

ANÁLISE MULTICOMPONENTE SIMULTÂNEA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR UV-VIS

Teresa Cristina B. Saldanha e Mário César U. de Araújo

Departamento de Química - CCEN - Universidade Federal da Paraíba - Cidade Universitária - 58059-900 - João Pessoa - PB

Benício de Barros Neto

Departamento de Química Fundamental - CCEN - Universidade Federal de Pernambuco - 50739-907 - Recife - PE

Recebido em 21/9/98; aceito em 18/2/99

SIMULTANEOUS MULTICOMPONENT ANALYSIS BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY. This review presents the evolution of simultaneous multicomponent analysis by absorption spectrophotometry in the ultraviolet and visual regions in terms of some qualitative and quantitative analysis techniques, optimization methods, as well as applications and modern trends.

Keywords: multicomponent analysis; multivariate analysis; spectrophotometry UV-VIS.

INTRODUÇÃO

A análise multicomponente por espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS, usando reagentes cromogênicos, é tradicionalmente realizada utilizando-se um reagente específico para cada componente ou separando-se o elemento de interesse de seus interferentes. Todavia, na prática, nem sempre se dispõe de um reagente específico para cada espécie, e a separação de elementos interferentes presentes na amostra, em geral, é trabalhosa e demorada. Por esse motivo a análise espectrofotométrica simultânea de misturas normalmente se limita à análise parcial de apenas um ou dois componentes usando bandas de absorção características, quando essas aparecem isoladas. Os sistemas com mais de dois componentes são usualmente analisados por etapas, determinando-se um componente de cada vez. Portanto, as pesquisas sobre análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS (AMS-EAM) desenvolvem-se no sentido de evitar a exaustiva tarefa de separação de interferentes e de permitir a determinação simultânea de um número cada vez maior de componentes, favorecendo, conseqüentemente, a redução do tempo e do custo das análises.

PRIMEIRAS TENTATIVAS DE AMS-EAM

Algumas das primeiras tentativas de AMS são citadas por Stearns¹ que, considerando uma metodologia para análise simultânea de uma mistura de três componentes, menciona que a aplicação de equações simultâneas, às vezes, fornece resultados absurdos, como valores negativos de concentração para componentes reconhecidamente presentes nas amostras. Essas discrepâncias foram atribuídas a desvios da lei de Lambert-Beer, causados talvez, por interações entre os componentes ou pela presença de interferências absorventes.

No início dos anos sessenta, Sternberg et al.² tentaram realizar uma AMS-EAM em uma mistura de cinco componentes, empregando o método dos mínimos quadrados. O maior mérito desse trabalho foi identificar a principal causa das dificuldades encontradas nas AMS-EAM baseadas na aplicação direta da lei de Lambert-Beer aos espectros de absorção das misturas. Segundo os autores, quando os componentes da mistura têm máximos e mínimos em comprimentos de onda muito próximos, o sistema de equações simultâneas resultante é numericamente instável, pois há uma relação linear entre as equações que torna impossível encontrar uma solução única para o problema. Anteriormente essas dificuldades eram atribuídas à falta de exatidão

com que os espectros dos componentes puros eram obtidos. Embora os autores desse trabalho tenham apontado a real causa das dificuldades da AMS-EAM, na verdade não foram analisados os cinco componentes simultaneamente e sim misturas sintéticas de apenas dois ou três componentes.

Essas considerações levaram Zscheile et al.³ a propor um método para determinar a estabilidade dos sistemas lineares encontrados em AMS-EAM e assim estimar a precisão que poderia ser esperada para a solução desses sistemas. No entanto, ao analisar uma mistura de quatro componentes em condições diferentes, a melhor série de medidas obtidas por eles ainda apresentou erros relativos de até 37,7%. Em outras séries, erros relativos acima de 3.000 (três mil!)% foram encontrados.

Apesar da importância dos artigos citados, durante algum tempo não houve avanço da pesquisa nesse campo, em virtude da alta complexidade dos cálculos envolvidos no processamento dos dados das análises multicomponentes e do estágio incipiente do desenvolvimento dos computadores.

Na década de oitenta, o rápido desenvolvimento da microeletrônica e da ciência computacional favoreceu a redução do preço dos computadores e, como consequência, surgiram os microcomputadores, de uso cada vez mais crescente em laboratórios químicos. Hoje, são comuns espectrofotômetros UV-VIS interfaceados com microcomputadores para aquisição, controle e tratamento dos dados, e isso tem tornado a AMS-EAM uma ferramenta atrativa para os pesquisadores⁴.

Outro fator que veio reavivar o interesse pela AMS-EAM foi o surgimento da Quimiometria, a área da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para a resolução de problemas químicos⁵. Esses fatores vieram dar impulso à pesquisa sobre análises simultâneas de sistemas multicomponentes.

Com esses dois fatores favoráveis, as aplicações analíticas da espectrofotometria UV-VIS sofreram mudanças consideráveis, tanto na instrumentação, como por exemplo, espectrofotômetros com arranjo linear de fotodiodos (PDA, do inglês *photodiode array*), quanto na metodologia, com o desenvolvimento de procedimentos quimiométricos para processar sinais complexos.

Antes da Quimiometria, a quase totalidade dos trabalhos na área de espectrofotometria UV-VIS enfocava, predominantemente, aspectos experimentais, como a busca de novos reagentes e de novas metodologias de análise⁶⁻⁸. Depois dela, têm sido publicados artigos que enfatizam principalmente aspectos teóricos da AMS-EAM como, por exemplo, o desenvolvimento de algoritmos e de programas computacionais para tratamento dos dados⁹⁻¹⁴.

MÉTODOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA AMS-EAM

Hoje em dia, grande parte das AMS-EAM vêm sendo realizadas usando diferentes métodos de estatística multivariada. Esses métodos levam à construção de modelos matemáticos que se ajustam aos dados obtidos experimentalmente e incluem métodos de classificação, de otimização, e também métodos de análise qualitativa e/ou quantitativa, que são de especial interesse para os químicos analíticos.

