

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

Este exemplar corresponde a redação final
da tese, defendida por Ronei Jesus Poppi,
e aprovada pela comissão julgadora.

Campinas, 14 de Julho de 1993.


Prof. Dr. Célio Pasquini

Construção de um Espectrofotômetro
com transformada de Hadamard e sua
aplicação na Análise por Injeção em Fluxo

TESE DE DOUTORADO

Ronei Jesus Poppi 218

Orientador : Prof. Dr. Celio Pasquini

CAMPINAS - 1993

Aqui será fornecido um breve currículo do autor, especificando suas principais atividades de pesquisa.

Graduação em Química na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com término em julho de 1986. Neste mesmo ano, início do Mestrado na própria UNICAMP, sob orientação do Prof. Dr. José Fernando G. Faigle na área de Quimiometria com a tese : "Quantificação de picos cromatográficos superpostos por métodos de calibração multivariada". A tese de mestrado foi defendida e aprovada em 1989. Também na UNICAMP é realizado o Doutorado, agora sob orientação do Prof. Dr. Célio Pasquini. As áreas de atuação estendem-se para a Instrumentação e Automação em Química Analítica, além de Quimiometria, obtendo o título de Doutor em Ciências em 1993.

São 9 trabalhos apresentados em congressos científicos, e 5 trabalhos publicados em periódicos internacionais. Dentre os trabalhos publicados pode-se destacar os seguintes como mais representantes da linha de atuação :

- J. F. G. Faigle, R. J. Poppi, I. S. Scarminio e R. E. Bruns - "Multicomponent Principal Component Regression and Partial Least Squares analysis of overlapped chromatographic peaks" - JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY 539(1991)123.
- R. J. Poppi, P. A. M. Vazquez, C. Pasquini - "Fast scanning Hadamard spectrophotometer" - APPLIED SPECTROSCOPY 46(1992)1822.
- R. J. Poppi e C. Pasquini - "Spectrophotometric determination of a mixture of weak acids using multivariate calibration and flow injection analysis titration" - CHEMOMETRICS AND INTELLIGENT LABORATORY SYSTEMS (1993).

1

"A thousand points of light..."

/

*Dedico aos meus pais que sempre me apoiaram
em todos os momentos, mesmo sem entenderem
o significado deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer,

ao Célio, pela amizade e dedicação ao trabalho durante todo o tempo que fiquei sob sua orientação, sem seu apoio e incentivo certamente não teria chegado até o final;

ao Pedro Vazquez, que teve a idéia inicial da construção do espectrofotômetro, por toda sua ajuda no entendimento da transformada de Hadamard e nas montagens ópticas realizadas;

à Ieda, onde a partir de discussões sobre quimiometria foi possível desenvolver os programas utilizados;

ao pessoal do grupo : Jarbas, Ivo, Bellato, Paulo, Dena e Ileana, pela amizade e interesse em sempre ajudar nas dificuldades;

à todos do laboratório : professores, pós-graduandos, alunos de iniciação científica e funcionários, pelo amigável convívio durante esses anos, e toda ajuda no desenvolvimento do trabalho;

e aos órgãos de financiamento : FAPESP pelo apoio ao projeto de construção do espectrofotômetro, UNICAMP pelas bolsas de monitoria e incentivo acadêmico com que fui contemplado, e CNPq (apesar dos atrasos) pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
INTRODUÇÃO	05
CAPÍTULO 1 - ESPECTROSCOPIA COM USO DA TRANSFORMADA DE HADAMARD	13
1.1 - Tipos de instrumentos para espectroscopia óptica . . .	13
1.2 - Multiplexação com um espectrofotômetro dispersivo . . .	19
1.3 - Espectrofotômetros com transformada de Hadamard	26
1.4 - Vantagens da espectrofotometria com transformada de Hadamard	33
1.5 - Outras montagens de espectrofotômetros com transformada de Hadamard	34
CAPÍTULO 2 - CONSTRUÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO COM TRANSFORMADA DE HADAMARD	41
2.1 - O espectrofotômetro com transformada de Hadamard desenvolvido	41

2.2 - Parte óptica	42
2.3 - Máscaras Hadamard	44
2.4 - Parte eletrônica e interfaceamento	47
2.5 - Programas para controle, aquisição e tratamento dos dados	55
2.6 - Espectros obtidos com o espectrofotômetro Hadamard . . .	61
2.7 - Avaliação do espectrofotômetro Hadamard desenvolvido . .	68
CAPÍTULO 3 - O ESPECTROFOTÔMETRO HADAMARD NA ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COMBINADA COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	
3.1 - Análise por Injeção em Fluxo	77
3.2 - Calibração Multivariada	83
3.3 - Titulações de misturas de ácidos	96
3.4 - Sistema FIA utilizado nas titulações	99
3.5 - Titulação de misturas dos Ácidos Clorídrico e Acético utilizando métodos de Calibração Multivariada	102
3.6 - Determinação espectrofotométrica de pH em sistemas de fluxo utilizando métodos de Calibração Multivariada . . .	110
3.7 - Titulação de misturas de ácidos fracos utilizando métodos de Calibração Multivariada	120
CONCLUSÕES	136
PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

APÊNDICE 1 - PROGRAMA EM FORTRAN PARA ELABORAÇÃO DO DESENHO DO DISCO DAS MÁSCARAS	157
APÊNDICE 2 - MATRIZ-S UTILIZADA NA TRANSFORMADA DE HADAMARD .	161
APÊNDICE 3 - PROGRAMA EM ASSEMBLER PARA COMUNICAÇÃO ESPECTRO- FOTÔMETRO/MICROCOMPUTADOR	163
APÊNDICE 4 - PROGRAMA EM ASSEMBLER PARA CONTROLE DO ESPECTRO- FOTÔMETRO HADAMARD	166
APÊNDICE 5 - PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA A OBTENÇÃO DOS ESPECTROS	173
APÊNDICE 6 - PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA CÓPIA DA TELA GRÁFICA	176
APÊNDICE 7 - PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA OS CÁLCULOS COM O PLS	179
APÊNDICE 8 - PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA O DESENHO DAS SUPERFÍCIES	183

RESUMO

Foi construído um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard*, capaz de obter um espectro completo na região do visível, de 440 nm a 670 nm, em intervalos de tempo maiores ou iguais a 50 ms. O controle do espectrofotômetro e a aquisição dos dados foi realizada por um sistema mínimo de microcomputador baseado na CPU 8085. Esse sistema mínimo envia os dados, através de uma interface padrão tipo RS 232-C, para um microcomputador tipo IBM PC-AT onde são realizados os cálculos da transformada de *Hadamard* obtendo-se espectros de emissão, transmissão ou absorção. Foram desenvolvidos todos os programas para o controle do instrumento (em ASSEMBLER-8085) e para o tratamento dos dados no microcomputador IBM PC-AT (em QuickBasic 4.5). Medidas de absorvância, para soluções de KMnO_4 tomadas a 525 nm, mostraram linearidade na faixa de 0,0 a 0,8 unidades. Dez medidas de uma solução de KMnO_4 cuja absorvância média foi 0,250 apresentaram um desvio padrão igual a 1,2%.

Esse instrumento foi utilizado como unidade de detecção num sistema de Análise por Injeção em Fluxo, no qual foram realizadas titulações de misturas de ácidos. As titulações, executadas em intervalos de tempos inferiores a 5 minutos, foram monitoradas com a utilização dos espectros de absorvância de misturas de indicadores ácido-base. São obtidas superfícies absorvância x

tempo x comprimento de onda que refletem a composição da mistura dos ácidos. Técnicas quimiométricas de calibração multivariada baseadas no *Método dos Mínimos Quadrados Parciais* (PLS) foram empregadas para a redução de dados e para a determinação das concentrações individuais dos ácidos presentes. Os programas para a realização desses cálculos multivariados também foram desenvolvidos em linguagem QuickBasic 4.5. Foram realizadas titulações de misturas dos ácidos acético/clorídrico, cítrico/tartárico e acético/benzóico com erros relativos médios na faixa de 2,4% a 7,1%.

ABSTRACT

A fast scanning *Hadamard* spectrophotometer which is capable to obtain a complete spectra in the visible region in time intervals down to 50 ms has been developed. The spectrophotometer control and data acquisition were performed by a single board microcomputer based on a CPU 8085. This single board sends data, in serial mode, to an IBM PC compatible microcomputer where the *Hadamard* transform is performed and where emission, transmission or absorption spectra are displayed. All computer programs required for instrument control (in ASSEMBLER-8085) and data treatment (in QuickBasic 4.5) were developed. Absorbance measurements of KMnO_4 solutions taken in 525 nm showed linearity in the range of 0.0 to 0.8 units. Ten measurements of a KMnO_4 solutions whose mean absorbance was 0.250 showed a standard deviation equal to 1.2%.

This instrument was employed as detection unit in a Flow Injection Analysis manifold, where acid mixture titrations were performed. The titrations, realized in time intervals up to 5 minutes, were monitored by following the changes in the absorbance spectra of acid-base indicator mixtures. Surfaces, absorbance x time x wavelength, were obtained reflecting the acid mixture composition. Chemometric methods, based on a Partial Least Squares (PLS) multivariate calibration were employed to

data reduction and to obtain predictions about acids concentration. Also, the computer programs to multivariate calibration were developed in QuickBasic 4.5.

The following acids mixtures were titrated employing the proposed methodology : acetic/hydrochloric, citric/tartaric and acetic/benzoic, with mean relative errors in the range of 2.4% to 7.1%.

INTRODUÇÃO

Este trabalho pode ser dividido em duas partes fundamentais. A primeira parte relaciona-se à construção de um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard*¹ controlado por um microcomputador. A segunda, refere-se à aplicação analítica do instrumento desenvolvido, utilizado como unidade de detecção num sistema de Análise por Injeção em Fluxo². Métodos quimiométricos³ foram empregados no tratamento dos dados, para redução de variáveis e quantificação de espécies individuais presentes em misturas.

No que se refere à primeira etapa do trabalho desenvolvido, inicialmente surge uma questão que tem gerado certa controvérsia: deve o químico analítico desenvolver seus próprios equipamentos ou utilizar aqueles já disponíveis ?

Os que são favoráveis a esta idéia, argumentam que existem vantagens adicionais na construção do próprio instrumento, como basear seu desenvolvimento para uma aplicação pré-estabelecida, muitas vezes não possível de ser realizada com os equipamentos disponíveis. Também por conhecê-lo mais profundamente, pode explorá-lo na sua totalidade. Em países do 3º mundo, como o Brasil, existe também o aspecto econômico a ser analisado. Mesmo sem a sofisticação dos instrumentos comerciais, podem ser produzidos resultados idênticos a um custo muito inferior.

Para um químico analítico dedicar-se a este campo é necessário que domine, além dos conhecimentos inerentes da formação química, fundamentos de eletrônica analógica/digital e computação, muitas vezes de difícil assimilação. Trata-se obviamente de uma área multidisciplinar, onde o termo *Ciência Analítica* tem sido muitas vezes utilizado no lugar do mais tradicional *Química Analítica*⁴.

Por outro lado, alguns críticos argumentam que esta é uma área fora da química, que deve ser conduzida por aqueles que tiveram uma formação mais específica. Entendem a Química Analítica como o desenvolvimento de metodologias para a análise das matrizes de interesse a partir dos equipamentos comerciais.

No presente caso optou-se pela construção de um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard*, tendo em vista a aplicação a ser realizada. Algumas características fundamentais eram necessárias estar presentes no instrumento : como a necessidade de ser multicanal, de adquirir um espectro rapidamente e operar na região do visível.

As alternativas mais convencionais existentes recaiam sobre os espectrofotômetros com *Arranjos Lineares de Diodos**, ou aqueles que podem mover o elemento de dispersão muito rapidamente. Um espectrofotômetro de *Arranjo Linear de Diodos* já estava com seu desenvolvimento em curso, além de não haver nenhum outro que pudesse ser utilizado. Quanto a outra alternativa, também não se dispunha de um espectrofotômetro que pudesse mover o elemento de dispersão muito rapidamente, e a possibilidade do seu desenvolvi-

*do inglês *Diode Array*

mento fica muito prejudicada, uma vez que a velocidade requerida seria muito alta, e a mecânica necessária tornava impraticável esta idéia.

Os instrumentos multiplexados, como os com transformada de *Fourier*⁶, também possuem as características desejadas. Entretanto, a utilização desse equipamento é difícil de ser realizada na região visível do espectro.

Existem outras maneiras para a implementação de instrumentos multiplexados, com outros tipos de transformações lineares que podem ser utilizadas em espectroscopia óptica. Destas, a transformada de *Hadamard* é uma das mais simples de ser implementada.

