, foi considerada uma rede com três camadas, sendo a camada de saída constituída por um único nodo.

Uma vez que já tinha sido estimado um modelo para  $S_{max}$ , recorrendo à regressão linear múltipla, já se encontrava disponível uma indicação relativa à maioria dos parâmetros de entrada relevantes. Portanto, a rede neuronal, foi inicialmente otimizada considerando como regressores o comprimento do tubo reactor e o caudal.

Identificadas as variáveis relevantes, foi implementada a respectiva rede neuronal para processar a variável escolhida, a partir de um treino supervisionado. Os resultados do procedimento de treino demonstraram que o melhor número de nodos escondidos era 3, para o modelo de  $S_{max}$  (Figura 4.5).

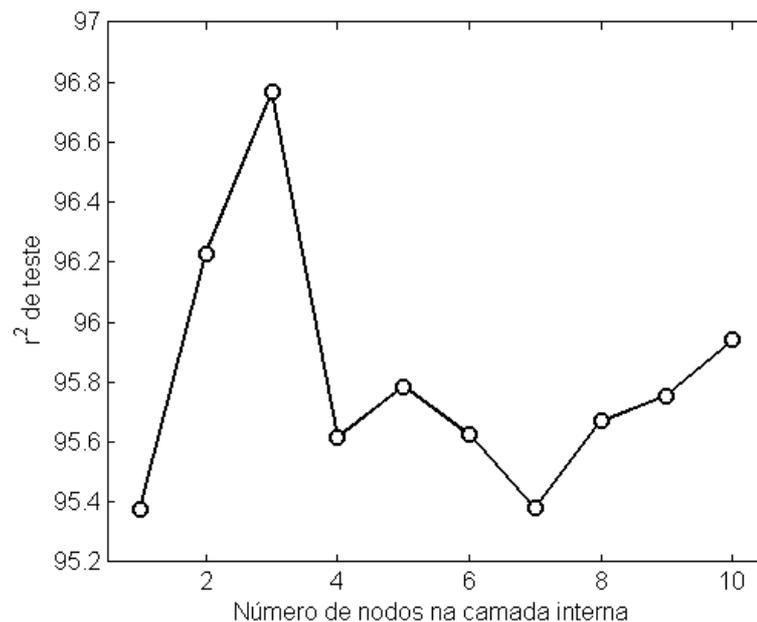


Figura 4.5 – Média do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para diferente número de nodos da camada interna para o modelo  $S_{max}$ .

Para analisar a possibilidade de existirem parâmetros estatisticamente significativos não seleccionados para o modelo baseado na regressão linear múltipla, foram treinadas diferentes redes incluindo, sequencialmente, as entradas não seleccionadas pelos modelos

MLR. No entanto, os resultados demonstraram que a introdução de novos parâmetros não produzia melhorias na estrutura já otimizada.

A topologia otimizada da rede neuronal desenvolvida encontra-se esquematizada na figura 4.6.

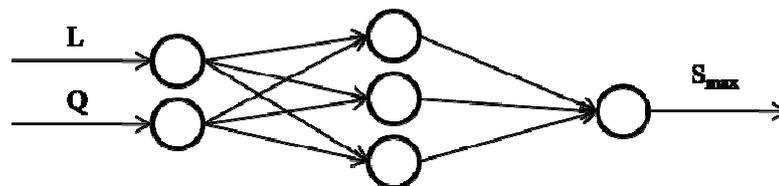


Figura 4.6 – Topologia da rede neuronal otimizada para S<sub>max</sub>.

A mediana dos coeficientes de determinação da calibração e do teste consta da tabela 4.4. É perceptível que, tal como aconteceu para os modelos MLR, os coeficientes de determinação da calibração e do teste foram muito semelhantes, e sempre maiores que 0,96. Este facto indica que se conseguiu um modelo exacto e preciso.

ANN "feedforward"	
	S <sub>max</sub>
Calibração	0.970
Teste	0.967

Tabela 4.4 – Mediana dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de calibração e teste, para o modelo de S<sub>max</sub>, estimados por ANN "feedforward".

O desvio padrão dos coeficientes de determinação indica que para um nível de significância de 0,05 a precisão dos coeficientes da regressão linear múltipla e das redes neuronais artificiais não são estatisticamente diferentes.

### 4.3.2 Modelação da largura da interface (W)

#### 4.3.2.1 Modelo utilizando a regressão linear múltipla

A partir dos resultados experimentais foi calculado um modelo de regressão linear múltipla para a variável resposta W, tendo em conta todas as variáveis lineares. No entanto, não se verificou a hipótese de normalidade, como é claro na representação gráfica dos valores experimentais em função dos valores previstos (Figura 4.7).

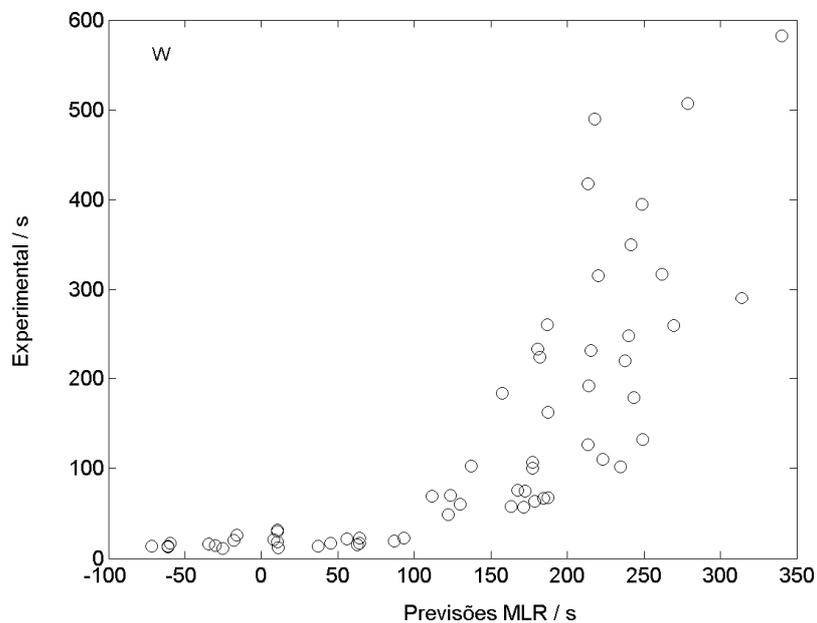


Figura 4.7 – Correlação entre os valores experimentais e os previstos para o modelo MLR de W estimado com as 58 experiências.