Análise qualitativa

A identificação dos componentes de uma amostra é um dos mais antigos problemas da Química. Devido à sua evidente relevância, continua despertando a atenção dos cientistas, em particular dos químicos analíticos. Por esse motivo, embora o estudo da natureza das amostras não esteja entre os objetivos do presente trabalho, vale a pena citar neste contexto alguns importantes métodos multivariados de análise qualitativa.

Entre os mais conhecidos métodos multivariados de análise qualitativa encontra-se o *target transformation factor analysis*.¹⁵ Esse método tem sido indicado para identificar o número de componentes em misturas e para determinar iterativamente a composição das mesmas, e pode ser usado também para testar a presença de um suposto componente em uma mistura¹⁶.

Um outro método que fornece informações qualitativas sobre misturas multicomponentes e que também é baseado na análise de fatores é conhecido como resolução de curva multivariada^{17,18}. Ele evoluiu nos últimos vinte anos como um grupo de técnicas especialmente adequadas para estudar misturas não resolvidas, quando não se dispõe de qualquer informação prévia sobre sua natureza e composição¹⁹. Nessas técnicas o interesse é focalizado na obtenção de informação qualitativa e na resolução e recuperação dos perfis das respostas dos componentes presentes nas misturas.

Os procedimentos de resolução de curva multivariada dividem-se em métodos de modelagem, que requerem especificação da função completa do perfil da mistura não resolvida e são também chamados de modelos *hard*, e métodos de automodelagem, que não pressupõem uma função bem definida para a mistura, mas impõem certas restrições à forma geral do perfil de concentração e dos espectros¹⁵. Esses são chamados de modelos *soft*.

Gemperline e Hamilton²⁰ usaram a análise fatorial evolutiva, uma forma de automodelagem, para estimar os perfis de concentração e os espectros dos componentes individuais de uma solução ácida de íons bismuto (Bi^{3+}) em equilíbrio com seus cloro complexos, de BiCl_2^{2+} até BiCl_6^{3-} . Uma revisão sobre técnicas de automodelagem foi publicada por Hamilton e Gemperline¹⁷.

Tauler et al.²¹ descreveram e aplicaram um método de análise fatorial evolutiva a dados espectrais resultantes do monitoramento de um processo industrial. O método permite estimar as respostas espectroscópicas puras dos componentes das amostras, bem como as mudanças que ocorrem em suas concentrações no decorrer do processo.

Em outro trabalho, Tauler et al.¹⁹ apresentam um novo método de automodelagem e afirmam que o sucesso da aplicação de resolução de curva multivariada a matrizes de dados depende da seletividade e do uso adequado de restrições. A seletividade possibilita que a matriz de dados originais seja subdividida em pequenas partes, onde a complexidade da mistura não resolvida é muito menor. Segundo Geladi e Wold, citados no mesmo artigo, o posto dessas submatrizes é próximo à unidade e, portanto, as ambigüidades associadas com a decomposição em fatores analíticos é completamente resolvida.

Gargallo et al.²² aplicaram um método de automodelagem ao

estudo do comportamento da fusão de polinucleotídeos naturais e sintéticos, monitorando as mudanças que ocorrem no espectro de absorbância em diversos valores de pH.

Scarmínio e Kubista²³ afirmam que o problema da caracterização dos componentes de misturas desconhecidas pode ser resolvido registrando-se um segundo espectro de cada amostra que seja adequadamente correlacionado com o primeiro. Para haver correlação, é necessário que as contribuições dos componentes nos dois espectros tenham as mesmas distribuições de intensidades espectrais mas valores diferentes, e que a razão entre estes valores seja uma característica de cada componente. Os autores descrevem o programa DATAN, que usa somente os dados experimentais como entrada, e consideram que essa informação espectral é suficiente para determinar o número de componentes nas amostras, seus perfis espectrais, suas concentrações nas amostras e as razões entre suas respostas nas duas medidas.

Um recurso que ajuda a resolver problemas de sobreposição espectral é utilizar a espectroscopia de absorção em modo derivativo. Os espectros derivativos evidenciam a estrutura fina e permitem isolar bandas que são indistintas nos espectros diretos. Nos espectros derivativos as bandas são mais estreitas e é possível isolar aquelas que nos espectros diretos aparecem parcialmente sobrepostas formando uma única banda larga, o que torna esses espectros muito úteis para fins de identificação dos constituintes de misturas complexas²⁴. Hoje em dia, com o desenvolvimento da tecnologia dos computadores, viabilizou-se a aplicação prática dos espectros derivativos na região UV-VIS, uma vez que esses espectros, de primeira ordem ou mesmo de ordens mais elevadas, podem ser gerados quase instantaneamente a partir dos espectros de absorção²⁵.

A literatura registra uma biblioteca espectral para pesquisa de misturas usando o algoritmo Mix-Match, baseado na regressão em componentes principais, para facilitar a tarefa de identificação de amostras multicomponentes²⁶. Esse algoritmo aplica-se à identificação dos componentes de misturas binárias e ternárias e fornece também uma estimativa aproximada da composição das mesmas.

Análise quantitativa

A despeito da importância da identificação dos componentes de uma amostra, os métodos multivariados se aplicam mais frequentemente à análise quantitativa. Alguns dos métodos citados na seção anterior, que trata de análise qualitativa, também fornecem subsídios para a quantificação das amostras^{20-22,24} ou se aplicam principalmente à determinação das concentrações das espécies componentes das mesmas²³.

Os métodos multivariados de análise quantitativa empregados com maior frequência são os de calibração²⁷⁻²⁹ sendo os mais conhecidos a regressão linear múltipla, a regressão em componentes principais e a regressão por mínimos quadrados parciais (MLR, PCR e PLS, do inglês, *multiple linear regression*, *principal component regression* and *partial least squares*, respectivamente)^{11,12,27-30}. Todos esses são métodos lineares, porque os modelos resultantes descrevem uma relação linear entre as respostas e as concentrações dos componentes das amostras.