Um grande destaque sobre instrumentos empregando transformada de *Hadamard* vinha sendo observado na literatura⁶, mas nada havia sido proposto para que pudessem realizar medidas muito rápidas. Concluiu-se então que era a ocasião de realizar a tentativa da construção de um equipamento desse tipo.

A utilização da espectrometria com transformada de *Hadamard* teve seu início no começo dos anos 70, mas como requeria uma mecânica, eletrônica e computação difícil de ser implementada na época, acabou ficando no esquecimento. Os *Fourier* por outro lado, tiveram grande evolução desde então, tornando-se um padrão no mercado.

O retorno da espectroscopia *Hadamard* deve-se em muito à evolução na mecânica de precisão e da eletrônica, além da recente possibilidade do desenvolvimento de sistemas sem nenhuma parte móvel⁷, o que simplifica muito a construção do instrumento.

Tudo indica que agora este tipo de instrumentação veio para ficar. O lugar a ser ocupado por esses instrumentos, principalmente quando comparados com os de *Arranjos Lineares de Diodos* para a região do ultravioleta/visível, deve estar localizado em aplicações onde o fluxo de radiação luminosa seja baixa, ou para adquirir espectros em tempos curtos. Na região do infravermelho a espectrometria *Hadamard*, parece prestar-se a aplicações muito promissoras em sistemas que não necessitem grande resolução. Por ser mais robusto e fácil de ser implementado que os *Fourier*, poderá ser utilizado em aplicações no campo, para medidas em tempo real.

A segunda parte do trabalho trata da aplicação do espectrofotômetro com transformada de *Hadamard* desenvolvido como unidade de detecção num sistema para Análise por Injeção em Fluxo.

A Análise por Injeção em Fluxo, além do seu uso em automação pura e simples de procedimentos anteriormente executados manualmente, tem demonstrado que seu princípio básico de dispersão controlada permite o desenvolvimento de novas metodologias analíticas que dificilmente poderiam ser implementadas através de outros procedimentos.

Recentemente, grande atenção tem sido dada ao fenômeno de dispersão e à exploração prática do gradiente de concentração por ele gerado^B. Se uma zona de amostra coalesce com um gradiente de concentração variável de um reagente, uma resposta complexa pode ser obtida. Esta resposta pode ser visualizada como sendo característica dessa amostra. A chamada titulação em Análise por

Injeção em Fluxo⁹ é uma das aplicações mais usuais dos gradientes de concentração.

Uma maneira de aumentar ainda mais o potencial destes sistemas para a análise de misturas mais complexas é possível de ser feita, com a utilização de detectores multicanais que podem adquirir um espectro completo em curtos intervalos de tempos.

Nesse aspecto, o espectrofotômetro com transformada de *Hadamard* pode ser utilizado com grande vantagem. Uma delas relaciona-se com a possibilidade de aumentar a relação SINAL/RUÍDO, podendo-se obter espectros mesmo com baixa intensidade de luz. Outra está relacionada com o intervalo de tempo no qual o espectro pode ser obtido, que deve ser da ordem de alguns décimos de segundos.

Com a utilização de gradientes de concentração em um sistema para Análise por Injeção em Fluxo em conjunção com um detector multicanal que adquira um espectro muito rapidamente, podem ser geradas superfícies complexas, relacionando tempo, absorvância e comprimento de onda. Essa complexidade nos dados, obviamente irá requerer métodos de interpretação mais sofisticados, fornecendo por outro lado mais informações úteis a respeito da composição da amostra. Esses sistemas multidimensionais certamente irão necessitar da ajuda de técnicas quimiométricas.

A quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, a problemas de origem química. Métodos quimiométricos já vêm sendo utilizados em química analítica há muito tempo, principalmente depois da popularização dos microcom-

putadores ocorrida nos anos 80, tendo sido obtidos resultados muito satisfatórios mesmo em análises de matrizes complexas¹⁰.

Novas metodologias analíticas também podem ser formuladas tendo um conhecimento prévio da possibilidade da utilização desses métodos quimiométricos, as quais não poderiam ser implementadas sem eles.

No presente trabalho, pretendeu-se realizar determinações analíticas explorando o enorme potencial aberto com a conjunção desses vários procedimentos, como a utilização de gradientes de concentração gerados num sistema de Análise por Injeção em Fluxo, detectores multicanais de aquisição rápida (utilizando-se o espectrofotômetro *Hadamard*), somados a métodos quimiométricos. Somente muito recentemente tem aparecido na literatura comentários nesse sentido¹¹, onde inclusive tem sido elaborado o termo *Quimiografia em Fluxo** para descrever dados gerados em sistemas desse tipo.

Foram realizadas determinações simultâneas de misturas de ácidos fracos, e de ácidos fortes e fracos. A informação analítica (qualitativa e quantitativa) presente nessas misturas pode ser obtida pela titulação da amostra com uma solução alcalina, acompanhando-se uma propriedade relacionada com o pH. Medidas espectrofotométricas de moléculas que possuem diferentes estruturas na forma ácida ou básica, como os indicadores ácido-base, foram utilizadas para essa finalidade. Calibração Multivariada¹² foi empregada para a redução das variáveis e para a determinação das concentrações individuais dos ácidos presentes.

*do inglês *Flow Chemography*

A apresentação deste trabalho foi dividida em três capítulos básicos. O primeiro trata da apresentação de toda teoria a respeito da espectroscopia *Hadamard*, onde se procurou ser o mais didático possível já que, muito provavelmente, esta é a primeira monografia em português a esse respeito. Seu intuito é de servir como uma introdução para aqueles que se interessem na continuação desse trabalho.

O segundo capítulo mostra em detalhes como o instrumento foi desenvolvido, com toda parte óptica, circuitos elétricos/eletrônicos e programas computacionais implementados. Mostra também uma avaliação realizada sobre o instrumento construído, indicando suas características principais.

O terceiro capítulo trata da aplicação do espectrofotômetro como unidade de detecção num sistema para Análise por Injeção em Fluxo. Neste capítulo toda parte experimental é apresentada, como o preparo das soluções, montagem do sistema para as titulações e os resultados obtidos.

Foi decidido adicionar uma parte teórica à respeito dos equilíbrios envolvidos nas titulações em sistemas de Análise por Injeção em Fluxo e nas medidas espectrofotométricas das misturas de indicadores, para tornar mais claro como as variáveis se relacionam entre si e como são utilizadas nos cálculos da calibração multivariada. As vantagens e limitações da metodologia empregada também puderam ser delineadas a partir dessa introdução teórica e dos resultados obtidos.

Uma introdução básica a respeito do método de calibração multivariada utilizado é mostrada, em conjunto com informações

relevantes necessárias ao desenvolvimento do programa que implementa esta técnica.

Por fim é apresentada uma conclusão geral sobre todo o trabalho, assim como as possibilidades da sua continuação, tanto na parte da espectroscopia *Hadamard*, como na exploração de gradientes em sistemas para Análise por Injeção em Fluxo em conjunção com a utilização de métodos quiométricos.

Foram incluídos como apêndices alguns programas desenvolvidos tanto em FORTRAN, ASSEMBLER e QuickBasic 4.5. Considerou-se importante essa inclusão uma vez que pode servir de material de consulta para aqueles que desenvolvam projetos na mesma linha, onde certas subrotinas podem mostrar-se muito úteis.

Capítulo 1

ESPECTROSCOPIA COM USO DA TRANSFORMADA DE HADAMARD

1.1. TIPOS DE INSTRUMENTOS PARA ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Os instrumentos para espectroscopia óptica são planejados para analisarem a composição da radiação eletromagnética, determinando seus comprimentos de onda constituintes e, em muitos casos, as intensidades a eles referentes.

Esses instrumentos têm sido classificados em três categorias distintas : os temporais, os espaciais, e os multiplexados¹³. Dentro de cada uma dessas categorias podem ser destacadas outras duas sub-categorias, os dispersivos e os não dispersivos. Serão apresentadas a seguir as características principais de cada uma delas.

Instrumentos Temporais

Instrumentos temporais caracterizam-se por possuírem apenas um detector, com as sucessivas bandas de radiação examinadas sequencialmente com o tempo.

Um instrumento temporal não dispersivo pode ser um fotôme-

tro¹⁴ equipado com uma série de filtros de banda estreita no comprimento de onda apropriado para isolar a faixa espectral de interesse. Pela mudança sequencial dos filtros, a intensidade de cada faixa pode então ser determinada. Instrumentos não dispersivos temporais tem a vantagem da simplicidade, baixo custo e alto fluxo de radiação na entrada. Por outro lado, não conseguem fornecer detalhes espectrais importantes.

Outra maneira muito simples de implementação de um instrumento para espectroscopia óptica, é realizada com a utilização de um dispositivo (prisma ou rede de difração) capaz de dispersar a radiação em seus vários componentes espectrais. Um monocromador¹⁵ pode ser operado como um instrumento dispersivo temporal pela utilização de um detector fotoelétrico posicionado após uma máscara contendo uma única abertura (ou fenda), como mostrado na figura 1.1. Um instrumento desse tipo é denominado espectrofotômetro¹⁶.

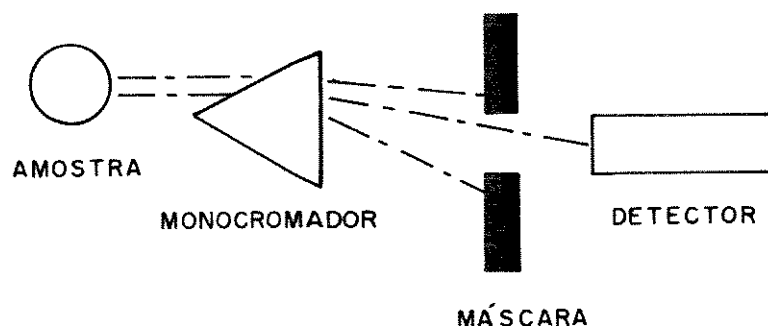


Figura 1.1. Um espectrofotômetro simples.

A máscara é posicionada de tal maneira que um certo elemento de resolução (faixa de comprimentos de onda) é apresentado ao

detector para uma dada medida. A estimativa do espectro pode ser obtida pela mudança da posição da máscara através da faixa espectral, ou pela rotação do elemento de dispersão, enquanto o sinal do detector é monitorado em cada etapa. Uma vez que este arranjo requer que as medidas sejam efetuadas sequencialmente, o tempo necessário para a obtenção de um espectro será n vezes o tempo em cada deslocamento, para um espectro com n -elementos de resolução.

Instrumentos Espaciais

Instrumentos espaciais são baseados em múltiplos detectores ou canais para obter informação sobre diferentes partes ou elementos de um espectro de forma praticamente simultânea.

Um dispositivo não dispersivo espacial, pode ser um fotômetro de três canais para monitoramento simultâneo de linhas de emissão de alguns metais alcalinos. A radiação de uma chama contendo a amostra é colocada para iluminar três fendas arranjadas à diferentes ângulos da fonte. Três detectores são colocados após cada fenda, com filtros de interferência que seletivamente permitem a passagem da radiação correspondente a cada elemento.

O instrumento espacial dispersivo mais clássico é o espectrógrafo¹⁷, no qual um filme fotográfico é colocado no plano focal de um monocromador, obtendo-se os elementos de um espectro simultaneamente. Este tipo de implementação requer um tempo relativamente longo para o processamento do filme, assim como a análise das linhas na superfície fotossensível. Esses filmes

fotográficos têm sido substituídos por dispositivos eletrônicos de captura de imagens¹⁸.

O tipo de instrumento dispersivo mais promissor e mais utilizado atualmente, baseia-se em Arranjos Lineares de diodos de silício¹⁹. Esses detectores são colocados no plano focal de um monocromador, como mostrado na figura 1.2, e capturam diretamente o espectro. Podem conter até cerca de 4000 detectores individuais cujas saídas podem ser amplificadas, processadas e analisadas em etapas praticamente simultâneas. Devido ao grande número de detectores, são ditos *multicanais*.

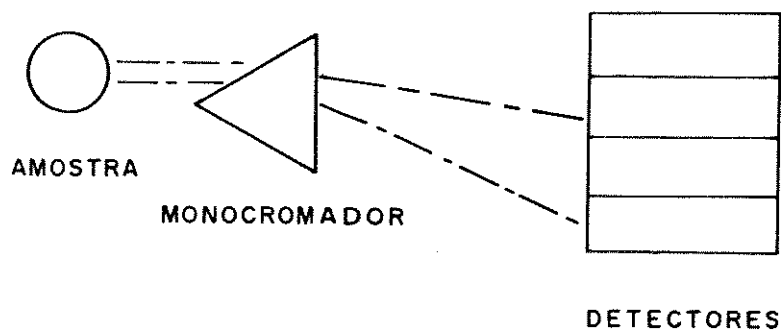


Figura 1.2. Espectrofotômetro dispersivo multicanal simples.