O mesmo facto foi visível na representação gráfica dos resíduos normalizados, não se verificando uma distribuição aleatória em torno do zero, de pequenos desvios entre os valores esperados e os observados (Figura 4.8).

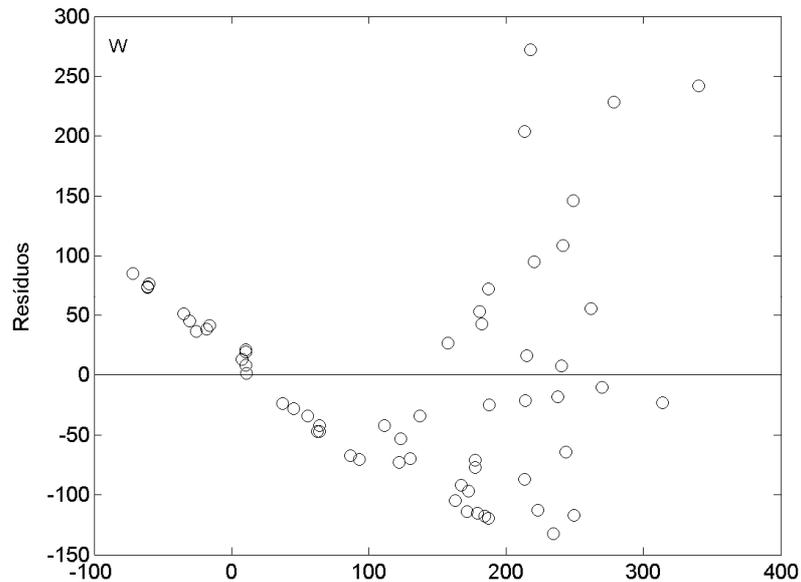


Figura 4.8 – Resíduos normalizados antes da transformação da variável  $W$ .

Foi necessário aplicar uma transformação nos valores da largura da interface, a fim de a aproximar de uma distribuição normal. Assim, os valores experimentais para  $W$  foram transformados utilizando o logaritmo decimal, o que resultou numa distribuição mais simétrica e foi calculado um modelo para  $\text{Log}(W)$ .

Para este modelo consideraram-se termos não significativos, de acordo com os valores- $p$  da estatística  $F$ , a configuração do tubo reactor e o volume interno da célula de fluxo, pelo que foram eliminados e o modelo recalibrado.

A presença do termo  $\text{Log}(Q)$  introduziu ótimos resultados, considerando-se muito importante para garantir a linearidade do modelo, uma vez que não era possível para o modelo  $\text{log}(W)$ , utilizando directamente  $Q$ .

A equação 4.3 representa a estrutura de optimização do modelo de MLR para  $\text{Log}(W)$ .

$$\text{Log}(W) = \beta_0 + \beta_1 L + \beta_2 D + \beta_3 \text{Log}(Q) \quad (4.3)$$

Os coeficientes e respectivos desvios padrão do modelo são mostrados na tabela 4.5.

Largura da interface (Log (W))			
Coeficientes de regressão	Valor	Desvio padrão	valor-p
$\beta_0$	3.87	$6.03 \times 10^{-2}$	$< 1 \times 10^{-7}$
$\beta_1$	$1.15 \times 10^{-3}$	$1.73 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-7}$
$\beta_2$	$2.19 \times 10^{-1}$	$1.38 \times 10^{-1}$	0.014
$\beta_3$	$-3.59 \times 10^{-1}$	$1.65 \times 10^{-2}$	$< 1 \times 10^{-7}$

Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo MLR da variável Log (W), calibrado com as 58 experiências.

Concluiu-se que L foi positivamente correlacionado com W e Q foi negativamente correlacionado com W. Uma correlação positiva, estatisticamente significativa, foi também encontrada entre o D e W. A figura 4.9 mostra a superfície de resposta obtida para o modelo de Log (W) fixando o diâmetro interno em 0.5 mm.

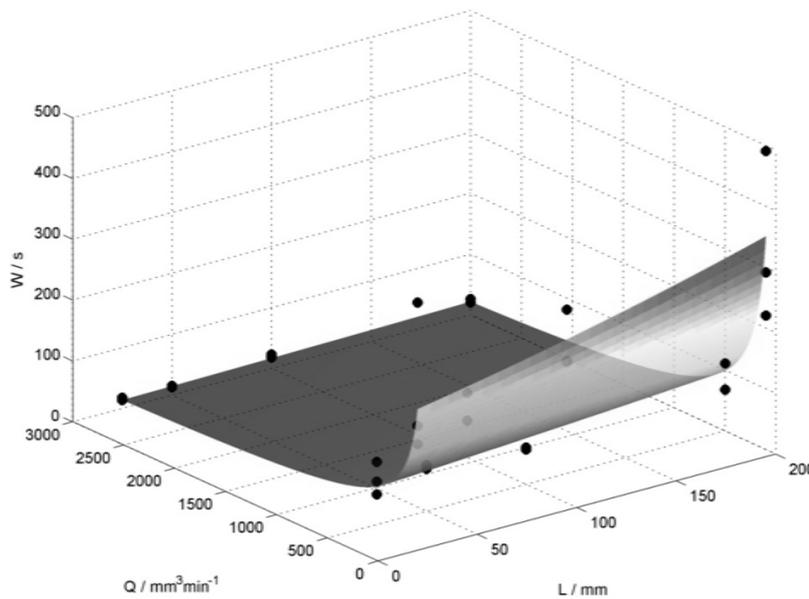


Figura 4.9 - Superfície de resposta para o modelo da largura da interface (W) e correspondentes valores experimentais (●) para as experiências com D=0.5 mm.