PCR e PLS são exemplos de métodos de calibração indiretos, pois não exigem que os espectros individuais dos constituintes de interesse, nem dos interferentes, sejam conhecidos previamente. Todavia, eles requerem a análise de uma série de misturas de calibração (série de treinamento), cuja composição seja conhecida³¹. Essa calibração deve levar em conta todos os fenômenos físicos e químicos que possam afetar os espectros das amostras cujas concentrações deverão ser previstas (série de teste). A regressão PLS difere da PCR por incluir, na determinação das variáveis latentes, informação da matriz das concentrações, e não apenas da matriz dos dados espectrais. Ambas são baseadas na decomposição das matrizes originais em dois conjuntos de fatores lineares

denominados escores e pesos. Por isso os dois métodos são chamados de bilineares.

Outros métodos de quantificação, também baseados na análise de fatores, tais como *target transformation factor analysis*, *rank annihilation factor analysis* e decomposição em valores singulares, são tratados por Malinowski¹⁵ e Gemperline³². Kowalski e Seasholtz³³ publicaram uma revisão sobre calibração multivariada incluindo métodos para testar a validade de modelos de calibração. Em um outro trabalho de revisão, Liang et al.¹⁸ usam a classificação dos sistemas multicomponentes em "brancos, cinzas e pretos", dependendo do nível de informação qualitativa previamente disponível, e discutem os vários métodos de calibração multivariada para análise quantitativa desses sistemas.

Pérez-Arribas et al.³⁴ compararam o algoritmo do filtro Kalman com outros métodos de calibração multivariada, entre os quais MLR, PCR e PLS. Nesse trabalho, utilizaram o filtro Kalman para a previsão de clorofenóis poluentes em misturas binárias, ternárias e quaternárias.

Uma variante da PCR, proposta por Thomas³⁵, difere dos procedimentos tradicionais por utilizar, para a previsão das concentrações dos constituintes de uma amostra de teste, as informações instrumentais das outras amostras da mesma série, para aumentar a capacidade de previsão do modelo.

Além dos métodos bilineares já citados, que são os mais usados, a literatura registra métodos de calibração multilineares, como, por exemplo, o tri-PLS³⁶. Esse novo método de regressão manipula dados *three-way*^{19,22}. Dados deste tipo ocorrem quando as variáveis são caracterizadas por uma matriz (dados de segunda ordem), ao invés de um vetor. Um conjunto de dados *three-way* é formado, por exemplo, pelos espectros de *n* misturas dos mesmos componentes químicos em proporções diferentes, registrados em diversos comprimentos de onda e em diferentes valores de pH.

Métodos de calibração multivariada também empregam dados derivativos para análise quantitativa de sistemas multicomponentes, fornecendo subsídios para a escolha da faixa espectral mais informativa para o sistema químico em questão. Embora o uso de espectros derivativos não seja uma novidade^{24,37-39}, trabalhos recentes continuam a utilizar esses dados, tratando da redução do ruído em espectros derivativos de segunda ordem⁴⁰ e da aplicação da primeira derivada à determinação simultânea de misturas binárias⁴¹.

Andrew e Worsfold⁴² usaram dados derivativos e compararam cinco métodos de calibração multivariada, aplicando-os à previsão das concentrações de íons metálicos em sistemas multicomponentes que simulam linhas de processos industriais. De acordo com eles, a calibração baseada em dados derivativos é mais precisa que a baseada diretamente nos dados de absorbância.

Normalmente, os modelos de calibração são locais, isto é, se aplicam apenas a amostras pertencentes ao espaço de concentrações varrido pela série de treinamento considerando apenas, a presença de ruído aleatório. Entretanto, Blanco et al.⁴³, aplicaram PCR à resolução de misturas binárias e estudaram a influência do ruído aleatório, do grau de sobreposição espectral e de alterações na linha de base sobre a exatidão dos resultados. A literatura também registra estudos para testar a validade de modelos de regressão em componentes principais quando as condições experimentais usadas durante a modelagem são alteradas⁴⁴.

Os métodos lineares de calibração multivariada considerados até este ponto são os mais simples e consequentemente os mais comumente usados. Porém, na prática, também são encontradas respostas cuja dependência das concentrações não é linear e, para modelá-las, várias técnicas têm sido adaptadas ou desenvolvidas, como *locally weighted regression*, *projection pursuit regression*, *alternating conditional expectations*, *multivariate adaptive regression splines* e redes neurais. Um artigo

de revisão de Sekulic et al.⁴⁵ apresenta uma visão geral de todos esses métodos não lineares, com aplicações a dados obtidos por diferentes técnicas analíticas. Os autores mostram ainda que PCR e PLS também podem ser empregadas para descrever sistemas não lineares, seja incorporando um maior número de variáveis latentes que o requerido para sistemas lineares, seja usando versões não lineares ou quadráticas dos algoritmos. A aplicação de PCR e PLS a sistemas não lineares foi tratada por Kowalski e Seasholtz³³. Vale a pena citar ainda Gemperline⁴⁶, que descreve testes para detectar regiões de resposta não linear em AMS-EAM e aponta alguns tópicos para estudos futuros sobre calibração multivariada não linear.

Um aspecto a ser ressaltado ao se discutir modelos de calibração é a sua robustez, isto é, a sua capacidade de não ser afetados por anomalias. Modelos de calibração construídos a partir de dados resultantes de medidas químicas quase sempre estão sujeitos à presença de anomalias, e por isso vem crescendo muito o interesse por métodos robustos de análise multivariada⁴⁷. Esses métodos são capazes de reduzir, automaticamente, a influência das anomalias sobre os dados²⁹.

Um procedimento robusto chamado *sine function M-estimator* é descrito por Wei et al.¹³ e aplicado a um sistema de dois componentes. O método considera a distribuição do ruído como sendo não normal e sua performance é muito melhor que a da regressão linear múltipla.

Liang e Fang⁴⁸ desenvolveram um algoritmo que permite reduzir tempo de cálculo para o processamento dos dados na técnica da mínima mediana dos quadrados. Essa técnica se baseia na minimização da mediana dos quadrados dos resíduos. O cálculo é facilitado devido a algumas restrições impostas às concentrações que devem ser estimadas por calibração multivariada direta e à aplicação da teoria de otimização por números sequenciais, usada para atingir a otimização global da região investigada. Comparado à regressão linear múltipla, o método da mínima mediana dos quadrados mostrou-se eficiente e robusto frente a um grande número de anomalias⁴⁸.