Se os detectores forem a origem primária do ruído, pode-se obter um aumento na relação SINAL/RUÍDO por processos de coadição, que são baseados na somatória de muitas leituras consecutivas. Por outro lado, esses detectores tem um custo elevado, o que pode tornar proibitiva a sua utilização.

Instrumentos Multiplexados

O termo multiplexação vem da teoria da comunicação, onde é utilizado para descrever sistemas nos quais muitos conjuntos de informação são transportados simultaneamente através de um único canal²⁰. Como o nome indica, instrumentos analíticos multiplexados são dispositivos de um único canal (detector) no qual os vários elementos de um sinal são observados simultaneamente. Para determinar a magnitude de cada um desses elementos é necessário modular o sinal analítico de maneira a permitir uma subsequente decodificação, fornecendo suas partes constituintes.

Os instrumentos que utilizam a transformada de *Fourier*, são os multiplexados mais largamente utilizados. A implementação da transformada de *Fourier* causou grande impacto na química analítica, dando um grande impulso à espectroscopia no infravermelho. Neste caso, a forma de obter-se um espectro está intimamente relacionada ao caráter ondulatório da radiação, empregando-se na maioria das vezes um interferômetro de *Michelson*²¹ em conjunção com a transformada de *Fourier*, que está baseada em funções trigonométricas. Esta transformada não é utilizada somente em espectroscopia óptica. Instrumentos com transformada de *Fourier* tem sido descritos para Ressonância Magnética Nuclear²² e espectroscopia de massa²³, assim como para certos tipos de medidas eletroquímicas²⁴. Descrições de instrumentos com transformada de *Fourier* para regiões do ultravioleta e visível também tem sido encontrados na literatura²⁵, mas sua utilização tem sido menos comum.

Pode-se destacar três vantagens significativas dos espectrômetros com transformada de *Fourier*, quando comparados a espectrômetros dispersivos.

A primeira delas é conhecida como *vantagem de Jaquinot*²⁸, que é obtida devido ao fato que esses instrumentos tem poucos elementos ópticos e tem aberturas ao invés de fendas, diminuindo a atenuação da radiação luminosa na entrada do instrumento. Como consequência, a potência da radiação incidindo sobre o detector é muito maior que nos instrumentos dispersivos, e maiores relações SINAL/RUÍDO podem ser observadas.

A segunda vantagem está relacionada à precisão e exatidão extremamente alta dos comprimentos de onda medidos. Esta propriedade torna possível o processamento do sinal através de médias, coadição ou subtração.

A terceira vantagem é geralmente chamada de *multiplexação* ou *ganho de Fellgett*²⁸. A multiplexação, consiste em fazer com que a energia radiante total que atinge o detector seja proveniente de combinações de vários elementos espectrais de resolução durante uma medida. O propósito da multiplexação é maximizar o fluxo de radiação incidente no detector de modo a aumentar a relação SINAL/RUÍDO na sua saída. A multiplexação também torna possível a obtenção de um espectro completo em um intervalo de tempo pequeno (geralmente um segundo ou menos).

A transformada de *Fourier* é apenas uma das várias técnicas relacionadas à transformações lineares, existindo outras baseadas em diferentes funções periódicas. A transformada de *Hadamard* é a mais comum dessas alternativas. Baseia-se em ondas quadradas, e

quando aplicada em conjunção com técnicas dispersivas dá origem aos instrumentos com transformada de Hadamard⁸. Esse instrumento, na sua forma mais simples, pode ser entendido como uma combinação de técnicas dispersivas e de multiplexação que, como resultado, possui características de ambas.

1.2. MULTIPLEXAÇÃO COM UM ESPECTROFOTÔMETRO DISPERSIVO

O conceito de multiplexação, quando aplicado à espectrofotômetros dispersivos, e suas vantagens podem ser melhor entendidos, analisando-se o espectrofotômetro mostrado na figura 1.3.

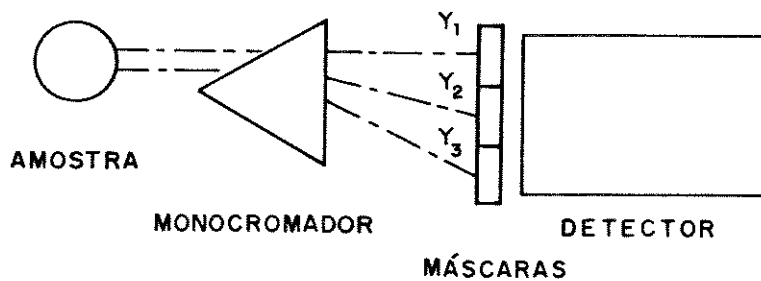


Figura 1.3. Espectrofotômetro dispersivo multiplexado.

A figura 1.3 é similar à figura 1.1, exceto que a máscara localizada em frente ao detector não tem mais uma única fenda, e é removível, dividindo a faixa espectral em três elementos de resolução.

Com a montagem da figura 1.3, podem ser efetuados dois tipos de experimentos diferentes, mostrados a seguir como EXPERIMENTO 1 e EXPERIMENTO 2.

EXPERIMENTO 1 - Inicialmente, o espectrofotômetro será utilizado da maneira convencional. Três máscaras são necessárias, cada uma contendo uma secção transparente e outras duas opacas, para obter os três pontos do espectro a ser estimado. O objetivo é estimar os três componentes espectrais reais y_1 , y_2 e y_3 a partir das três leituras do detector x_1 , x_2 e x_3 . Cada uma das leituras do detector x_1 , consiste da soma do sinal incidente e do ruído aleatório ϵ_1 gerado no próprio detector. Assume-se que os componentes do ruído ϵ_1 não sejam correlacionados, e que as leituras tenham variância σ^2 .

A figura 1.4 resume a análise desta configuração. As melhores estimativas de y_1 são suas próprias medidas. O erro $e_1 = \hat{y}_1 - y_1$ na estimativa $\hat{y}_1$ de cada y_1 é somente o ruído do detector ϵ_1 . O erro quadrático médio ϵ_1^2 em cada estimativa é então a variância σ^2 do ruído do detector.

EXPERIMENTO 2: Nesta segunda etapa, o espectrofotômetro será utilizado para multiplexação. Novamente, três máscaras e três medidas são necessárias. Entretanto, cada uma das três máscaras usadas tem duas secções transparentes e apenas uma opaca, fazendo com que uma fração maior da radiação total atinja o detector durante uma medida. Agora cada medida reflete a soma de dois componentes espectrais, mais o ruído gerado no detector. A figura 1.5 resume a análise desta configuração.

A melhor estimativa do espectro consiste de combinações lineares das medidas x_1 . Os erros nas estimativas contém mais termos de ruído que na etapa anterior, mas eles são todos pesados

pelo fator de $\frac{1}{2}$. Os erros quadráticos médios nas estimativas são portanto, 75% daqueles para o EXPERIMENTO 1.

Máscaras :	Medida 1 :	
	Medida 2 :	
	Medida 3 :	
Leituras do detector :	$x_1 = y_1 + e_1$	
	$x_2 = y_2 + e_2$	
	$x_3 = y_3 + e_3$	
Estimativas do espectro :	$\hat{y}_1 = x_1$	
	$\hat{y}_2 = x_2$	
	$\hat{y}_3 = x_3$	
Erros nas estimativas :	$\epsilon_1 = e_1$	
$(e_1 = \hat{y}_1 - y_1)$	$\epsilon_2 = e_2$	
	$\epsilon_3 = e_3$	
Erro Quadrático médio nas estimativas :	$\epsilon_1^2 = \sigma^2$	
	$\epsilon_2^2 = \sigma^2$	
	$\epsilon_3^2 = \sigma^2$	

Figura 1.4. Análise do espectrofotômetro da figura 1.3 para o EXPERIMENTO 1.

Desta maneira, é possível reduzir o erro quadrático médio na estimativa do espectro pelo uso de uma técnica de multiplexação. Para o caso onde $N=3$ (três máscaras), foi relativamente fácil determinar o melhor arranjo para a multiplexação que fornecesse uma diminuição no erro quadrático médio.

Entretanto para um número maior de máscaras, é mais difícil selecionar o melhor esquema para multiplexação. Existe um problema análogo, relacionado à pesagens em balanças de pratos, chamado

planejamento de pesagens* para o qual uma solução ótima é conhecida²⁷.

Máscaras :

Medida 1 : 

Medida 2 : 

Medida 3 : 

Leituras do detector :

$$x_1 = y_1 + y_3 + e_1$$

$$x_2 = y_2 + y_3 + e_2$$

$$x_3 = y_1 + y_2 + e_3$$

Estimativa do espectro :

$$\hat{y}_1 = \frac{1}{2}(x_1 + x_3 - x_2) = \frac{1}{2}(2y_1 + e_1 - e_2 + e_3)$$

$$\hat{y}_2 = \frac{1}{2}(x_2 + x_3 - x_1) = \frac{1}{2}(2y_2 - e_1 + e_2 + e_3)$$

$$\hat{y}_3 = \frac{1}{2}(x_1 + x_2 - x_3) = \frac{1}{2}(2y_3 + e_1 + e_2 - e_3)$$

Erro nas estimativas :

$$\epsilon_1 = \frac{1}{2}(e_1 - e_2 + e_3)$$

($e_1 = \hat{y}_1 - y_1$)

$$\epsilon_2 = \frac{1}{2}(-e_1 + e_2 + e_3)$$

$$\epsilon_3 = \frac{1}{2}(e_1 + e_2 - e_3)$$

Erro Quadrático médio

$$\epsilon_1^2 = \frac{1}{4}(3\sigma^2)$$

nas estimativas :

$$\epsilon_2^2 = \frac{1}{4}(3\sigma^2)$$

$$\epsilon_3^2 = \frac{1}{4}(3\sigma^2)$$

Figura 1.5. Análise do espectrofotômetro da figura 1.3 multiplicado, através do EXPERIMENTO 2.

*do inglês weighing designs

Planejamento de Pesagens

O problema da determinação da sequência de medidas com a finalidade de se obter uma multiplexação mais eficiente tem sido tratada via *planejamento de pesagens*. Foi observado que com a pesagem de vários objetos conjuntamente, ao invés de separados, era possível determinar seus pesos individuais mais precisamente.

Em geral (independente do tipo de balança, ou seja, de um ou dois pratos), para p itens desconhecidos $y_1, \dots, y_p$ e n medidas realizadas $x_1, \dots, x_n$ respectivamente envolvendo erros $e_1, \dots, e_n$, tem-se o conjunto de equações :

$$x_i = w_{i1}y_1 + \dots + w_{ip}y_p + e_i \quad , \quad i=1 \dots n \quad (1.1)$$

que pode ser escrito na forma matricial

$$\mathbf{x} = \mathbf{W} \cdot \mathbf{y} + \mathbf{e} \quad (1.2)$$

ou,

$$\begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} w_{11} & w_{12} & \dots & w_{1p} \\ w_{21} & w_{22} & \dots & w_{2p} \\ \dots & & & \\ w_{n1} & w_{n2} & \dots & w_{np} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \dots \\ y_p \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_n \end{bmatrix} \quad (1.3)$$

onde : $\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{e}$ são vetores que contém respectivamente as medidas combinadas dos pesos, os valores reais de cada peso individual, e os erros associados com cada medida. A matriz $\mathbf{W}$ é a representação do *planejamento de pesagens* na qual cada linha corresponde a uma

medida experimental e cada coluna a um objeto particular cujo peso está para ser determinado. Os números na matriz serão "1" se o objeto é colocado no braço esquerdo da balança de dois pratos, "-1" se o objeto é colocado no braço direito da balança, e zero se não for colocado em nenhum dos pratos. O problema do *planejamento de pesagens* consiste em determinar como W deve ser construído de modo a minimizar os erros nas pesagens. Na escolha do melhor planejamento, assume-se que :

- i) Os erros e_i não são correlacionados,
- ii) Os erros e_i são independentes da quantidade sendo pesada,
- iii) O nº de medidas "N" é igual ao nº de itens desconhecidos a serem pesados "p", e a matriz W pode ser invertida. Assim, a melhor estimativa (linear) de y é :

$$y = W^{-1}x \quad (1.4)$$

Utilizando-se esta notação, pode-se representar os três planejamentos de pesagens; (a) convencional pesagem de um objeto de cada vez, (b) múltiplas determinações de três objetos utilizando uma balança de um único prato, e (c) múltiplas determinações de quatro objetos utilizando uma balança de dois pratos, pelas matrizes W mostradas na tabela 1.1.

Matrizes *Hadamard*²⁸ produzem o melhor planejamento quando códigos "+1" e "-1" são usados para balanças com dois pratos. Uma matriz *Hadamard* é uma matriz de "+1's" e "-1's", que tem as propriedades :

$$HH^T = NI \quad \text{e} \quad HH^{-1} = I \quad (1.5)$$

onde H é uma matriz *Hadamard* N -quadrada, T significa a transposta, e I é a matriz identidade. São encontradas várias técnicas matemáticas para construção dessas matrizes, que satisfazem os requisitos apresentados^{28,29}.