A análise de variância (ANOVA), mostrou que o modelo obtido para Log (W) foi estatisticamente significativo, em termos de significado de regressão e no teste do erro de ajuste. Os valores-p da estatística F foram inferiores a  $1 \times 10^{-5}$  para a significância da regressão e maiores que 0,4 para o teste do erro de ajuste, o que confere ao modelo um erro reduzido e boa capacidade de ajuste.

A mediana dos coeficientes de determinação dos conjuntos de calibração e teste para os 500 modelos desenvolvidos, encontra-se na tabela 4.6.

MLR	
$r^2$	Log (W)
Calibração	0.961
Teste	0.955

Tabela 4.6 - Mediana dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de calibração e teste para o modelo Log (W), estimados por MLR.

Mais uma vez, os valores do coeficiente de determinação encontrados para o conjunto de calibração foram muito idênticos aos dos correspondentes valores para o conjunto de teste, estando assim assegurada a robustez do modelo.

A figura 4.10 mostra que, tal como aconteceu para  $S_{\max}$ , os valores observados encontram-se linearmente correlacionados com os valores previstos, indicando um bom ajuste do modelo.

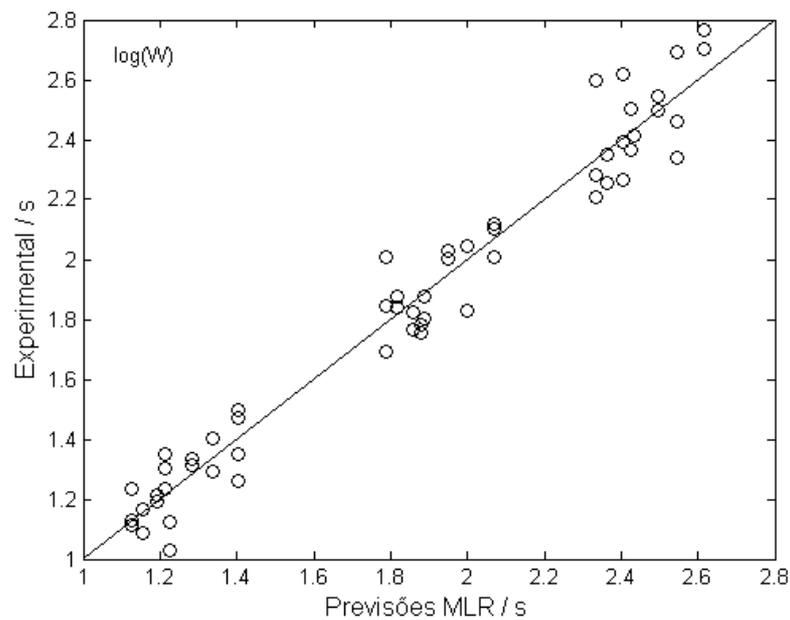


Figura 4.10 - Correlação entre os valores experimentais e os previstos para o modelo MLR do  $\log(W)$  estimado com as 58 experiências.

#### 4.3.2.2 Modelo utilizando redes neuronais artificiais

Para desenvolver o modelo para o parâmetro  $\log(W)$ , baseado em redes neuronais artificiais, foi novamente considerada uma rede com três camadas, sendo a camada de saída constituída por um único nodo ( $\log(W)$ ).

A rede neuronal foi inicialmente otimizada considerando as entradas seleccionadas para os modelos MLR: o comprimento, diâmetro interno do tubo reactor e o caudal.

Do treino resultou que o melhor número de nodos escondidos para o modelo  $\log(W)$  era 3 (Figura 4.11).

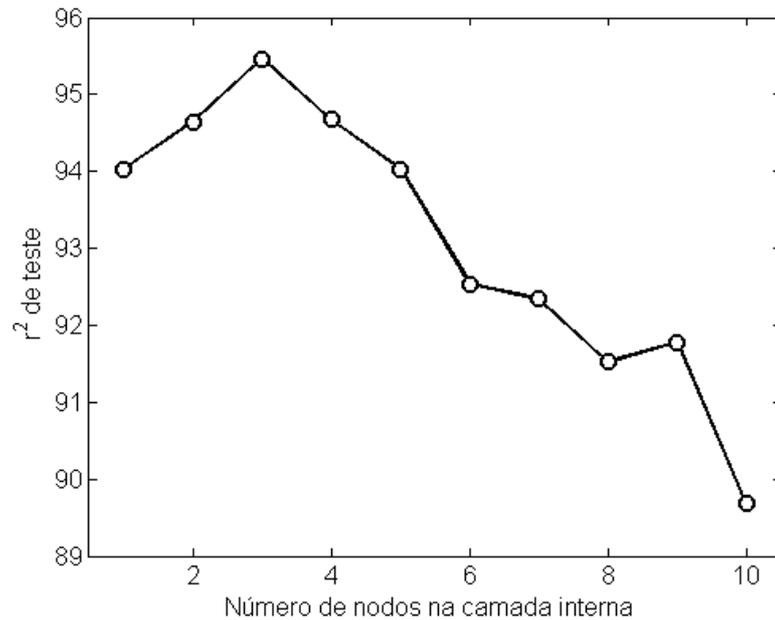


Figura 4.11 – Média do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para diferente número de nós da camada oculta para o modelo Log (W).

A introdução sequencial das entradas não seleccionadas pelo modelo MLR não originou melhorias na estrutura já otimizada. Desta forma, a topologia otimizada para a rede neuronal desenvolvida encontra-se esquematizada na figura 4.12.

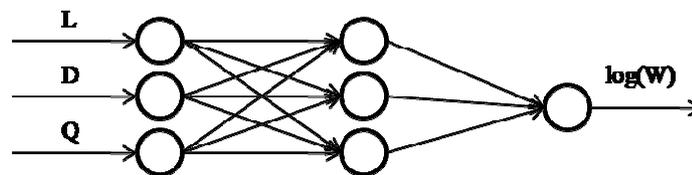


Figura 4.12 – Topologia da rede neuronal otimizada para Log (W).