Liang e Kvalheim⁴⁹ publicaram uma revisão sobre métodos robustos de análise multivariada. Nela são abordados métodos de regressão (mínima mediana dos quadrados, PCR e PLS robustos e *least trimmed squares*), métodos diagnósticos para detecção de anomalias (diagnósticos clássicos e robustos) e métodos de análise exploratória para redução de dimensionalidade (decomposição em valores singulares, *projection pursuit* e análise de componentes principais robustas). Alguns dos métodos são descritos em detalhes e ilustrados com exemplos.

Diante da variedade de métodos multivariados disponíveis, não é fácil decidir, na prática, qual o mais adequado para uma aplicação particular. Entretanto, como em química analítica o objetivo principal da construção de um modelo de calibração é prever propriedades de amostras cujas concentrações dos componentes são desconhecidas, o método ótimo pode ser escolhido calculando-se a previsão estatística de cada um deles e optando-se por aquele com menor erro médio de previsão. Um método estatístico alternativo, largamente usado na determinação do número de componentes a incluir no modelo, é o *crossvalidation*^{5,50,51}.

Também para auxiliar na escolha do método, Seasholtz e Kowalski¹⁰ sugeriram o princípio da parcimônia, segundo o qual, entre dois modelos adequados, aquele que é descrito pelo menor número de parâmetros deverá ter maior capacidade preditiva de novos dados.

MÉTODOS DE OTIMIZAÇÃO EM AMS-EAM

A otimização de procedimentos analíticos é uma tarefa rotineiramente enfrentada pelos químicos e abrange desde o planejamento experimental até a seleção dos dados a serem incluídos nos cálculos a fim de se obter resultados com precisão e exatidão máximas.

O planejamento experimental permite estabelecer a série ótima de parâmetros operacionais que influenciam a análise química, como pH, temperatura, solvente, faixa espectral de trabalho, séries de calibração e de teste. Após a etapa de realização das medidas, a otimização do processo é completada na etapa de cálculo, por exemplo, através da seleção das variáveis espectrais mais informativas.

São conhecidas várias técnicas de otimização experimental^{5,51-54}. Entretanto, de acordo com Kalivas⁵⁵ os métodos simultâneos como planejamento aleatório e planejamento fatorial requerem um grande número de experimentos, enquanto a técnica de otimização sequencial de um único fator é inadequada quando os parâmetros são interdependentes. Um procedimento de operação evolucionária, por outro lado, usa planejamentos fatoriais e técnicas de regressão que também exigem um elevado número de experimentos. O simplex sequencial, descrito por Deming e Morgan⁵⁶, representa um método de otimização muito mais eficiente para uma superfície de resposta multifatorial, mas não funciona para AMS na presença de interferências espectrais e de efeitos de matriz. Uma alternativa sugerida por Kalivas⁵⁵ para determinar os parâmetros ótimos para uma análise, na presença dessas interferências, é o estudo da propagação do erro usando dados obtidos pelo método generalizado de adição padrão^{14,57,58}. Quando interferências espectrais e de matriz estão presentes numa análise multicomponente os erros podem ser amplificados, aumentando a incerteza das estimativas das concentrações de interesse. Essa amplificação do erro pode ser representada pelo número de condição da matriz de calibração ($\text{cond}(K)$), que é definido, para uma matriz quadrada, como o produto da norma dessa matriz pela norma da sua inversa. O $\text{cond}(K)$ fornece informações sobre os erros de previsão das concentrações e representa um critério de otimização da seletividade, da precisão e da exatidão de um dado procedimento. Esses resultados permitiram sugerir o $\text{cond}(K)$ como uma função objetiva a ser minimizada pelo simplex para se chegar à otimização da análise multicomponente. Otto e Wegscheider³⁷ usaram esse critério para escolher o melhor agente complexante para uma análise de traços por EAM.

Um outro método para resolver problemas de otimização é o *generalized simulated annealing*, cujo algoritmo tem a capacidade de partir de um valor ótimo local e convergir para o valor ótimo global, que é alcançado independentemente da posição inicial. Kalivas et al.⁵⁹ apresentam os fundamentos desse método e sugerem o seu uso no planejamento da série de calibração para análise quantitativa. O *generalized simulated annealing* também se aplica à otimização de funções discretas, como a seleção de misturas de calibração a partir de uma série já existente⁶⁰. Este aspecto da otimização tem sido objeto de estudos mais recentes como o de Ferré e Rius⁶¹, segundo o qual uma série de calibração definida por um planejamento fatorial pode ainda ser reduzida usando-se o planejamento D-otimizado, de modo que a sub-série escolhida é aquela que resulta na menor variância dos coeficientes de regressão. O número de misturas de calibração pode cair a 50%, o que representa uma considerável redução no custo das análises.

Outro aspecto da otimização de procedimentos de AMS que merece destaque especial no presente trabalho é a seleção das variáveis espectrais. Na verdade, a escolha dos comprimentos de onda analíticos que resultem na máxima exatidão é ainda um ponto crítico da AMS-EAM, principalmente quando ocorre alta sobreposição espectral. Devido a essa dificuldade, com os avanços da instrumentação analítica e com a redução do tempo de processamento dos modernos computadores, têm sido relatados alguns algoritmos que processem a região espectral inteira, tornando desnecessária a escolha de comprimentos de onda específicos. Um algoritmo desse tipo é o *full spectrum quantitation*, desenvolvido pela Beckman Instruments para uso com espectrofotômetros com PDA⁶². Esses instrumentos são capazes

de registrar um espectro de toda a região UV-VIS num intervalo de tempo de aproximadamente 0,1 s. Sabe-se que a precisão normalmente aumenta com o número de comprimentos de onda selecionados, mas isso também provoca uma diminuição da exatidão, em virtude da possível introdução de ruído, o que faz com que a *full spectrum quantitation* não seja bem aceita como uma estratégia adequada para se obter as melhores estimativas de concentração. Assim sendo, a maioria dos trabalhos sobre AMS-EAM enfatiza a necessidade da seleção dos comprimentos de onda analíticos.