Tabela 1.1. Matrizes W para três planejamentos de pesagens.

pesos combina- dos	Objetos (a)			Objetos (b)			Objetos (c)			
	y ₁	y ₂	y ₃	y ₁	y ₂	y ₃	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄
x ₁	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
x ₂	0	1	0	1	0	1	1	-1	-1	1
x ₃	0	0	1	0	1	1	1	-1	1	1
x ₄	-	-	-	-	-	-	1	1	-1	-1

Para balanças de um único prato, os melhores esquemas de pesagens são descritos por matrizes *Simplex* (ou matrizes-S)³⁰, que são derivadas das matrizes *Hadamard*. Estas matrizes são formadas omitindo a primeira linha e primeira coluna de matrizes *Hadamard* normalizadas (matrizes onde todos elementos da primeira linha e da primeira coluna são "1"), e mudando todos os "+1's" restantes para zero, e todos "-1's" para "+1". O nome é derivado do fato que os padrões "0's" e "1's" formam um código, que em teoria de comunicação é conhecido como *Simplex*. Uma matriz-S N -quadrada consiste inteiramente de zeros e uns, com cada linha contendo um total de $(N+1)/2$ uns e $(N-1)/2$ zeros. Um "1" como ij -ésimo elemento na matriz leva à inclusão do j -ésimo objeto na i -ésima pesagem, enquanto um "0" leva à excluí-lo.

A conexão com a multiplexação óptica é fácil de ser realizada. Na analogia óptica, os y_i representam as intensidades dos elementos de resolução espectral. Os dois tipos de *planejamento de pesagens* - a da balança de dois pratos (com coeficientes w_{ij} , que podem ser +1, 0, -1), e a balança de prato único (no qual os coeficientes devem ser 0 ou 1) - são realizados em sistemas ópticos por máscaras w_{ij} que utilizam a luz refletida, absorvida ou transmitida no primeiro caso, ou simplesmente que permitem ou não a passagem da luz no outro, com a utilização dos mesmos valores ótimos para as matrizes W .

1.3. ESPECTROFOTÔMETROS COM TRANSFORMADA DE HADAMARD

*Golay*³¹, no início dos anos 50, foi o primeiro a lançar a idéia que mostrava que radiação no infravermelho passando através de um espectrômetro dispersivo poderia ser analisada através de multi-fendas com padrões de modulação pré-estabelecidos, colocadas nos planos focais de entrada ou saída. Estes trabalhos iniciais ficaram no esquecimento por cerca de 20 anos, tendo sido redescobertos por *Ibbett et al*²⁹ e por *Decker e Harwit*³² no início dos anos 70, quando então surgiram os primeiros espectrômetros com transformada de *Hadamard*.

Um instrumento básico para realizar a transformada de Hadamard, é mostrado esquematicamente na figura 1.6.

Este instrumento contém três componentes essenciais em adição aos espectrofotômetros dispersivos convencionais: (1) uma máscara localizada à frente do detector, (2) uma óptica pós-

máscara, e (3) um processador localizado após o detector.

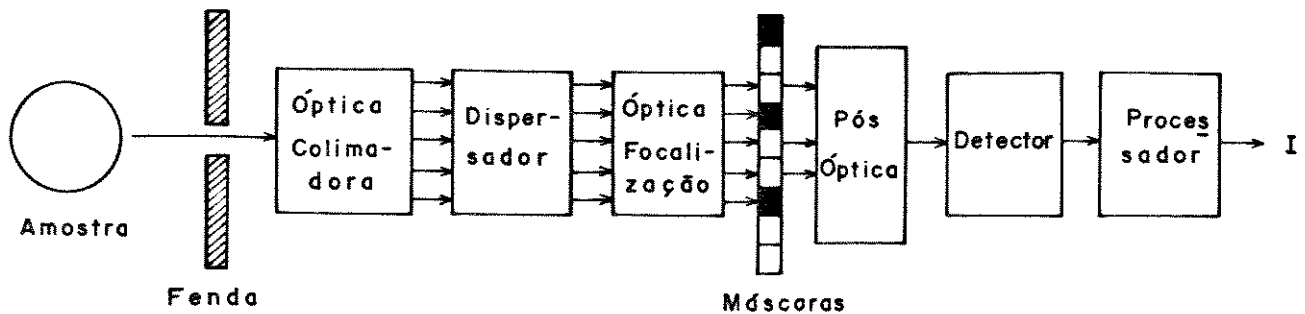


Figura 1.6. Diagrama esquemático de um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard*.

A óptica pós-máscara recombina a radiação transmitida pela máscara e focaliza essas intensidades no detector. Uma vez que o detector sempre recebe uma combinação de intensidades de mais de um elemento de resolução, um processador é necessário para analisar a radiação e reconstruir as intensidades individuais.

A Máscara

A máscara é um dispositivo que permite ou não que elementos da radiação dispersa atinjam o detector. As intensidades combinadas fornecerão medidas lineares somente se o detector empregado no espectrofotômetro é um dispositivo linear, isto é, duplas intensidades produzem duplos sinais.

A implementação das máscaras tem sido realizada mecanicamente através do movimento de translação horizontal de um conjun-

to de máscaras arranjadas linearmente^{33,34} ou por movimento de rotação de discos³¹.

As máscaras podem ser construídas a partir de matrizes-S cíclicas³⁵, onde cada linha na matriz é gerada a partir da anterior pela simples mudança do primeiro elemento, que passa a ser o último na próxima linha. A vantagem da utilização de uma matriz cíclica é que ao invés de muitas máscaras separadas (por exemplo: 110, 101 e 011), uma única máscara (11011) pode ser construída.

Recentemente, máscaras estacionárias de cristal líquido tem sido utilizadas, apresentando a grande vantagem de que não existe nenhuma parte móvel no instrumento, evitando-se os problemas associados com a construção e operação dos dispositivos móveis.

Nas investigações iniciais⁷ foi utilizado um arranjo comercial, não específico, de cristal líquido utilizado como obturador óptico*. As máscaras podem ser construídas pelo depósito de um cristal líquido como um filme num substrato transparente. Este filme é dividido em faixas por um material opaco que evita a mistura e forma as várias máscaras. O código *Hadamard* pode então ser controlado por um microprocessador, que diretamente faz com as máscaras mudem de estado, a partir da alteração no campo eletromagnético em cada faixa.

Embora livre dos problemas mecânicos, este tipo de máscara apresenta outras limitações devido principalmente ao material utilizado. A luz não é totalmente bloqueada quando o código deve ser zero, e também não é totalmente transmitida, quando o código

*do inglês *Liquid-Crystal optical shutter array*

deve ser "1". Esta situação é análoga ao caso das máscaras móveis com elementos parcialmente abertos ou parcialmente fechados. Além disso, as transmitâncias variam com a frequência da radiação incidente na máscara, ou seja, o material (cristal líquido) absorve parte da radiação. Apesar disso, estas máscaras estacionárias têm sido satisfatoriamente utilizadas em espectrômetros para a região do visível e do infravermelho próximo⁷, e para instrumentos *Raman* no visível³⁶ e no infravermelho próximo³⁷.

Métodos computacionais tem sido apresentados para a correção dessas imperfeições^{38,39}, de modo a levar em conta, no cálculo da transformada de *Hadamard*, os problemas associados a esse tipo de material. Também novos materiais⁴⁰ baseados em cristais líquidos polímero-dispersados* tem sido testados com vantagem sobre aqueles inicialmente utilizados, pois bloqueiam de forma mais efetiva a radiação, além de serem mais transparentes.

Outros problemas envolvendo arranjos de cristal líquido incluem a histerese do material e tempo necessário para a estabilização. Isto pode ser minimizado ampliando-se o tempo de exposição para alguns minutos, mas isto torna a aquisição do espectro lenta, inviabilizando algumas aplicações.

Apesar desses problemas, a recente utilização dessas máscaras estacionárias eletro-ópticas, fez em grande parte com que ressurgisse o interesse pela espectroscopia *Hadamard*^{38,41}, onde, com a crescente pesquisa em novos materiais, poderá resultar num produto sem tantos inconvenientes.

*do inglês *Polymer-dispersed Liquid-Crystals*

O Processador

A função do processador é reconstruir o espectro original a partir das n intensidades medidas pelo detector. Isto tipicamente envolve a solução de n equações e n incógnitas, onde os $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ representam os valores medidos, e os $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$ os valores individuais a serem estimados. Tem-se então a equação matricial :

$$\mathbf{x} = \mathbf{W} \mathbf{y} \quad (1.6)$$

A solução para $\mathbf{y}$ é:

$$\mathbf{W}^{-1} \mathbf{W} \mathbf{y} = \mathbf{y} = \mathbf{W}^{-1} \mathbf{x} \quad (1.7)$$

onde $\mathbf{W}^{-1}$ é a inversa da matriz $\mathbf{W}$, que contém os *planejamentos de pesagens*. Em outras palavras, a multiplicação da matriz coluna $\mathbf{x}$, que contém as intensidades combinadas medidas pelo detector, pela inversa da matriz $\mathbf{W}$ fornece a matriz coluna $\mathbf{y}$, que contém as intensidades individuais estimadas.

A inversa da matriz *Hadamard* ou da matriz-S é particularmente fácil de ser obtida. A inversa de uma matriz-S de ordem n é rapidamente gerada pela troca de cada "0" por "-1" na original matriz $\mathbf{W}$ e então multiplicando-se o resultado por $2/(n+1)$. Para ilustrar, tomando-se a matriz-S como :

$$S = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 \end{vmatrix} \quad (1.8)$$

Sua inversa será,

$$S^{-1} = \frac{2}{(n+1)} \begin{vmatrix} 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 \end{vmatrix} \quad (1.9)$$

onde $n=3$

A inversa da matriz *Hadamard* de ordem n pode ser obtida a partir da transposta da matriz original e multiplicando o resultado por $1/n$. Se H é uma matriz *Hadamard* com elementos a_{ij} , onde "i" representa o número da linha e "j" o número da coluna, então a transposta de H é uma matriz cujos (i,j) 's são trocados por (j,i) 's. Em outras palavras, para obter a transposta da matriz H , todos elementos da matriz são rodados 180° ao redor da diagonal principal. Para ilustração, se a matriz *Hadamard* é dada por:

$$H = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 \end{vmatrix} \quad (1.10)$$

então sua inversa será:

$$H^{-1} = \frac{1}{n} \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \end{vmatrix} \quad (1.11)$$

onde $n=4$.

A utilização de matrizes para a obtenção das estimativas das intensidades individuais y_1 , a partir das intensidades medidas combinadas x_1 será ilustrada utilizando um exemplo específico.

Suponha-se que três intensidades combinadas medidas com valores de $x_1=3$, $x_2=5$ e $x_3=4$ unidades, sejam realizadas pelo detector utilizando o *planejamento de pesagens* determinado pela matriz-S dada em 1.8. Então, a equação matricial ficaria da seguinte forma:

$$\begin{vmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 3 \\ 5 \\ 4 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 \end{vmatrix} \begin{vmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \end{vmatrix} \quad (1.12)$$

Como demonstrado,

$$\begin{vmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \end{vmatrix} = \frac{2}{3+1} \begin{vmatrix} 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 \end{vmatrix} \begin{vmatrix} 3 \\ 5 \\ 4 \end{vmatrix} \quad (1.13)$$

A multiplicação de matrizes é realizada pela multiplicação de linhas por colunas, isto é,

$$y_1 = 2/(3+1) \times (w_{11}x_1 + w_{12}x_2 + \dots + w_{1n}x_n) \quad (1.14)$$

então,

$$y_1 = (1/2) \times (3+5-4) = 2 \text{ unidades}$$

$$y_2 = (1/2) \times (+3-5+4) = 1 \text{ unidade}$$

$$y_3 = (1/2) \times (-3+5+4) = 3 \text{ unidades}$$

1.4. VANTAGENS DA ESPECTROFOTOMETRIA COM TRANSFORMADA DE HADAMARD

Instrumentos desse tipo possuem a vantagem da multiplexação, ou *ganho de Fellget*, como já mencionado, visto que as intensidades de vários elementos de resolução atingem o detector simultaneamente.

Coadição e subtração espectral são possíveis para o caso das máscaras estacionárias de cristal líquido, ou ainda para máscaras móveis com um alto controle no seu deslocamento. A faixa espectral passando através de uma determinada abertura da máscara deve permanecer inalterada durante todo o experimento. Desta forma, espectrofotômetros com transformada de *Hadamard* podem possuir uma vantagem análoga à precisão na frequência dos instrumentos *Fourier*.