Da tabela 4.7 faz parte a média dos coeficientes de determinação da calibração e do teste, sendo claro que, à semelhança do que aconteceu para o modelo MLR, os coeficientes de determinação da calibração e do teste foram muito semelhantes, e sempre maiores que 0,96, conseguindo-se um modelo exacto e preciso.

O desvio padrão dos coeficientes de determinação indica que para um nível de significância de 0,05 os coeficientes da regressão linear múltipla e das redes neurais artificiais não são estatisticamente diferentes.

---

ANN “feedforward”	
$r^2$	Log (W)
Calibração	0.964
Validação	0.961

Tabela 4.7 – Mediana dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de calibração e teste, para o modelo de Log (W), estimado por ANN “feedforward”.

### 4.3.3 Modelação de $D_L$

#### 4.3.3.1 Modelo utilizando a regressão linear múltipla

A partir dos resultados experimentais foi calculado o modelo de regressão linear múltipla para a variável resposta  $D_L$ .

Iniciou-se esta etapa do trabalho analisando a distribuição do coeficiente de dispersão através dos respectivos histogramas, concluindo-se que a hipótese de normalidade não era plausível. Assim sendo, foi necessário aplicar uma transformação nos valores desta variável, a fim de a aproximar de uma distribuição normal. Os valores experimentais de  $D_L$  foram transformados utilizando o logaritmo decimal, resultando uma distribuição mais simétrica (Figura 4.13).

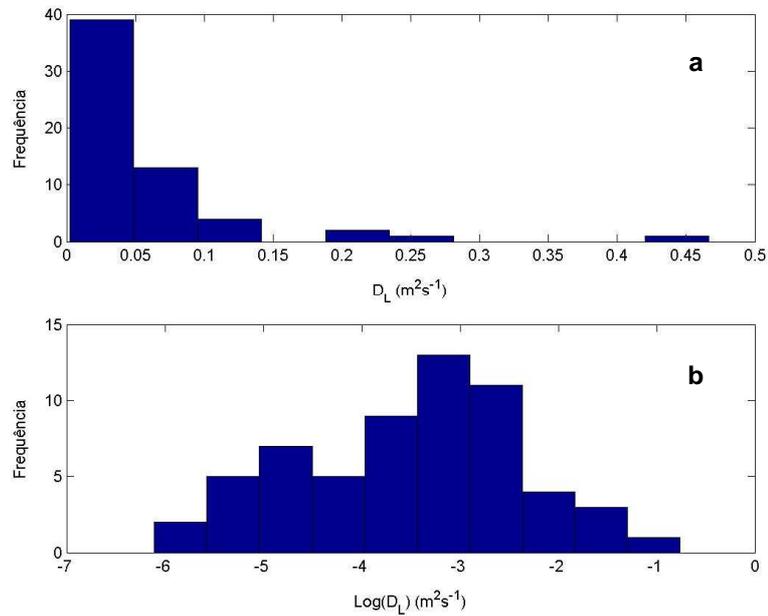


Figura 4.13 – Histogramas para os valores de  $D_L$  antes (a) e após (b) da transformação com o logaritmo decimal.

Ao avaliar a contribuição dos cinco termos independentes para o modelo de  $\text{Log}(D_L)$  verificou-se que os parâmetros configuração do tubo reactor e volume da célula de fluxo não eram estatisticamente significativos por apresentarem valores-p superiores a 0,05, para um intervalo de confiança de 95%. Depois de eliminados, o modelo foi re-calibrado até que só os termos com significado estatístico foram preservados. A presença dos termos  $\text{Log}(L)$  e  $\text{Log}(Q)$  foi muito importante para assegurar a linearidade do modelo pois tal não era possível usando directamente  $L$  e  $Q$ .

A equação 4.4 representa a estrutura de optimização do modelo de MLR para o  $\text{Log}(D_L)$ .

$$(4.4)$$

Os coeficientes e respectivos desvios padrão apresentados na tabela 4.8.

Coeficiente de dispersão (Log (D <sub>L</sub> ))			
Coeficientes de regressão	Valor	Desvio padrão	valor-p
$\beta_0$	-6.63	$2.58 \times 10^{-2}$	$<1 \times 10^{-5}$
$\beta_1$	0.98	$2.63 \times 10^{-2}$	$<1 \times 10^{-5}$
$\beta_2$	-4.31	$2.62 \times 10^{-2}$	$<1 \times 10^{-5}$
$\beta_3$	0.27	$2.61 \times 10^{-2}$	$<1 \times 10^{-5}$

Tabela 4.8 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo MLR da variável Log (D<sub>L</sub>), calibrado com as 58 experiências.

Ao analisar a tabela 4.8 verificou-se que L e Q foram positivamente correlacionados com D<sub>L</sub> e D foi negativamente correlacionado com D<sub>L</sub>. A figura 4.14 mostra a superfície de resposta obtida para o modelo de D<sub>L</sub> fixando o diâmetro interno em 0.5 mm.