Vários critérios têm sido empregados para seleção dos comprimentos de onda ótimos. Sustek⁶³ sugeriu os desvios padrão relativos das absorvidades e testou esse método com uma mistura de cinco componentes simulada no computador, resolvendo o sistema de equações lineares resultante por mínimos quadrados. Para cada componente os desvios padrão relativos das absorvidades foram calculados sucessivamente com 5, 10, 15, 20, 25 e 32 posições analíticas. Resultados satisfatórios foram obtidos com o número de comprimentos de onda igual a 3 ou 4 vezes o número de componentes.

Ditusa e Shilt⁹ propuseram um método de seleção de variáveis baseado no gráfico da razão das absorvidades dos componentes contra os comprimentos de onda. Para um sistema de dois componentes, os comprimentos de onda procurados correspondem a um máximo e a um mínimo na referida curva. Com a mesma finalidade, um outro método foi proposto por Sasaki et al.⁶⁴, fundamentado no cálculo do erro quadrático mínimo das concentrações dos componentes da mistura, em relação às suas estimativas. Conforme os autores, esse é um método prático e generalizado que utiliza o algoritmo *branch and bound*, cuja aplicação é conhecida em problemas de otimização combinatória. O algoritmo seleciona a série ótima entre todas as combinações possíveis, com tempo de cálculo reduzido e sem aproximações. Kalivas et al.⁵⁹ demonstram o uso potencial do *generalized simulated annealing* para seleção de comprimentos de onda, oferecendo um caminho viável para uma escolha adequada.

As limitações da escolha da faixa espectral de trabalho foram estudadas por Brown et al.⁶⁵, que usando dados experimentais e simulados de um sistema de dois componentes determinaram o grau de sobreposição permitido e os efeitos das condições espectrais e instrumentais sobre o erro de calibração. A conclusão é que o nível de sobreposição permitido depende da razão sinal/ruído. Se essa razão é alta, qualquer nível de sobreposição é tolerado. A valores mais baixos, a sobreposição é permitida até onde o centro da banda de interesse não seja envolvido pela banda interferente.

Outro trabalho que trata da influência da faixa espectral sobre os resultados da análise quantitativa simultânea deve-se a Rossi e Pardue⁶⁶. Foram utilizados os espectros de ordem zero e os espectros derivativos de misturas de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares. Verificou-se que, na maioria dos casos, uma faixa espectral estreita selecionada para cada componente produz resultados tão ou até mais exatos que os obtidos com as largas faixas mais comumente usadas, devido à redução de colinearidade e de sobreposição espectral.

Xu e Schechter⁶⁷ também afirmam que melhores resultados são obtidos quando uma faixa espectral adequadamente escolhida é incluída nos cálculos, e propõem uma teoria que modela a incerteza em análise multicomponente, mostrando situações em que a seleção de comprimentos de onda é essencial. Desenvolvem ainda uma função indicadora do erro, para prever a performance analítica sob dadas condições experimentais, e aplicam-na à localização das faixas espectrais mais informativas a serem utilizadas em análises multicomponentes.

Mais recentemente, Pimentel et al.⁶⁸ propuseram um critério de seleção da janela espectral mais informativa para uma determinação multicomponente simultânea, baseado na suposição de que um comprimento de onda é considerado informativo para

um dado elemento se o seu sinal no espectro do elemento puro for maior que o limite de detecção, se não for saturado e se sua intensidade for 20% maior que a correspondente no espectro interferente, que consiste na sobreposição dos espectros puros dos demais elementos que se quer analisar. Este critério foi aplicado à AMS de cinco elementos por espectrometria de emissão em plasma mas pode ser estendido à AMS-EAM.

Segundo Lucasius et al.⁶⁹, para alcançar ao mesmo tempo, maior precisão e máxima exatidão, um número ótimo de canais analíticos deve ser escolhido. Fazendo um estudo comparativo do algoritmo genético, do *simulated annealing* e da *stepwise elimination* com base em três critérios de avaliação (seletividade, exatidão e erro médio quadrático mínimo), esses autores concluem que a melhor solução é obtida com o algoritmo genético⁷⁰⁻⁷². Apesar disso, nenhuma conclusão definitiva pôde ser apontada, uma vez que configurações ótimas para algoritmos genéticos e *simulated annealing* ainda são desconhecidas. Entre os métodos comparados por Lucasius e colaboradores, o algoritmo genético tem se destacado, nos últimos cinco anos, como técnica de otimização e tem sido aplicado à seleção de variáveis⁷³⁻⁷⁵. Trata-se de um modelo matemático inspirado na teoria da seleção natural de Darwin como aliás também era a operação evolucionária, proposta por Box⁷⁶ nos anos 50.

Para fins de otimização, o algoritmo genético⁷⁴ é aplicado por analogia ao que ocorre no mundo biológico: as condições experimentais (cromossomos), que levam às melhores respostas (indivíduos mais adaptados ao ambiente) têm maior chance de serem selecionadas (sobreviver), sendo transmitidas às novas gerações através da reprodução. Assim, a otimização das respostas (evolução da espécie) é alcançada por meio de recombinação das variáveis (cruzamento de cromossomos) e de algumas modificações aleatórias (mutações de genes). O algoritmo garante que o ótimo global sempre é atingido. Esse algoritmo foi idealizado como alternativa para os casos onde os métodos tradicionais de otimização (simplex, planejamento experimental e operação evolucionária) não podem ser empregados. Isso ocorre quando as superfícies de resposta que descrevem sistemas reais, por serem complexas, apresentam vários máximos e mínimos locais e descontinuidades. O algoritmo genético tem sido modificado e aplicado com sucesso, à seleção dos comprimentos de onda analíticos^{74,75}. A grande vantagem da sua aplicação à seleção de variáveis é permitir a calibração multivariada de sistemas redundantes por regressão linear múltipla, cujos resultados são bem mais simples de interpretar que os baseados em variáveis latentes (PCR ou PLS)⁷⁸.

Outro método recentemente proposto para eliminação de variáveis não informativas em um conjunto de dados multivariados deve-se a Centner et al.⁷⁹. Nesse método, variáveis artificiais (ruído) são incluídas na matriz original de variáveis experimentais e um modelo PLS aproximado é construído com todo o conjunto. O critério de eliminação de variáveis baseia-se numa análise dos coeficientes de regressão do modelo PLS, na qual são eliminadas as variáveis experimentais que não são mais importantes que as artificiais. O método foi aplicado a PLS, mas pode ser considerado como um procedimento geral de pré-seleção para aplicação subsequente de regressão linear múltipla, com ou sem algoritmo genético.