Além dessas vantagens, pode-se destacar outros atributos encontrados nos espectrofotômetros *Hadamard*, e não necessariamente em outros instrumentos como :

- 1) simplicidade da instrumentação,
- 2) possibilidade de utilizar filtros espaciais além de filtros ópticos,
- 3) amplificadores e conversores analógico-digitais relativamente simples associados ao detector, devido a pequena faixa dinâmica dos sinais referentes às intensidades totais medidas,
- 4) simplificação da parte eletrônica, computacional e mecânica,
- 5) manutenção simples e menor treinamento necessário,
- 6) baixo custo.

Uma comparação entre os instrumentos baseados na transformada de *Fourier* e *Hadamard* pode agora ser brevemente realizada, como mostrado na tabela 1.2.

Tabela 1.2. Comparação entre instrumentos baseados nas transformadas de *Fourier* (FT) e *Hadamard* (HT).

CARACTERÍSTICA	FT	HT
tipo espectrômetro	interferométrico	dispersivo
aquisição espectral	espelho móvel	máscaras abertas ou fechadas
partes móveis	SIM	SIM/NÃO
transformada	FOURIER	HADAMARD
Multiplexação(Fellget)	SIM	SIM
Precisão na frequência	SIM	SIM
Irradiação na entrada(Jacquinet)	SIM	NÃO
Resolução	alta	baixa
Faixa espectral	larga	limitada
Faixa dinâmica	alta	pequena
Eletrônica, mecânica e computação simples	NÃO	SIM

1.5. OUTRAS MONTAGENS DE ESPECTROFOTÔMETROS COM TRANSFORMADA DE HADAMARD

A apresentação realizada até agora, foi concentrada na instrumentação mais comumente utilizada, existindo entretanto outras variações possíveis.

Tem sido apresentadas, outras três montagens, que são os

instrumentos HT para imagem, os sistemas com dois detectores e os duplamente codificados. Essas três variações da instrumentação básica, serão mostradas a seguir, com o objetivo de complementar esta introdução à espectroscopia *Hadamard* e de estabelecer suas potencialidades.

Instrumentos para aquisição de imagens

No esquema geralmente empregado na transformada de *Hadamard* tem-se um único detector, e um arranjo linear de fendas abertas ou fechadas usadas como uma máscara e colocadas no plano focal da saída de um espectrofotômetro. Essas fendas abertas ou fechadas também podem ser arranjadas como uma matriz retangular bidimensional e utilizada para produzir uma imagem de um objeto.

*Gottlieb*⁴² foi o primeiro a mostrar, no final dos anos 60, que a modulação digital, ou multiplexação, através de máscaras bidimensionais poderia resultar na reconstrução de imagens.

A figura 1.7, mostra um diagrama esquemático de um instrumento para codificação *Hadamard* de imagens. Um instrumento foi construído e patenteado nos anos 70 baseado nesse princípio⁴³, que poderia obter imagens no infravermelho a partir da emissão térmica de objetos.

Um objeto pode ser subdividido em vários setores, cada um possuindo uma intensidade de radiação associada. Se for possível determinar essas intensidades, poderá ser formada uma imagem desse objeto.

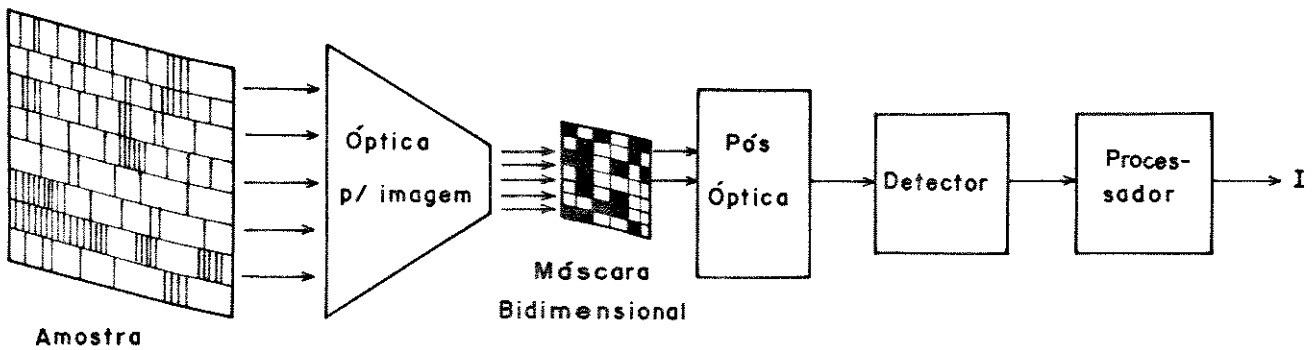


Figura 1.7. Diagrama esquemático de um espectrômetro Hadamard para obtenção de imagens.

Por exemplo, se existirem 15 intensidades desconhecidas, serão necessários 15 arranjos de máscaras bidimensionais linearmente independentes, cada uma formando uma matriz 3 X 5 de fendas que estarão abertas ou fechadas. Uma configuração de fendas abertas ou fechadas é um tipo de *planejamento de pesagens*, cujo melhor arranjo de máscaras será derivado de uma matriz-S 15 X 15. Para formar máscaras bidimensionais, os 15 elementos de cada linha num arranjo linear são desdobrados, para produzir uma matriz 3 X 5. Por exemplo, uma máscara linear derivada da primeira linha de uma matriz-S 15 X 15 seria :

$$S_{1,15} = 1 \ 1 \ 1 \ 0 \ 1 \ 0 \ 1 \ 1 \ 0 \ 0 \ 1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1 \quad (1.15)$$

enquanto a correspondente máscara retangular para formar a imagem seria:

$$S_{3,5} = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix} \quad (1.16)$$

Espectroscopia *Raman* com codificação *Hadamard* do sinal tem sido implementada⁴⁴, baseada nesses detectores para imagem. A amostra é iluminada com um feixe de *laser* e o espalhamento *Raman* é coletado através de microscópio convencional e apresentado à sequência de máscaras *Hadamard* bidimensionais antes de passar por um espectrômetro.

Até o presente momento, essas técnicas de obtenção de imagens somente tem utilizado máscaras móveis, onde é possível obter elementos de resolução de tamanho adequado. Máscaras estacionárias eletro-ópticas ainda não tem resolução suficiente para serem empregadas neste tipo de configuração.

Sistemas com dois detectores

Tem sido sugerido que ao invés da utilização de máscaras que estão abertas ou fechadas, podem ser construídas máscaras que podem transmitir e refletir a radiação³⁰. São utilizados dois detectores, um para a radiação transmitida e outro para a refletida, como mostrado na figura 1.8. Determina-se a diferença entre as leituras dos dois detectores, formando-se um arranjo do tipo (+1,-1) como um pseudo *planejamento de pesagens* de uma balança de dois pratos. O melhor planejamento de construção das máscaras é baseado na matriz *Hadamard*.

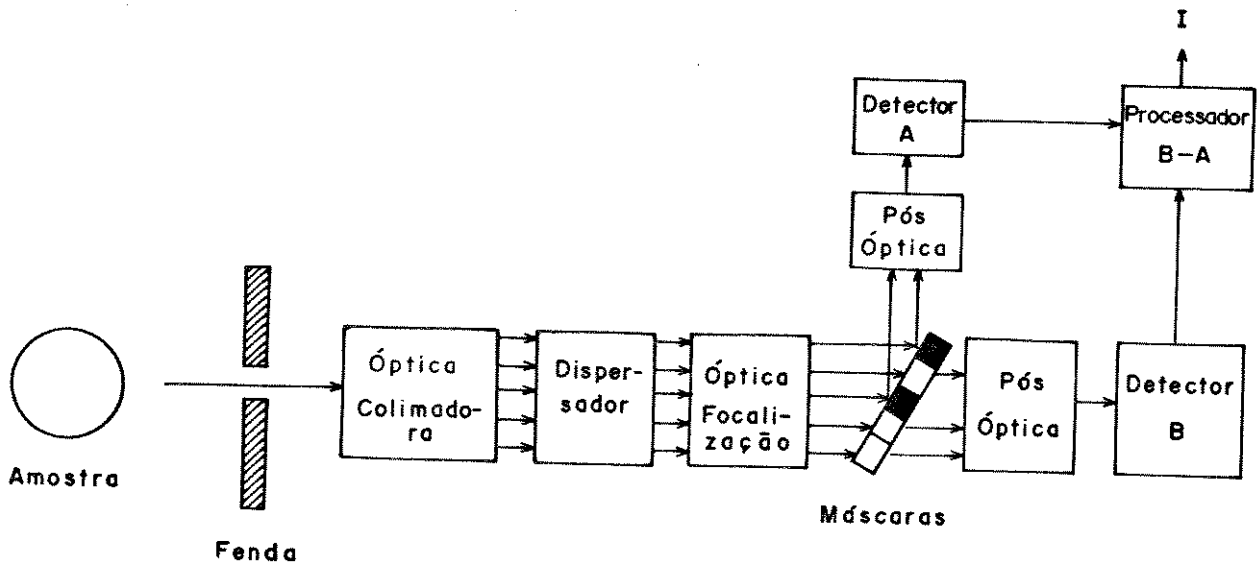


Figura 1.8. Diagrama esquemático de um espectrômetro *Hadamard* de dois detectores.

Supondo-se que a matriz *Hadamard* seja,

$$H = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 \end{vmatrix} \quad (1.17)$$

As quatro leituras a serem realizadas pelo detector "B" serão:

$$x_1 = y_1 + y_2 + y_3 + y_4$$

$$x_2 = y_1 \quad \quad \quad + y_4$$

$$x_3 = y_1 + y_2$$

$$x_4 = y_1 \quad \quad \quad + y_3$$

As máscaras colocadas à frente do detector "B", corresponderão a seguinte matriz de codificação :

$$W_B = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \end{vmatrix} \quad (1.18)$$

As quatro leituras a serem realizadas pelo detector "A" serão:

$$\begin{aligned} x_1 &= 0 \\ x_2 &= +y_2 + y_3 \\ x_3 &= +y_3 + y_4 \\ x_4 &= +y_2 + y_4 \end{aligned}$$

As máscaras colocadas à frente do detector "A", corresponderão a seguinte matriz de codificação :

$$W_A = \begin{vmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \end{vmatrix} \quad (1.19)$$

A matriz *Hadamard*, a ser utilizada nos cálculos da transformada é então obtida por :

$$H = W_B - W_A \quad (1.20)$$

Arranjos desse tipo, teoricamente podem fornecer um aumento

na relação SINAL/RUÍDO³⁰, quando comparados aos baseados nas matrizes-S.

Instrumentos duplamente codificados

Instrumentos deste tipo, codificam a radiação duas vezes, pela utilização de máscaras em ambas aberturas de entrada e saída⁴⁵. Uma montagem típica dos componentes é mostrada esquematicamente na figura 1.9.

Uma vez que múltiplas fendas são empregadas na entrada, bem como na saída, este tipo de instrumentação tem o potencial de adquirir uma vantagem análoga à de *Jacquinot*, do acréscimo na iluminação na entrada, em adição às outras vantagens já apresentadas. Entretanto não tem sido encontrados exemplos práticos deste tipo de implementação.

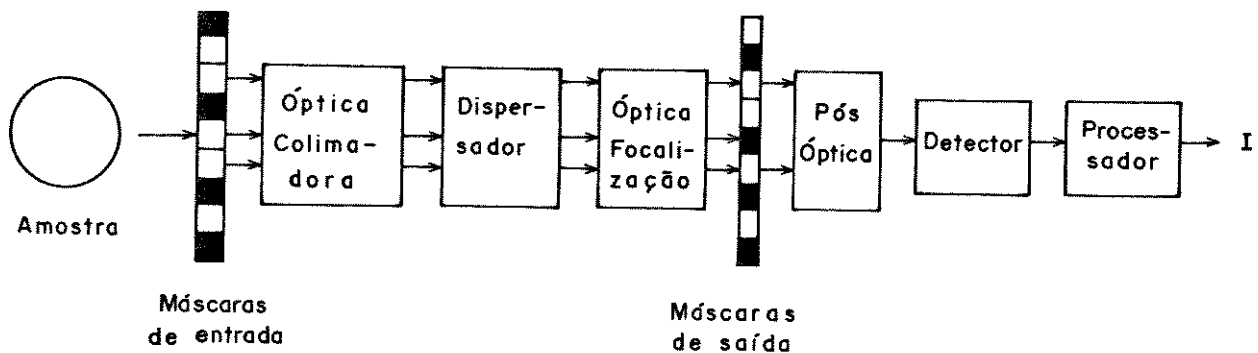


Figura 1.9. Diagrama esquemático de um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard* duplamente codificado.