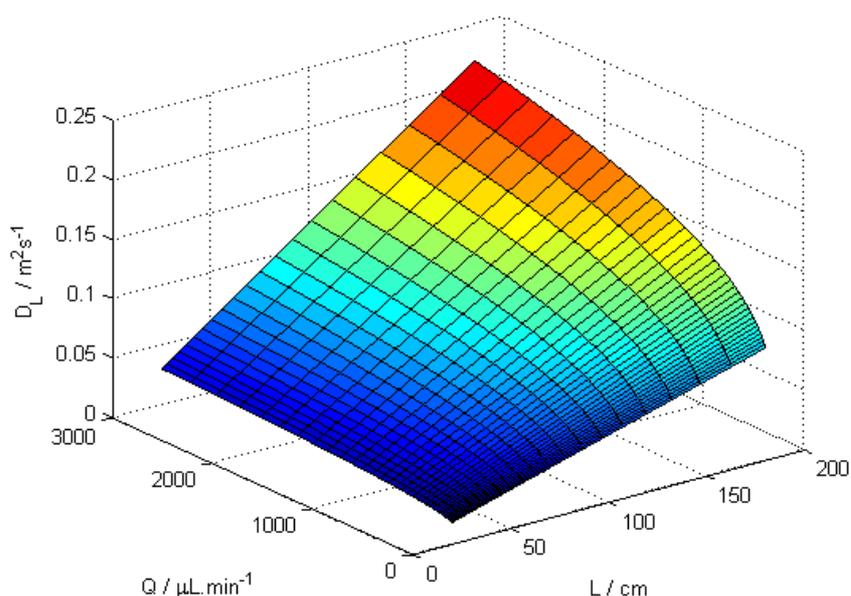


Figura 4.14 - Superfície de resposta para o modelo do coeficiente de dispersão Log ( $D_L$ ) para as experiências com  $D=0.5$  mm.

Ao efectuar a análise de variância (ANOVA), verificou-se que o modelo obtido para Log ( $D_L$ ) foi estatisticamente significativo, tanto em termos de significado de regressão, como no teste do erro de ajuste. Os valores-p foram inferiores a  $1 \times 10^{-5}$  na estatística F de Snedecor para a significância da regressão e maiores que 0,4 para o teste do erro de ajuste, apresentando o modelo estimado erro reduzido e boa capacidade de ajuste.

Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ), tanto para o conjunto de calibração como para o conjunto de teste, obtidos através da mediana dos 500 coeficientes de determinação de cada conjunto, encontram-se na tabela 4.9.

$r^2$	MLR
	Log ( $D_L$ )
Calibração	0.861
Teste	0.851

Tabela 4.9 - Mediana dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de calibração e teste para o modelo de Log ( $D_L$ ) estimado por MLR.

Os valores do coeficiente de determinação dos conjuntos de calibração e teste são semelhantes, assegurando a adequada robustez do modelo. Observando a representação

gráfica dos valores experimentais em função dos valores previstos, verificou-se grande concordância entre eles, como é visível na figura 4.15.

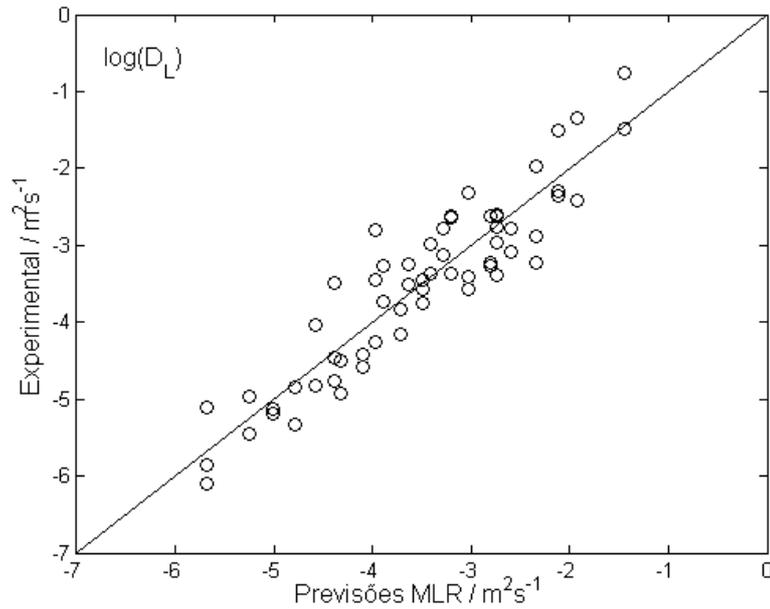


Figura 4.15. Correlação entre os valores experimentais e os previstos para o modelo MLR do Log ( $D_L$ ) estimado com as 58 experiências.

#### 4.3.3.2 Modelo utilizando redes neuronais artificiais

No processamento do modelo baseado numa rede neuronal, para o parâmetro Log ( $D_L$ ), foi considerada uma rede com três camadas, sendo a última camada constituída por um único nodo, respectivamente Log ( $D_L$ ).

Os resultados do treino demonstraram que o melhor número de nodos escondidos para o modelo Log ( $D_L$ ) era 3 (Figura 4.16).

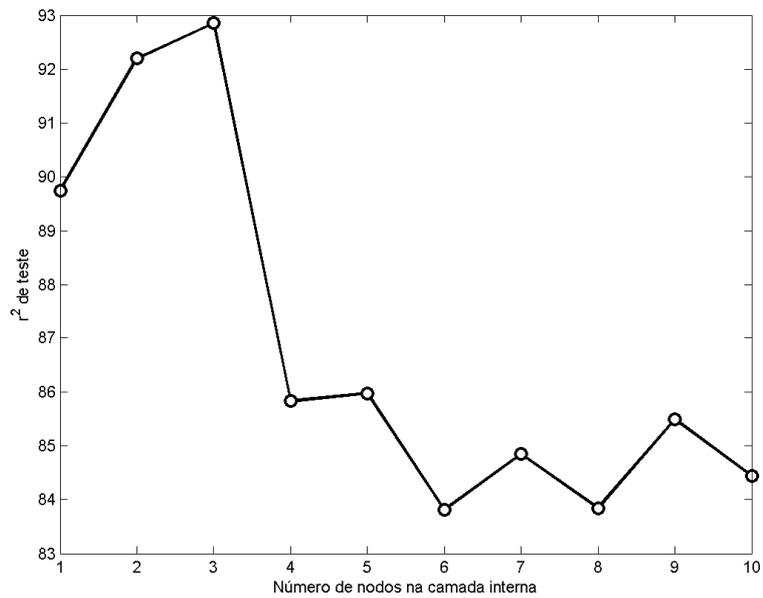


Figura 4.16 – Média do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para diferente número de nós da camada oculta para o modelo Log ( $D_L$ ).