Outros trabalhos recentes apresentam métodos para seleção de variáveis. Ferré e Rius⁸⁰ sugerem um critério gráfico para examinar a qualidade de uma série de comprimentos de onda na análise multicomponente. Intervalos de confiança são usados para descrever critérios tais como sensibilidade e seletividade para resolver problemas de seleção de variáveis.

Costadinova e Nedeltcheva⁸¹ propuseram um algoritmo que permite escolher a série ótima de comprimentos de onda a partir do espectro de absorção completo. O número de comprimentos de onda selecionados é igual ao número de componentes que devem ser determinados.

AMS-EAM E MÉTODOS AUTOMATIZADOS

A viabilidade de aplicação da análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, *Flow Injection Analysis*)⁸²⁻⁸⁵ a determinações simultâneas usando diversas metodologias analíticas foi reconhecida há mais de uma década⁸⁶. A combinação de um instrumento com arranjo de fotodiodos com a técnica FIA se constitui num caminho promissor para a automação da AMS-EAM^{87,88}. Como essas análises exigem a aquisição, o controle e o tratamento de um volume muito grande de dados, o tempo consumido nessas etapas é uma das limitações da aplicação da AMS-EAM a análises de rotina. A técnica FIA permite aumentar a velocidade analítica, contornando essas dificuldades e ainda reduzindo o custo das análises. Alguns trabalhos têm empregado a combinação de regressão linear múltipla com FIA-PDA^{89,90} para AMS-EAM. A extensão a outros métodos multivariados, embora tenha avançado consideravelmente nos últimos anos^{31,90-94}, ainda pode ser bastante explorada.

Nesse sentido, Blanco et al.⁹⁵ desenvolveram estudos sobre o potencial de um sistema de diluição automático por injeção em fluxo baseado na técnica de amostragem por zona para análise de rotina de soluções concentradas, via PLS. O desempenho do método proposto foi testado aplicando-o à resolução de misturas de complexos de Cu(II) e Zn(II) com 4-(2-piridil-azo)resorcinol (PAR). Este mesmo reagente cromogênico foi usado para deslocamento dos metais dos complexos de Cu(II), Co(II) e Zn(II) com EGTA, empregando-se a técnica de fluxo interrompido e posterior quantificação das misturas por redes neurais⁹⁶.

Outro trabalho que associa FIA e métodos quimiométricos para determinação simultânea de metais deve-se a Hernández et al.⁹⁷, que utilizaram o zincon como reagente cromogênico para a resolução de misturas binárias e ternárias de Co(II), Zn(II) e Cu(II) em soro sanguíneo e em formulações veterinárias. O mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu um outro método para determinação simultânea de cobre e zinco, com 4-(4'-metil-2'-tiazolilazo)-2-metil-resorcinol usando FIA-PDA-PLS⁹⁸. Segundo os autores, o método proposto prova que a combinação de um sistema FIA com um modelo de calibração multivariada pode ser aplicada a determinações simultâneas usando uma quantidade mínima de amostra e alcançando resultados comparáveis aos obtidos em determinações monocomponentes em amostras similares.

Um sistema de dupla injeção em fluxo para análise multicomponente, em que o reagente e a amostra são injetados simultaneamente, foi apresentado por Whitman et al.⁹⁹. Técnicas de calibração como PCR e PLS foram empregadas para analisar os complicados perfis de tempo que resultam das medidas.

OUTRAS TENDÊNCIAS DA AMS-EAM

Uma tendência da AMS-EAM que visa a facilitar a aplicação das técnicas quimiométricas em análises de rotina consiste na integração de sistemas especialistas com *software* para análise de dados¹⁰⁰. Esses sistemas especialistas deverão conter o conhecimento quimiométrico necessário para decidir, em determinada situação, que técnica quimiométrica usar, como otimizá-la e como os resultados deverão ser interpretados. Vários artigos que tratam de sistemas especialistas são incluídos nas revisões de Brown et al.^{101,102}. Espera-se que essas tendências se confirmem, pois elas deverão facilitar a realização das AMS-EAM.

Por outro lado, o âmbito de aplicação da AMS-EAM usando métodos multivariados vem se ampliando a cada dia, o que pode ser constatado pela publicação de trabalhos nas áreas clínica^{41,103}, farmacêutica^{78,104-106}, industrial^{21,107} e ambiental^{108,109}. A combinação de procedimentos cinéticos com vários métodos de análise multivariada também tem sido relatada^{95,110-115}. O

monitoramento de reações espectrofotométricas ao longo do tempo permite obter dados de segunda ordem, que proporcionam ganho em termos de seletividade espectral¹⁰⁵.