Capítulo 2

CONSTRUÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO COM TRANSFORMADA DE HADAMARD

2.1. O ESPECTROFOTÔMETRO COM TRANSFORMADA DE HADAMARD DESENVOLVIDO

O espectrofotômetro com transformada de *Hadamard* foi desenvolvido com os seguintes propósitos : ser capaz de obter um espectro completo em intervalos de tempo curtos (da ordem de décimos de segundos) e operar na região visível do espectro. Embora os recentes avanços na instrumentação para a espectrofotometria *Hadamard* estejam baseados na utilização de dispositivos eletro-ópticos (máscaras estacionárias de cristal líquido), eles ainda são muito lentos, estendendo o intervalo de tempo de uma aquisição para alguns minutos⁷.

As máscaras foram arranjadas radialmente em um disco metálico que gira cortando o plano focal da luz dispersa, como previamente descrito por *Decker e Harwit*³². Os problemas com o alinhamento, sério nestes dispositivos mecânicos, foram minimizados pela utilização de posicionadores ópticos⁴⁶ na localização de cada máscara e sincronização das medidas de intensidade. Como a máscara é opticamente transparente a toda faixa espectral, este

tipo de arranjo pode ser utilizado em outras regiões do espectro.

Foi implementado um monocromador baseado num arranjo óptico de *Czerny-Turner* simétrico⁴⁷ para tornar o instrumento mais simples e portátil.

O instrumento é controlado por um microcomputador tipo IBM-PC AT, e a comunicação entre eles é realizada através de uma interface serial padrão tipo RS 232-C⁴⁸. Isto torna o espectrofotômetro mais versátil, uma vez que pode ser conectado a qualquer microcomputador que possua essa interface padrão.

2.2. PARTE ÓPTICA

Um diagrama esquemático da parte óptica do espectrofotômetro *Hadamard* desenvolvido encontra-se na figura 2.1. Este possui uma fenda de entrada fixa de 0,4 mm de largura e 1,0 mm de altura. Os espelhos côncavos (FUNBEC) do monocromador tem foco de 15,0 cm e diâmetro de 5,0 cm, e a rede de difração (Edmund Scientific) possui 600 linhas/mm e *blaze* a 650 nm.

A radiação dispersa é focalizada na superfície do disco metálico que contém as máscaras. A parte dessa radiação que passa pelas máscaras é recombinada com a utilização de um outro espelho côncavo de 3,0 cm de foco e 5,0 cm de diâmetro, localizado a 8,0 cm do plano do disco que contém as máscaras. Um fotodiodo (Hamamatsu, S1226-5BQ) é utilizado como detector, colocado no foco deste último espelho. O fotodiodo foi ligado a um conversor corrente-tensão em um arranjo do tipo foto-corrente⁴⁹ como mostrado na figura 2.2, para garantir uma resposta linear em

função da intensidade do sinal.

Todos suportes para os espelhos, rede de difração, motor de passo, disco das máscaras e fotodiodo foram confeccionados pela OPTROM - INSTRUMENTOS ÓPTICOS E DE PRECISÃO, localizada em Campinas - SP.

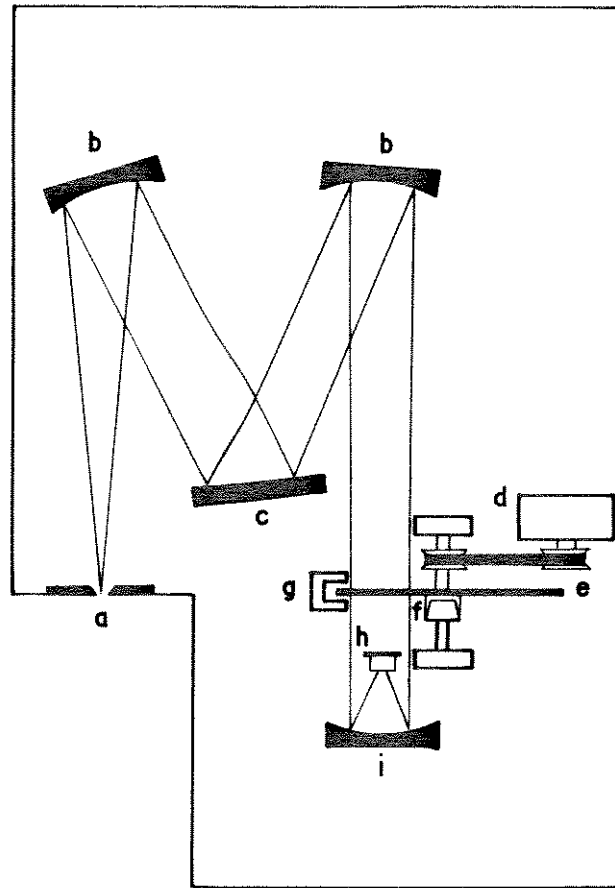


Figura 2.1. Diagrama esquemático da parte óptica do espectrofotômetro. **a.** fenda de entrada, **b.** espelhos côncavos, **c.** rede de difração, **d.** motor de passo, **e.** disco contendo as máscaras, **f.** chave óptica reflexiva, **g.** chave óptica de transmissão, **h.** fotodiodo, **i.** espelho côncavo.

Todo arranjo óptico foi montado sobre uma placa de alumínio de 1,0 cm de espessura com dimensões de 30 cm X 50 cm e coberto por uma tampa confeccionada em folha de alumínio de 1,0 mm de espessura. A placa e a tampa foram recobertos internamente com feltro cor preta.

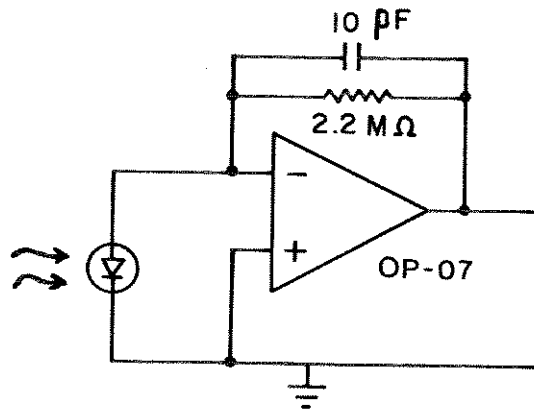


Figura 2.2 Conversor corrente-tensão para o fotodiodo.

2.3. MÁSCARAS HADAMARD

Um total de 64 máscaras foram dispostas radialmente em um disco de aço inoxidável de 10,0 cm de diâmetro e 0,3 mm de espessura, conforme mostrado na figura 2.3. Esse disco foi obtido através de corrosão química de metal constituinte, tendo sido confeccionado pela METALFOTO S.A. de São Paulo - SP, com base num desenho elaborado em um *ploter*, cujo programa de controle foi desenvolvido em FORTRAN e encontra-se listado no Apêndice 1. Foram necessárias correções no desenho inicialmente elaborado, aplicadas ao tamanho de cada elemento de resolução, para assegurar que após a corrosão do material os elementos abertos e fechados ficassem com o mesmo tamanho. Essa correção depende do

tipo e espessura do material, assim como do processo químico empregado.

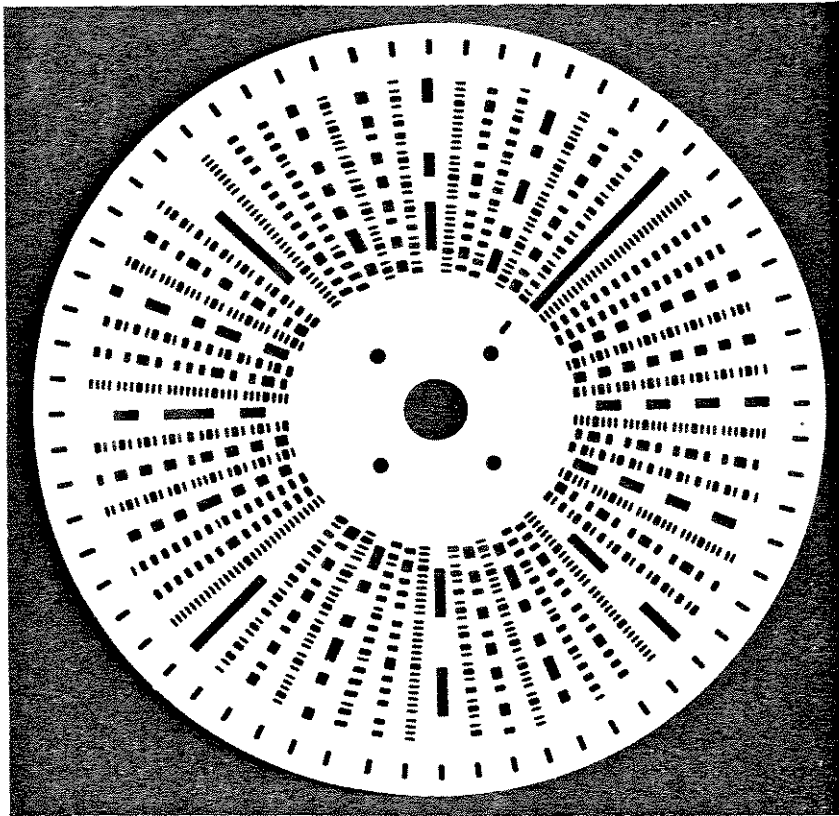


Figura 2.3. Desenho do disco que contém as máscaras. As partes escuras significam aberturas no disco metálico.

Uma das máscaras não é empregada no processo de multiplexação e permite a passagem de toda luz dispersa podendo, a princípio, ser utilizada para estimar a intensidade máxima a ser medida, de maneira a possibilitar um ajuste automático do ganho, no estágio de amplificação do sinal do fotodiodo. Também pode ser utilizada para a localização da sequência das máscaras, a partir

do maior sinal adquirido. Entretanto, esta máscara somente foi utilizada no presente trabalho para fins de alinhamento óptico.

Em cada uma das outras 63 máscaras, existem 63 elementos de resolução distribuídos seguindo um padrão de linhas de uma matriz-S gerada conforme descrito por *Ibett et al*²⁹. O procedimento de definição da matriz *Hadamard* fornecido por esses autores, leva a obtenção do padrão descrito pela matriz-S mostrada no Apêndice 2. A maneira utilizada para gerar esta matriz *Hadamard* segue um método recursivo, onde são geradas matrizes quadradas de ordem 2^n , com "n" inteiro. Iniciando com "n=1", ou seja, uma matriz 2 X 2, as próximas ordens são obtidas a partir das anteriores, conforme mostrado na figura 2.4.

$$H_2 = \begin{vmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{vmatrix} \quad H_4 = \begin{vmatrix} H_2 & H_2 \\ H_2 & -H_2 \end{vmatrix} \quad H_8 = \begin{vmatrix} H_4 & H_4 \\ H_4 & -H_4 \end{vmatrix} \quad \dots$$

Figura 2.4. Método utilizado para gerar a matriz *Hadamard*.

Após a construção da matriz *Hadamard* para "n=6", obtém-se a matriz-S como já descrito. Cada linha desta matriz corresponde a uma máscara. Cada elemento da linha igual a "1" refere-se a uma porção da máscara que permite a transmissão da luz e um "0" significa um elemento bloqueado. Os 63 elementos de cada máscara tem 25,20 mm de comprimento total (0,40 mm por elemento) e 1,80 mm de altura.

Existem também na borda do disco, 64 aberturas de 0,9 mm de altura e 2,0 mm de largura a frente de cada uma das 64 máscaras. Na parte central do disco, perto da máscara totalmente aberta há

outra abertura de igual tamanho. As aberturas externas são utilizadas para identificar a passagem de cada máscara através de uma chave óptica infravermelha de transmissão (PCST-2103). A posição da abertura interna é monitorada através de uma chave óptica de reflexão (RS, Cat.#307-913), que é empregada na identificação da primeira máscara a passar pelo feixe de radiação.

O disco metálico é colocado em movimento através de um motor de passo ($1,8^\circ$ /passo, com máximo de 600 passos/segundo) ou um motor de corrente contínua (com rotação controlada de 1 a 40 rotações/segundo). O motor foi acoplado ao eixo do disco metálico através de uma correia dentada de 15 cm de comprimento. Polias dentadas, de igual diâmetro, adequadas à correia empregada, foram utilizadas nos eixos do motor e do disco metálico.

2.4. PARTE ELETRÔNICA E INTERFACEAMENTO

O espectrofotômetro *Hadamard* da maneira como foi idealizado necessita de um microcomputador acoplado. Para tanto, foi utilizado um microcomputador tipo IBM - PC AT (Zenith, 10 MHz, com coprocessador matemático 80287, disco rígido de 40 Mbytes e monitor EGA monocromático).