Ao treinar diferentes redes incluindo, sequencialmente, as entradas não seleccionadas pelos modelos MLR, verificou-se que não eram produzidas melhorias na estrutura já optimizada, encontrando-se a topologia da rede neuronal desenvolvida esquematizada na figura 4.17.



Figura 4.17 – Topologia da rede neuronal optimizada para Log ( $D_L$ ).

A tabela 4.10 contém a mediana dos coeficientes de determinação da calibração e do teste. Os coeficientes de determinação da calibração e do teste foram muito semelhantes e superiores a 0,91. Este facto indica que se conseguiu um modelo exacto.

O desvio padrão dos coeficientes de determinação indica que para um nível de significância de 0,05 os coeficientes da regressão linear múltipla e das redes neurais artificiais não são estatisticamente diferentes.

ANN “feedforward”	
$r^2$	Log ( $D_L$ )
Calibração	0.916
Teste	0.929

Tabela 4.10 – Mediana dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de calibração e teste, para o modelo de Log ( $D_L$ ), estimados por ANN “feedforward”.

#### 4.3.3.3 Modelo multiplicativo

No desenvolvimento do modelo multiplicativo para Log ( $D_L$ ) foram seleccionados como regressores o comprimento e diâmetro interno do tubo reactor e o caudal.

Identificadas as variáveis relevantes, e uma vez estimados os valores de  $D_L$  a partir dos perfis obtidos experimentalmente, procedeu-se ao ajuste não linear dos coeficientes,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  e  $P_5$ .

A equação 4.5 representa a estrutura de optimização do modelo multiplicativo para Log ( $D_L$ ).

$$\text{Log} (D_L) = P_1 + P_2 L^{P_3} Q^{P_4} D^{P_5} \quad (4.5)$$

Os coeficientes e respectivos desvios padrão do modelo são mostrados na tabela 4.11, sendo os valores-p inferiores a  $1 \times 10^{-3}$  na estatística F, estando assim validada a significância estatística da regressão. Para este modelo o coeficiente de determinação foi igual a 0.843.

Coeficiente de dispersão (Log ( $D_L$ ))			
Coeficientes de regressão	Valor	Desvio padrão	valor-p
$P_1$	2.25	$4.34 \times 10^{-1}$	$<1 \times 10^{-3}$
$P_2$	$-1.89 \times 10^{-1}$	1.54	$<1 \times 10^{-3}$
$P_3$	$-1.66 \times 10^{-1}$	$3.91 \times 10^{-2}$	$<1 \times 10^{-3}$
$P_4$	$-4.29 \times 10^{-2}$	$1.22 \times 10^{-2}$	$<1 \times 10^{-3}$
$P_5$	$4.66 \times 10^{-1}$	$1.98 \times 10^{-1}$	$<1 \times 10^{-3}$

Tabela 4.11 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo multiplicativo da variável Log ( $D_L$ ), calibrado com as 60 experiências.

Estes resultados reflectem que não foi obtida vantagem alguma por modelação de dados com modelos não-lineares (ANN) para os parâmetros da interface  $S_{max}$  e  $W$ . Atendendo a que a regressão linear múltipla é uma metodologia de mais fácil interpretação e que utiliza menos coeficientes, deverá ser eleita para a modelação destes dois parâmetros da interface da reacção do sistema SIFA.

O modelo ANN para o coeficiente de dispersão axial foi o que permitiu melhores resultados indicando que os modelos lineares e o modelo multiplicativo mais simples não são capazes de identificar a relação não-linear existente entre os parâmetros físicos do sistema e o parâmetro  $D_L$ .

## CAPÍTULO 5 – Conclusão

---

### 5. Conclusão

A estratégia de gestão de fluidos baseada no conceito de interface única é relativamente recente. Apresenta uma inovação relativamente à noção tradicional de análise em fluxo contínuo, pelo facto de não implicar volumes definidos de amostra e reagente nas montagens de fluxo, mas o estabelecimento de uma interface única de reacção entre a amostra e o reagente antes da detecção, sendo a dispersão controlada.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi analisada a influência dos parâmetros físicos do sistema no sinal analítico da metodologia SIFA. Desta forma, a influência dos parâmetros comprimento, configuração e diâmetro interno do tubo reactor, volume da célula de fluxo e caudal foi avaliada no declive máximo e largura da interface do sinal analítico e no coeficiente de dispersão axial.

O sinal analítico foi gerado usando detecção espectrofotométrica. Produziu-se uma série de sessenta experiências, variando os cinco parâmetros físicos do sistema, a partir de um desenho experimental D-ótimo. Os valores experimentais obtidos do declive máximo, da largura da interface e do coeficiente de dispersão foram modelados utilizando os cinco factores operacionais com regressão linear múltipla, redes neuronais artificiais e um modelo multiplicativo baseado na dispersão axial. Os resultados MLR mostraram que os factores mais importantes foram o caudal e o comprimento do tubo reactor para modelar o declive máximo e o caudal, comprimento e diâmetro interno do tubo reactor para modelar a largura da interface e o coeficiente de dispersão axial. A optimização dos modelos ANN produziu o mesmo resultado em termos de importância de factores para modelar os três parâmetros em análise.

A exactidão e precisão dos modelos MLR e ANN foram semelhantes para os três parâmetros modelados. Todos os modelos foram testados com dados ocultos. Para o declive máximo foram obtidos coeficientes de determinação iguais a 0.962 para o modelo de MLR e 0.967 para o modelo de ANN. Na previsão da largura da interface os coeficientes de determinação foram de 0.955 para o modelo de MLR e 0.961 no modelo de ANN. Para o

coeficiente de dispersão axial os coeficientes de determinação para os modelos de MLR e ANN foram 0.851 e 0.929, respectivamente. O modelo multiplicativo para o coeficiente de dispersão mostrou um bom ajuste entre os sinais analíticos e as previsões do modelo.