Os trabalhos citados até aqui, bem como outros registrados na literatura¹¹⁶⁻¹¹⁷, demonstram o grande interesse suscitado pela AMS-EAM. Assim sendo, pode-se concluir que este tipo de análise constitui ainda um vasto campo para pesquisa na área de química analítica, seja no que se refere ao emprego de novos algoritmos¹¹⁸⁻¹²⁰, à busca de novos reagentes¹²¹ e de novas metodologias^{122,123} e à aplicação à análise dos mais diversos tipos de amostras¹²⁴⁻¹²⁶, tais como de pesticidas¹²⁷ e mais recentemente, de misturas de aminoácidos¹²⁸.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de doutorado (T.C.B. Saldanha) e ao PADCT(Proc. N°: 62.0677/94.5) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Stearns, E. I.; *Anal. Chem.* **1953**, 25, 1004.
- Sternberg, C. J.; Stillo, H. S.; Schwendeman, R. H.; *Anal. Chem.* **1960**, 32, 84.
- Zscheile Jr., F. P.; Murray, H. C.; Baker, G. A.; Peddicord, R. G.; *Anal. Chem.* **1962**, 34, 1776.
- Otto, M.; *Jena Review* **1990**, 1, 25.
- Sharaf, M. A.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R.; *Chemometrics*; Wiley, New York, 1986.
- Shibata, S.; Furukawa, M.; Kamata, E.; Goto, K.; *Anal. Chim. Acta* **1970**, 50, 439.
- Yotsuyanagi, T.; Takeda, Y.; Yamashita, R.; Aomura, K.; *Anal. Chim. Acta* **1973**, 67, 297.
- Betteridge, D.; John, D.; *Analyst*, **1973**, 98, 390.
- Ditusa, M. R.; Schilt, A. A.; *J. Chem. Educ.* **1985**, 62, 541.
- Seasholtz, M. B.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 277, 165.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, 185, 1.
- Glen, W. G.; Dunn III, W. J.; Scott, D. R.; *Tetrahedron Computer Methodology* **1989**, 2, 349.
- Wei, W. Z.; Zhu, W. H.; Yao, S. Z.; *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **1993**, 18, 17.
- Jochum, C.; Jochum, P.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1981**, 53, 85.
- Malinowski, E. R.; *Factor analysis in chemistry*, 2 ed., Wiley-Interscience, New York 1991.
- Hopke, P. K.; *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **1989**, 6, 7.
- Hamilton, J. C.; Gemperline, P. J.; *J. Chemom.* **1990**, 4, 1.
- Liang, Y. Z.; Kvalheim, O. M.; Manne, R.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1993**, 18, 235.
- Tauler, R.; Smilde, A.; Kowalski, B.; *J. Chemom.* **1995**, 9, 31.
- Gemperline, P. J.; Hamilton, J. C.; *J. Chemom.* **1989**, 3, 455.
- Tauler, R.; Kowalski, B.; Fleming, S.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2040.
- Gargallo, R.; Tauler, R.; Izquierdo-Ridorsa, A.; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1785.
- Scarmínio, I.; Kubista, M.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 409.
- Levillan, P.; Pompeydie, D.; *Analisis*, **1986**, 14, 1.
- Hewlett Packard. HP 8453 *Manual: Understanding your general purpose chemstation software*, Chap. 4, p.68, 1995.
- Brown, C. W.; Okafor, A. E.; Donahue, S. M.; Lo, S. C.; *Appl. Spectrosc.* **1995**, 49, 1022.
- Thomas, E. V.; Haaland, D. M.; *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1091.
- Thomas, E. V.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 795A.
- Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, John Wiley, London, 1993.
- Beebe, K. B.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1007A.
- MacLaurin, P.; Worsfold, P. J.; Crane, M.; Norman, P.; *Anal. Proc.* **1992**, 29, 65.
- Gemperline, P. J.; *J. Chemom.* **1989**, 3, 549.
- Kowalski, B. R.; Seasholtz, M. B.; *J. Chemom.* **1991**, 5, 129.
- Pérez-Arriba, L. V.; Navarro-Villoslada, F.; León-Gonzalez, M. E.; Polo-Díez, L. M.; *J. Chemom.* **1993**, 7, 267.
- Thomas, E. V.; *J. Chemom.* **1995**, 9, 471.
- Bro, R.; *J. Chemom.* **1996**, 10, 47.
- Otto, M.; Wegscheider, W.; *Anal. Chem.* **1985**, 57, 63.
- O'Haver, T. C.; *Anal. Chem.* **1979**, 51, 91A.
- Tahboud, Y. R.; Pardue, H. L.; *Anal. Chem.* **1985**, 57, 38.
- Antonov, L.; Stoyanov, S.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 324, 77.
- Berzas, J. J.; Rodriguez, J.; Castaneda, G.; *Analyst* **1997**, 112, 41.
- Andrew, K. N.; Worsfold, P. J.; *Analyst* **1994**, 119, 1541.
- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Redon, M.; *Appl. Spectroscopy* **1994**, 48, 37.
- Rius, A.; Callao, M. P.; Ferré, J.; Rius, F. X.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 337, 287.
- Sekulic, S.; Seasholtz, M. B.; Wang, Z.; Kowalski, B. R.; Lee, S. E.; Holt, B. R.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 835A.
- Gemperline, P.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1992**, 15, 115.
- Wakeling, I. N.; Macfie, H. J. H.; *J. Chemom.* **1992**, 6, 189.
- Liang, Y. Z.; Fang, K. T.; *Analyst* **1996**, 121, 1025.
- Liang, Y. Z.; Kvalheim, O. M.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1996**, 32, 1.
- Golub, G.; Van Loan, C.; *Matrix Computations*, John Hopkins, Baltimore, 1989.
- Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N. et al.; *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- Kateman, G.; Pijpers, F. U.; *Quality Control in Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 1981.
- Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; *Statistics for Experimenters*, Wiley, New York, 1978.
- Neto, B. B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Editora da UNICAMP, Campinas, 1995.
- Kalivas, J. H.; *Anal. Chem.* **1986**, 58, 989.
- Deming, S. N.; Morgan, S. L.; *Anal. Chem.* **1973**, 45, 278A.
- Saxberg, B. E. H.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1979**, 51, 1031.
- Kalivas, J. H.; *Anal. Chem.* **1983**, 55, 565.
- Kalivas, J. H.; Roberts, N.; Sutter, J. M.; *Anal. Chem.* **1989**, 61, 2024.
- Kalivas, J. H.; *J. Chemom.* **1991**, 5, 37.
- Ferré, J.; Rius, F. X.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1565.
- Weismüller, J. A.; Chanady, A.; *Trends. Anal. Chem.* **1992**, 11, 86.
- Sustek, J.; *Anal. Chem.* **1974**, 46, 1676.
- Sasaki, K.; Kawata, S.; Minami, S.; *Appl. Spectrosc.* **1986**, 40, 185.
- Brown, C. W.; Lynch, P. F.; Obremsky, R. J.; Lavery, D. S.; *Anal. Chem.* **1982**, 54, 1479.
- Rossi, D. T.; Pardue, H. L.; *Anal. Chim. Acta* **1985**, 175, 153.
- Xu, L.; Schechter, I.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2392.
- Pimentel, M. F.; Neto, B. B.; Araújo, M. C. U.; Pasquini, C.; *Spectrochim. Acta Part B* **1997**, 52, 2151.
- Lucasius, C. B.; Beckers, M. L. M.; Kateman, G.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, 286, 135.
- Lucasius, C. B.; Kateman, G.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1993**, 19, 1.
- Hibbert, D. B.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1993**, 19, 277.
- Lucasius, C. B.; Kateman, G.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1994**, 25, 99.
- Leardi, R.; Boggia, R.; Terrile, M.; *J. Chemom.* **1992**, 6, 267.
- Leardi, R.; *J. Chemom.* **1994**, 8, 65.
- Jouan-Rimbaud, D.; Massart, D. L.; Leardi, R.; Noord, O. E.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4295.