Para minimizar o tempo em que o microcomputador dedica-se ao controle do instrumento, assim como para torná-lo mais versátil e portátil, com a possibilidade de ser conectado a qualquer computador dotado de uma saída serial tipo RS-232C, o espectrofotômetro foi desenvolvido ao redor de um sistema mínimo de micro-

computador baseado na CPU* 8085 da INTEL⁵⁰. A figura 2.5, mostra o diagrama de blocos do interfaceamento. A obtenção dos dados de intensidade fica a cargo do sistema mínimo, enquanto o microcomputador externo dedica-se ao tratamento e armazenamento destes dados, assim como dos cálculos necessários para a transformada de Hadamard.

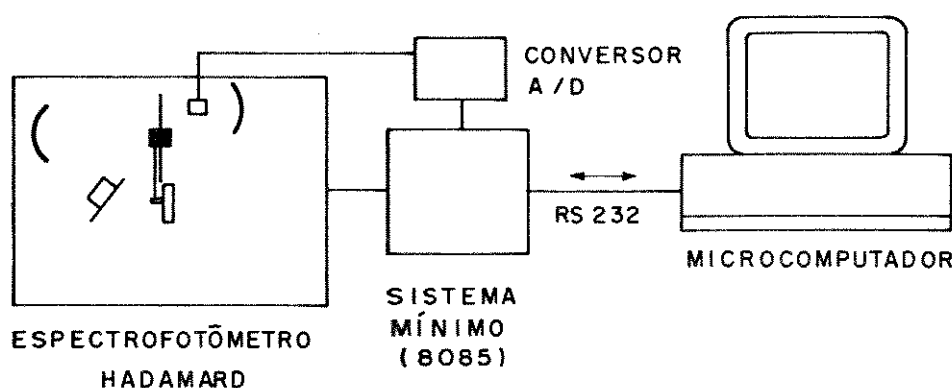


Figura 2.5. Diagrama esquemático do interfaceamento no espectrofotômetro Hadamard.

Um sistema mínimo baseado na CPU 8085, PEM TSI 1020, produzido pela TELEMÁTICA S/A de São Paulo-SP⁵¹ foi utilizado e posicionado em uma caixa metálica de 50 cm X 30 cm X 15 cm, sobre a qual foi colocada a base de alumínio contendo a parte óptica já descrita. Uma fonte de alimentação⁵² de +12V (500 mA), -12V (500 mA), +5V (750 mA) e +12V (2A) (esta última específica para o acionamento do motor de passo) foi construída e posicionada dentro desta mesma caixa.

*Central Processing Unit (Unidade Central de Processamento)

Modificações do sistema mínimo TSI 1020

O sistema mínimo TSI 1020 contém, ao redor da CPU 8085 operando à 3 MHz, um controlador de teclado/mostrador (8279), uma interface programável de comunicação paralela (8155) com 255 bytes de RAM* e um circuito desmultiplexador de dados/endereços (8212). Além disto, o sistema possui uma EPROM** de 4 Kbytes na qual encontra-se gravado o programa básico e um editor utilizado apenas se o usuário deseja desenvolver programas com o uso exclusivo do sistema mínimo. A placa do circuito impresso do sistema mínimo inclui ainda uma área de expansão que pode ser empregada pelo usuário para anexar circuitos integrados com a utilização da técnica de *wire-up*⁵³. O sistema mínimo possui também áreas de expansão para acréscimo de mais um dispositivo de comunicação paralela (8155), de até mais 4 Kbytes de RAM ou EPROM e de extensão dos sinais de controle da CPU.

Para utilizar o sistema mínimo como parte integrante do espectrofotômetro *Hadamard*, algumas modificações tiveram que ser implementadas. Foi incluída uma USART*** (8251A) para possibilitar a utilização da interface serial padrão RS 232-C que, em última análise, é responsável pela comunicação entre o microcomputador externo e o espectrofotômetro. A figura 2.6 mostra como a USART foi conectada à CPU 8085 da TSI 1020. Circuitos adicionais

**Random Access Memory* (Memória de acesso aleatório)

***Erasable Programmable Read-Only Memory* (Memória apenas de leitura programável apagável)

*** *Universal Synchronous/Asynchronous Receiver and Transmitter* (Receptor e Transmissor universal síncrono e assíncrono)

como os CI's 14C88 e 14C89 mostrados na figura são necessários para obter a conversão dos níveis de tensão padrão TTL (nível baixo de 0 a 0,8 V e nível alto de 2,4 a 5,0 V) gerados na USART em níveis de tensão compatíveis com o padrão RS 232C (nível baixo +12 V e nível alto -12 V). Os CI's 7490 e 7493 em conjunto, são empregados para gerar a taxa de transmissão/recepção de dados da RS 232C.

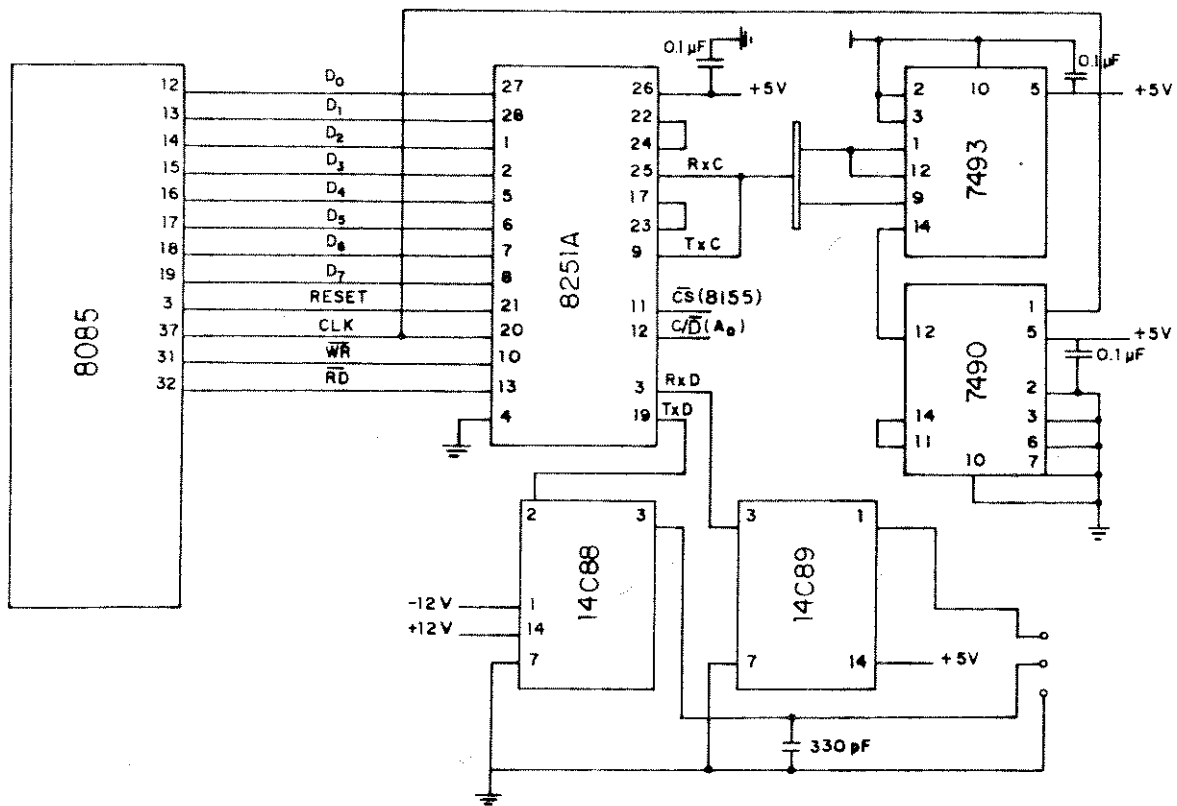


Figura 2.6. Diagrama da conexão da USART (8251A) com a CPU (8085) da TSI 1020.

O circuito permite, através de uma chave, a seleção de duas taxas de comunicação: 9600 ou 4800 bits/segundo. O endereçamento dos registros da 8251A foi realizado utilizando aquele já exis-

tente na TSI 1020 e originalmente designado para o acréscimo de uma 8155 e o bit menos significativo das linhas de endereço da 8085.

Um conversor Analógico/Digital de 8 bits (ZN 448) foi incorporado a TSI 1020 e conectado para ser lido através da interface de comunicação paralela (8155) do sistema mínimo como mostrado na figura 2.7.

O conversor analógico/digital pode fornecer uma conversão a cada $9\ \mu\text{s}$ e a faixa de tensão de trabalho é de 0 a 2,5 volts, dada pela sua tensão de referência interna. Para prevenir que tensões muito maiores que 2,5 V e muito menores que zero sejam apresentadas ao conversor, dois diodos (um de silício comum e um zener de 5,6 V) são utilizados como limitadores.

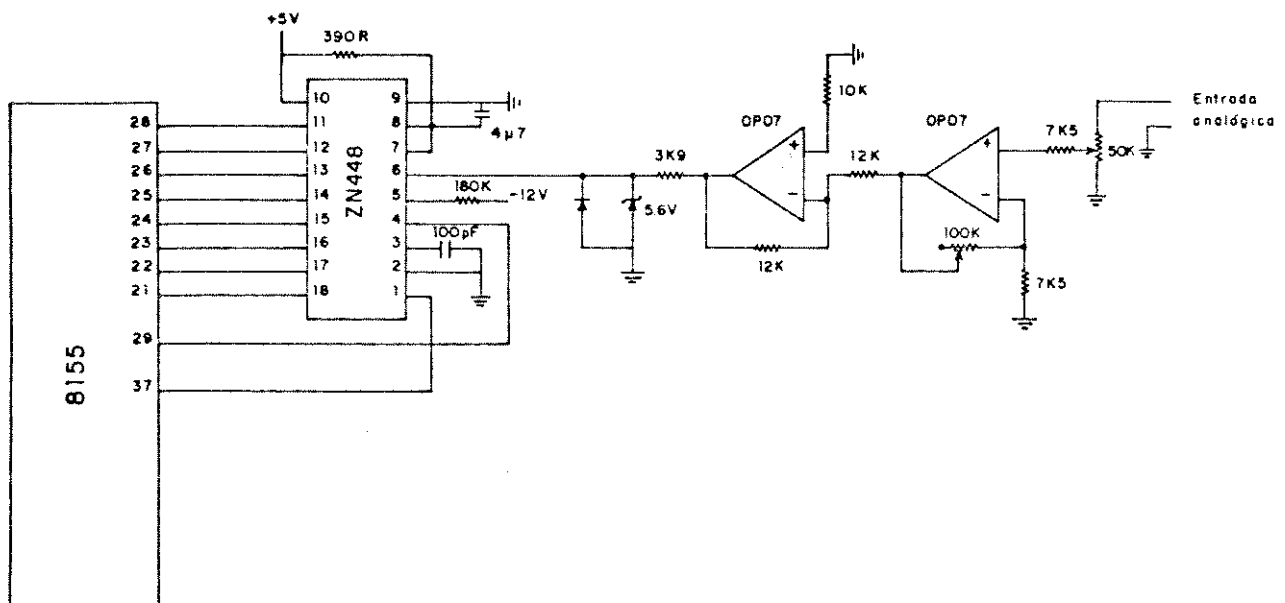


Figura 2.7. Diagrama da conexão do conversor analógico/digital com a 8155 da TSI 1020.

O sinal proveniente do fotodiodo que detecta a radiação transmitida através das máscaras pode ser atenuado através de um divisor de tensão ou amplificado com o uso de um Amplificador Operacional (OP-071). A seguir o sinal é invertido por outro Amplificador Operacional (OP-071) e chega até o conversor analógico/digital.

Circuito controlador para o motor de passo

O motor de passo empregado é do tipo utilizado em unidades de disco flexível. Esses motores têm a característica de movimentarem-se à $1,8^\circ/\text{passo}$, necessitando para isso de uma sequência de pulsos de tensão igual a 12V. Foi construído um circuito para controle do motor, como o mostrado na figura 2.8.

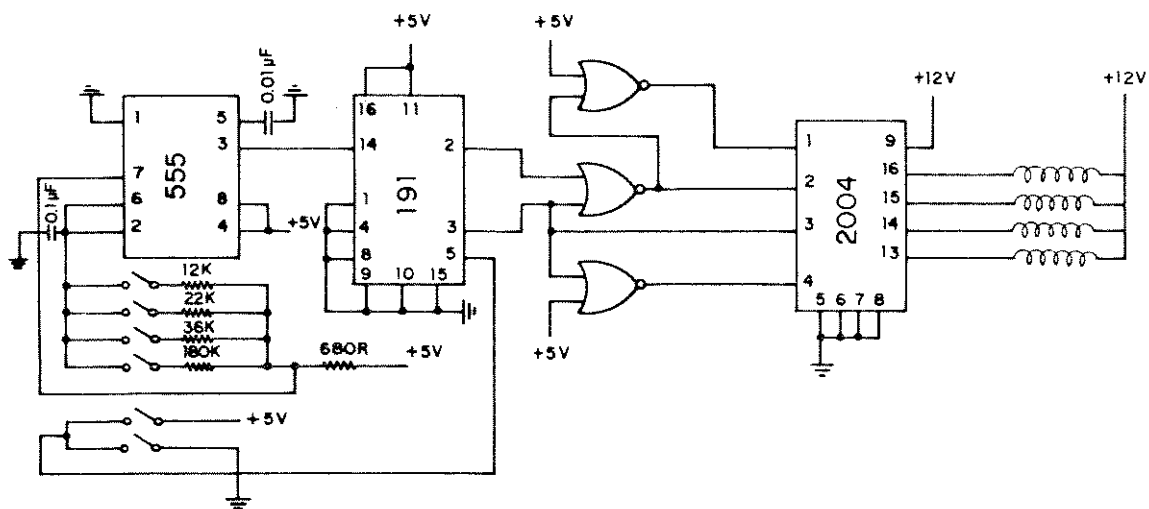


Figura 2.8. Circuito controlador para o motor de passo.