De uma forma geral, não se observou vantagem especial para os modelos não-lineares quando comparados com os modelos lineares para o declive máximo e largura da interface. Assim, os modelos baseados em regressão linear múltipla tornam-se os mais adequados para a optimização de sistemas SIFA se considerarmos estes parâmetros. Contudo, a estimativa directa do coeficiente de dispersão axial, permite a imediata reconstituição gráfica do perfil de SIFA (através da Eq. 2.9). Desta forma, a utilização de uma rede neuronal artificial para estimativa do coeficiente de dispersão axial ( $D_L$ ) a partir do caudal, comprimento e diâmetro interno do reactor consiste numa solução ideal para simulação matemática de perfis SIFA para efeitos de optimização de condições experimentais.

O estudo da interface realizado no âmbito deste trabalho deixa em aberto avaliações posteriores. A caracterização da interface dos sistemas SIFA requer a implementação de esquemas reaccionais de complexidade variada, a fim de obter modelos mais completos e mais adaptados a situações reais. A influência dos parâmetros químicos na interface de um sistema SIFA poderá, também, ser objecto de estudo em investigações subsequentes.

## Referências Bibliográficas

---

- [1] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Flow-Injection Analysis, Principles and Applications, John Wiley and Sons, New York, 1987
- [2] W. E. Van der Linden, Pure Appl. Chem. 66 (1994) 2493
- [3] E. A. G. Zagatto, J. F. Van Staden, N. Maniasso, R. I. Stefan, G. D. Marshall, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 585
- [4] L. T. Skeggs, Clin. Chem. 46 (2000) 1425
- [5] V. Cerdà, Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo, SCIWARE, Palma de Maiorca, 2006
- [6] L. T. Skeggs, Am. J. Clin. Pathol. 28 (1957) 311
- [7] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145
- [8] J. Ruzicka, G. D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329
- [9] B. F. Reis, M. F. Giné, E. A.G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129
- [10] F. Albertús, B. Horstkotte, A. Cladera, V. Cerdà, Analyst 124 (1999) 1373
- [11] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125
- [12] M. F. T. Ribeiro, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, A. C. B. Dias, E. A. G. Zagatto, Talanta 68 (2005) 351
- [13] B. Karlberg, G. E. Pacey, Flow-Injection Analysis, A practical guide, Elsevier, Amsterdam, 1989
- [14] J. Ruzicka, Flow Injection Analysis, CD-ROM, FIALab Instruments, Bellevue, USA, 3.<sup>a</sup> Edição, 2005
- [15] J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta 261 (1992) 3
- [16] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Flow Injection Analysis, John Wiley and Sons, Nova York, 2.<sup>a</sup> Edição, 1988
- [17] G. D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta 261 (1992)11
- [18] M. Miró, V. Cerdà, J. M. Estela, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 199
- [19] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Fortaleza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, Talanta 50 (1999) 695
- [20] R. E. Taljaard, J. F. van Staden, Lab. Robotics. Automat. 10 (1998) 325

- [21] A. Ivaska, J. Ruzicka, *Analyst* 118 (1993) 885
- [22] J. Ruzicka, T. Gübeli, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1680
- [23] J. F. van Staden, A. Botha, *S. Afr. J. Chem.* 51 (1998) 100
- [24] T. Gübeli, G. D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2407
- [25] G. D. Marshall, J. F. van Staden, *Proc. Contr. Qual.* 3 (1992) 251
- [26] T. McCormack, J. F. van Staden, *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 111
- [27] J. Ruzicka, *Analyst* 125 (2000) 1053
- [28] V. Cerdà, J. M. Estela, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005) 231
- [29] M. D. L. Castro, J. R. Jiménez, J. A. P. Serradilla, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 118
- [30] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 390
- [31] E. A. G. Zagatto, B. F. Reis, C. C. Oliveira, R. P. Sartini, M. A. Z. Arruda, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 249
- [32] M. A. Feres, P. R. Fortes, E. A. G. Zagatto, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 1
- [33] M. C. Icardo, J. V. G. Mateo, J. M. Calatayud, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 366
- [34] A. N. Araújo, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 447
- [35] E. A. M. Kronka, B. F. Reis, M. Korn, H. Bergamin, *Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 287
- [36] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 337 (1998) 103
- [37] C. C. Oliveira, R. P. Sartini, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 332 (1996) 173
- [38] F. R. P. Rocha, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119
- [39] S. Vicente, E. P. Borges, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 3
- [40] F. R. P. Rocha, P. B. Martelli, B. F. Reis, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 38
- [41] A. A. Eiroa, J. A. Erustes, R. Forteza, V. Cerdà, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 467 (2002) 25
- [42] B. Horstkotte, O. Elsholz, V. Cerdà, *J. Flow Injection Anal.* 22 (2005) 99
- [43] V. Cerdà, C. Pons, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 236
- [44] G. Armas, M. Miró, A. Cladera, J. M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 149
- [45] F. Albertús, A. Cladera, E. Becerra, V. Cerdà, *Analyst* 126 (2001) 903
- [46] M. A. Segundo, A. O. S. S. Rangel, A. Cladera, V. Cerdà, *Analyst* 125 (2000) 1501