76. Box, G. E. P.; Draper, N. R.; *Appl. Statist.* **1957**, 6, 3.
77. Coello Coello; C. A.; *Tecnología, Soluciones avanzadas* **1995**, 5.
78. Arcos, M. J.; Ortiz, M. C.; Villahoz, B.; Sarabia, L. A.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 339, 63.
79. Centner, V.; Massart, D. L.; Noord, O. E.; Jong, S.; Vandeginst, B. M.; Sterna, C.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3851.
80. Ferré, J.; Rius, F. X.; *Trends Anal. Chem.* **1997**, 16, 155.
81. Costadinova, L.; Nedeltcheva, T.; *Analyst* **1995**, 120, 2217.
82. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Flow Injection Analysis*, Jonh Wiley; New York 1987.
83. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D.; *Análisis por inyección en flujo*, Departamento de Química Analítica, Universidade de Cordoba, Cordoba 1984.
84. Burguera, J. L.; *Flow injection atomic spectroscopy*, Marcel Dekker, New York 1989.
85. Kalberg, B.; Pacey, G. E.; *Flow injection analysis-a practical guide*, Elsevier, New York, 1989.
86. Luque de Castro, M. D.; Cases, M. V.; *Analyst* **1984**, 109, 413.
87. Blanco, M.; Coello, J.; Gene, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; *Analyst* **1987**, 112, 619.
88. Wada, H.; Murakawa, T.; Nakagawa, G.; *Anal. Chim. Acta* **1987**, 200, 515.
89. Blanco, M.; Gene, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Riba, J.; *Talanta* **1987**, 34, 993.
90. Blanco, M.; Coello, J.; Gene, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1990**, 338, 831.
91. Lazaro, F.; Rios, A.; Luque de Castro, M. D.; Valcarcel, M.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, 179, 279.
92. Hernández, O.; Jimenez, A. I.; Arias, J. J.; Havel, J.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 320, 177.
93. Lukkari, I.; Lindberg, W.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, 211, 1.
94. Erickson, B.; Ruzicka, J.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, 218, 303.
95. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Redón, M.; Riba, J.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 259, 219.
96. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Redón, M.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4477.
97. Hernández, O.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Arias, J. J.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, 310, 53.
98. Hernández, O.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Arias, J. J.; *Analyst* **1996**, 121, 169.
99. Whitman, D. A.; Seasholtz, M. B.; Christian, G. D.; Ruzicka, J.; Kowalski, B.; *Anal. Chem.* **1991**, 63, 775.
100. Gerritsen, M.; Van Leeuwen, J. A.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L.; Kateman, G.; *Chemom. Int. Lab. Sys.* **1992**, 15, 171.
101. Brown, S. D.; Bear Jr., R. S.; Blanck, T. B.; *Anal. Chem.* **1992**, 64, 22R.
102. Brown, S. D.; Blank, T. B.; Sum, S. T.; Weyer, L. G.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 315R.
103. Remsen, E. E.; Freeman, J. J.; Schuh, J. R.; Monahan, J. B.; *Spectroscopy* **1996**, 11, 39.
104. Blasco, M.; Coello, J.; Gené, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Puigdomènech, A. R.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 327, 145.
105. Berzas, J. J.; Rodriguez, J.; Castaneda, G.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 340, 257.
106. Yong, P.; Eccles, H.; Macaskie, L. E.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 329, 173.
107. Schmidt, P. C.; Glombitza, B. W.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, 14, 45.
108. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Redón, M.; Villegas, N.; *Analyst* **1996**, 121, 395.
109. Henshaw, J. M.; Burgess, L. W.; Booksh, K. S.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3328.
110. Moreno, C.; Manuel-Vez, M. P.; Gomez, I.; Garcia-Vargas, M.; *Analyst* **1996**, 121, 1609.
111. Martin, F.; Otto, M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 352, 451.
112. Tauler, R.; Smilde, A. K.; Henshaw, J. M.; Burgess, L. W.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3337.
113. Tauler, R.; Smilde, A. K.; Henshaw, J. M.; Burgess, L. W.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3345.
114. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Riba, J.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2905.
115. Cullen, T. F.; Crouch, S. R.; *Mikrochim. Acta* **1997**, 126, 1.
116. Howell, J. A.; Hargis, L. G.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 445R.
117. Hargis, L. G.; Howell, J. A.; Sutton, R. E.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 169R.
118. Yu, B.; Li, M.; Liu, A.; Li, Z.; Shi, L.; Pan, Z.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, 277, 199.
119. Xie, Y. L.; Liang, Y. Z.; Yi, R. Q.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, 272, 61.
120. Marbach, R.; Heise, H. M.; *Trends Anal. Chem.* **1992**, 11, 270.
121. Ni, Y.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, 120, 284, 199.
122. Gomez, E.; Estela, J. M.; Cerdá, V.; Blanco, M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 342, 318.
123. Brereton, R. G.; *Analyst* **1995**, 20, 2313.
124. Cladera, A.; Gomez, E.; Estela, J. M.; Cerdá, V.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 267, 95.
125. Cerdá, V.; Estela, J. M.; Forteza, R.; Cladera, A.; Gomez, E.; Oms, M. T.; *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1993**, 52, 159.
126. Galera, M. M.; Vidal, J. L. M.; Frenich, A. G.; Parrilla, P.; *Analyst* **1994**, 119, 1189.
127. Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Pena, A.; Salinas, F.; Zamoro, A.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 258, 47.
128. Scarminio, I. S.; Ishikawa, D. N.; Barreto, W. J.; Pacczkowski, E. D.; Arruda, I. C.; *Quím. Nova* **1998**, 21, 590.