- [47] M. A. Segundo, H. M. Oliveira, J. L. F. C. Lima, M. I. G. S. Almeida, A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 207
- [48] V. Cerdà, *J. Flow Injection Anal.* 20 (2003) 203
- [49] J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A. C. B. Dias, M. F. T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, *Talanta* 64 (2004) 1091
- [50] J. L. M. Santos, M. F. T. Ribeiro, J. L. F. C. Lima, A. C. B. Dias, E. A. G. Zagatto, *Spectrosc. Lett.* 40 (2007) 41
- [51] J. A. V. Prior, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 1234
- [52] M. F. T. Ribeiro, *Sistemas de fluxo contínuo baseados em novos conceitos de gestão de fluidos*, FFUP, Porto, 2008
- [53] A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 57 (1989) 1803
- [54] M. Valcárcel, M. d. Luque de Castro, F. Lázaro, A. Rios, *Anal. Chim. Acta* 216 (1989) 275
- [55] R. E. Bruns, J. F. G. Faigle, *Quim. Nova* 4 (1985) 84
- [56] J. P. M. A. Lopes, *Supervisão e Diagnóstico de Processos Farmacêuticos com Métodos Inteligentes de Análise de Dados*, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2001
- [57] E. Reis, *Estatística Multivariada Aplicada*, Edições Sílabo, Lisboa, 2.<sup>a</sup> Edição, 2001
- [58] B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 52 (1980) 112R
- [59] M. M. de Sena, R. J. Poppi, R. T. S. Frighetto, P. J. Valarini, *Quim. Nova* 23 (2000) 4
- [60] V. Centner, O. Noord, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 153
- [61] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook*, Elsevier Science, Amsterdam, 1988
- [62] S. Wold, *Technometrics* 20 (1978) 397
- [63] B. K. Lavine, *Anal. Chem.* 70 (1998) 209R
- [64] S. D. Kolev, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 36
- [65] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 179 (1986) 1
- [66] R. D. Hull, R. E. Malick, J. G. Dorsey, *Anal. Chim. Acta* 267 (1992) 1
- [67] L. K. Shpigun, *J. Anal. Chem.* 45 (1990) 1045
- [68] G. Horvai, E. Pungor, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 17 (1987) 231
- [69] S. D. Kolev, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume 54, Elsevier, Amsterdam, 2008
- [70] F. A. Iñón, M. B. Tudino, *Advances in Flow Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008, 3-42
- [71] J. S. Ventras, C. M. Ventras, *AIChE J.* 34 (1988) 1423

- [72] M. J. Lighthill, *J. Inst. Math. Appl.* 2 (1966) 97
- [73] B. Hunt, *Int. J. Heat Mass Transfer* 20 (1977) 393
- [74] P. C. Chatwin, *J. Fluid Mech.* 43 (1970) 321
- [75] S. D. Kolev, *Anal. Chim. Acta* 229 (1990) 183
- [76] A. A. Afifi, V. Clark, *Computer – Aided Multivariate Analysis*, Chapman e Hall/CRC, USA, 3.<sup>a</sup> Edição, 1996
- [77] Disponível em <http://w3.ualg.pt/~eesteves/docs/RegressaoLinearMultipla.pdf> [acedido em 4/12/09]
- [78] I. A. Basheer, M. Hajmeer, *J. Microbiol. Methods* 43 (2000) 3
- [79] S. Haykin, *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, Prentice-Hall, New Jersey, USA, 2.<sup>a</sup> Edição, 1999
- [80] F. Marini, R. Bucci, A. L. Magrì, A. D. Magrì, *Microchem. J.* 88 (2008) 178
- [81] G. Cybenko *Math. Cont.Sig.Syst.* 2 (1989) 303
- [82] A. K. Jain, J. Mao, K. M. Mohiuddin, *Comput IEEE* (1996) 31
- [83] M. Hagan, H. Demuth, M. Beale, *Neural Network Design*, PWS Publishing, Boston, 1996
- [84] C. Campmajó, M. Poch, J. Robuste, F. Valero, J. Lafuente, *Analisis* 20 (1992) 127
- [85] I. Ruisanchez, J. Lozano, M. S. Larrechi, F. X. Rius, J. Zupan, *Anal Chim Acta* 348 (1997) 113
- [86] B. Hitzmann, A. Ritzka, R. Ulber, T. Scheper, K. Schugerl, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 135
- [87] J. de Gracia, A. Araujo, J. L. F. C. Lima, I. Villaescusa, M. Poch, *Anal. Chim. Acta* 402 (1999) 275
- [88] W. Li, J. Chen, B. R. Xiang, D. K. An, *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 39
- [89] G. Sun, X. G. Chen, Y. K. Zhao, M. C. Liu, Z. D. Hu, *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 123
- [90] Y. B. Zeng, H. P. Xu, H. T. Liu, K. T. Wang, X. G. Chen, Z. D. Hu, B. T. Fan, *Talanta* 54 (2001) 603
- [91] C. G. Zampronio J. J. R. Rohwedder, R. J. Poppi, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 62 (2002) 17
- [92] L. X. Sun, 2003] L. Sun, A. M. Reddy, N. Matsuda, A. Takatsu, K. Kato, T. Okada, *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 109
- [93] M. Cortina, A. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1197
- [94] A. Gutiérrez, D. Calvo, F. Céspedes, M. del Valle, *Microchim. Acta* 157 (2007) 1
- [95] P. Ciosek, W. Wroblewski, *Analyst* 132 (2007) 963
- [96] D. Calvo, M. Grossl, M. Cortina, M. del Valle, *Electroanalysis* 19 (2007) 644

- [97] M. Cortina, C. Ecker, D. Calvo, M. del Valle, J. Pharm. Biomed. Anal. 46 (2008) 213
- [98] G. Valdés-Ramírez, M. Gutiérrez, M. del Valle, M.T. Ramírez-Silva, D. Fournier, J. L. Martyd, Biosens. Bioelectron. 24 (2009) 1103
- [99] W. S. McCulloch, W. H. Pitts, B. Math. Biophys. 5 (1943) 115
- [100] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 223.
- [101] L. Eriksson, E. Janson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström, S. Wold, Design of Experiments: Principles and Applications. Umea: Umetrics AB, 2000
- [102] J. Jobson, Applied Multivariate Data Analysis, Volume 1. Regression and Experimental Design, Springer-Verlag, New York, 1991
- [103] G. Box, G. Jenkins, G. Reinsel, Time series analysis: forecasting and control, Prentice Hall, London, 3.<sup>a</sup> Edição, 1994
- [104] J. L. Montesinos, J. Alonso, M. del Valle, J. L. F. C. Lima, M. Poch, Anal. Chim. Acta 254 (1991) 177
- [105] Murtgath, F. Int. Stat. Ver. 62 (1994) 275
- [106] S. Ventura, M. Silva, D. Pérez-Bendito, Estimation of parameters of kinetic compartmental models by use of computational neural networks, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1997
- [107] Disponível em <http://www.dq.fct.unl.pt/QOF/chem6.html#outlier> [acedido em 3/05/09]