Este circuito opera de forma independente, e o usuário pode

selecionar até 5 frequências de passo diferentes através uma chave múltipla. A quantidade máxima de pulsos por segundo que o motor consegue receber sem haver perdas nos passos é de 600, e com isso o disco que contém as máscaras consegue girar a uma taxa de até 3,3 voltas/segundo.

Circuito de conversão dos sinais das chaves ópticas

Chaves ópticas são dispositivos integrados que possuem em um único encapsulamento, uma fonte de radiação infravermelha (um Diodo Emissor de Luz) e um fotodetector (um fototransistor). Estes dispositivos podem ser de transmissão, quando o emissor e o detector estão dispostos frente à frente, ou de reflexão, quando respondem à radiação refletida por um objeto colocado à sua frente.

A figura 2.9 mostra um esquema desses dispositivos, e os circuitos construídos para a identificação da passagem das máscaras pelo feixe da radiação, e identificação da passagem da primeira máscara.

Para a identificação da passagem das máscaras pelo feixe disperso foi empregada a chave óptica de transmissão. O circuito descrito na Figura 2.9.A mostra que um sinal lógico de transição nível TTL pode ser diretamente obtido com o uso de simples resistores conectados entre a alimentação (+5V) e o diodo emissor de luz, e entre a alimentação (+5V) e coletor do fototransistor.

Para a localização da primeira máscara, empregou-se uma chave óptica que opera por reflexão. Neste caso, não é possível

obter diretamente as tensões referentes à níveis lógicos TTL. Como mostrado na figura 2.9.B, um circuito auxiliar é necessário, baseado no amplificador operacional 741, operando como comparador, permitindo que as variações de tensões registradas de 3,50 V (sem reflexão) para 3,80 V (com reflexão) sejam convertidas em variações de -0,6 V a 4,6 V, respectivamente, condizentes com os níveis lógicos TTL alto/baixo. O potenciômetro mostrado na figura 2.9.B, é ajustado de forma que a tensão de comparação seja de 3,65 V.

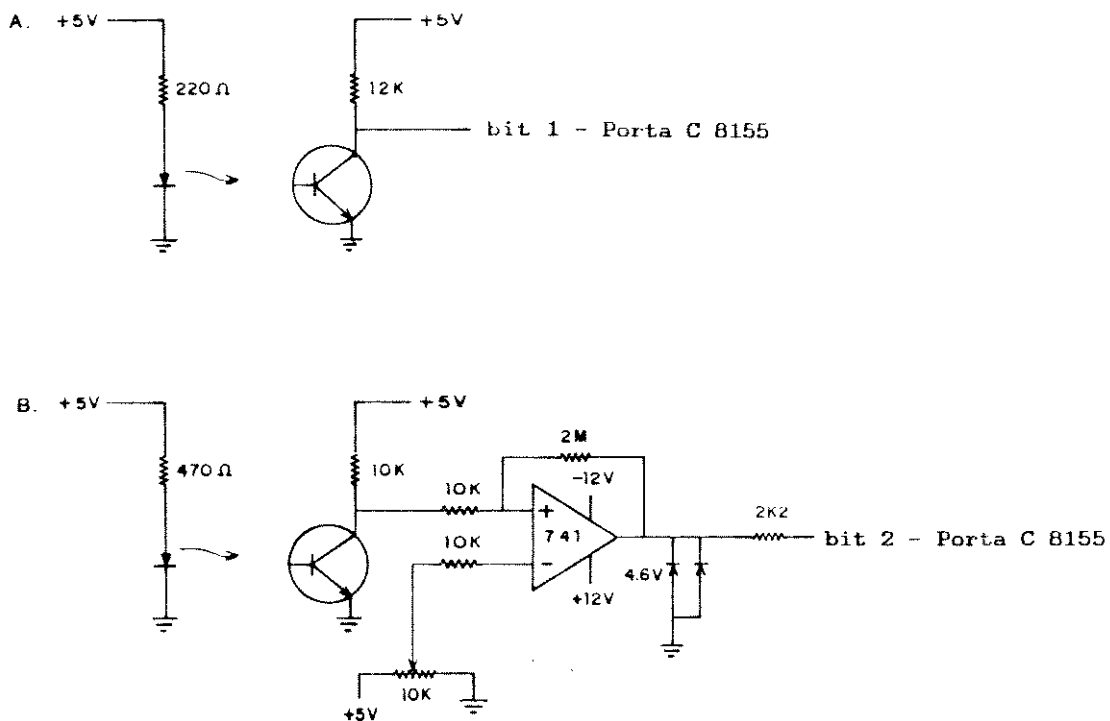


Figura 2.9. A. Esquema da chave óptica de transmissão, e circuito para transformação do sinal em nível TTL. B. Esquema da chave óptica de reflexão, e circuito para transformação do sinal em nível TTL.

2.5. PROGRAMAS PARA CONTROLE, AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DOS DADOS

Foram desenvolvidos programas para estabelecer a comunicação entre o instrumento e o microcomputador externo, para o controle do instrumento, para o tratamento dos dados obtidos, para a realização da transformada de *Hadamard*, assim como programas gráficos para mostrar o perfil dos espectros e para a impressão desses espectros. Todos os programas para o sistema mínimo TSI 1020, como os de comunicação e controle, foram desenvolvidos em ASSEMBLER⁵⁴ para a 8085. Os programas a serem executados no microcomputador externo IBM-PC AT foram desenvolvidos em linguagem QuickBasic 4.5⁵⁵. Serão mostrados a seguir, como esses programas foram desenvolvidos e como podem ser utilizados.

Modificações no programa original da TSI 1020

O programa original, gravado na EPROM da TSI 1020 é constituído de um programa monitor de 2 Kbytes que contém várias subrotinas úteis. O programa inicializa a CPU e faz o controle do teclado/mostrador permitindo a interação do usuário com o sistema mínimo. Os outros 2 kbytes desta EPROM são utilizados por um pequeno editor que permite o desenvolvimento de programas. Este editor não apresenta interesse para o presente trabalho, uma vez que o desenvolvimento dos programas para a TSI 1020 é realizado no microcomputador externo, com o uso de um ASSEMBLER (M80) para o 8085.

Desta forma, a EPROM original foi substituída por outra,

gravada de maneira a conter o programa monitor original, seguido de um programa básico de recepção de dados através da RS-232C.

Este programa básico em ASSEMBLER encontra-se listado no Apêndice 3. Ele foi desenvolvido para, numa primeira etapa, enviar o byte de comando para inicializar a interface de comunicação serial (USART) instalada, que passa então a esperar um conjunto de caracteres os quais constituem o endereço hexadecimal inicial do apontador de programa. Uma de suas subrotinas (LOAD), permite que se possa carregar na RAM da TSI 1020 um programa aplicativo qualquer previamente desenvolvido em ASSEMBLER para a 8085 no microcomputador externo.

Programa para o controle do espectrofotômetro

Uma das etapas mais importantes no desenvolvimento do espectrofotômetro está relacionada ao controle do processo de aquisição dos dados de intensidade. Como já relatado, a aquisição dos dados é realizada sob controle das chaves ópticas, através dos marcadores presentes no disco que contém as máscaras. A figura 2.10, mostra um diagrama de tempos dos eventos que ocorrem quando o disco está girando.

Uma leitura completa inicia-se quando um pulso negativo (sucessão de níveis TTL alto-baixo-alto) é detectado a partir da chave óptica reflexiva, indicando a passagem da primeira máscara. Isto pode ser considerado como um pulso inicial no controle dos sinais, e a partir daí, a chave óptica de transmissão passa a ser monitorada.

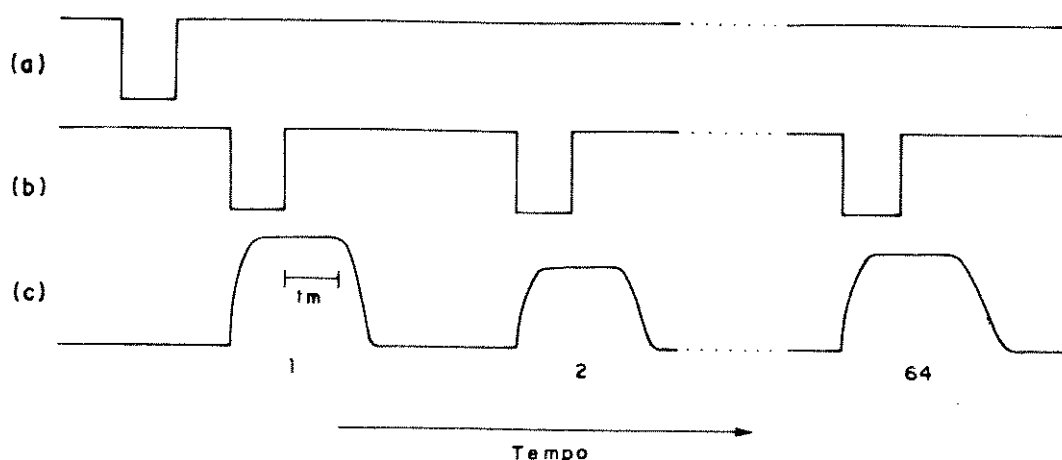


Figura 2.10. Eventos principais que ocorrem durante o processo de medida no espectrofotômetro. **a.** sinal inicial gerado pela chave óptica reflexiva, **b.** sinais gerados pela chave óptica de transmissão durante a passagem das máscaras pelo feixe óptico, **c.** sinal no fotodiodo devido a radiação que passou pelas máscaras.

Uma transição nos níveis TTL de alto-baixo-alto na saída da chave óptica de transmissão, indica que o feixe óptico está passando através da máscara. Este é o ponto onde deve ser realizada a captura do sinal do fotodiodo. O intervalo de tempo mostrado como " t_m " na figura 2.10, é o tempo disponível para as leituras do sinal no fotodiodo em cada máscara. Esses dados, convertidos para a forma digital são colocados finalmente em posições da memória na TSI 1020, em blocos de 64 bytes.

No final de uma contagem de 64 desses pulsos da chave óptica de transmissão, um conjunto completo de dados foi adquirido. Se requisitado, novamente a saída da chave óptica reflexiva é monitorada para a obtenção de um outro espectro.

Foi desenvolvido em ASSEMBLER-8085 o programa para o controle da aquisição dos dados de intensidade. Este mesmo programa possibilita também que seja realizada a transferência dos dados para o microcomputador externo, que posições de memória sejam zeradas, e que parâmetros de controle das medidas sejam colocados em posições de memória pré-estabelecidas.

O programa é carregado através do microcomputador externo, e possibilita várias leituras de uma mesma máscara (máximo de dez) e leituras em várias voltas consecutivas (máximo de dez).

O sistema mínimo TSI 1020 fica a espera de um determinado comando (um caracter ASCII) do microcomputador externo. Ao receber este comando, realiza o desvio para uma determinada posição de memória específica onde encontra-se o trecho do programa a ser executado. Após isso, retorna à sua condição inicial, aguardando novos comandos do microcomputador externo. Por exemplo, um caracter "S" faz com que se realize a aquisição dos dados dados de intensidade, um caracter "E" faz com que os dados adquiridos sejam enviados e um caracter "C" limpa as posições de memória a serem preenchidas. Uma listagem completa do programa desenvolvido encontra-se no Apêndice 4.

Programas para o microcomputador IBM PC-AT

Todo programa utilizado no microcomputador IBM PC-AT foi desenvolvido em linguagem QuickBasic 4.5 da Microsoft. Este programa possui vários menus que podem ser acessados consecutivamente, dependendo da opção do usuário. Uma sequência dos

vários menus do programa desenvolvido está na figura 2.11.

MENU 1	HADAMARD
	[Alt+Q] Sair [ESPAÇO] Comunicação
MENU 2	COMUNICAÇÃO
	[P] Programa de Controle [R] Espectros [Q] Retorno
MENU 3	ESPECTROS
	[I] Parâmetros iniciais [D] Espectro no escuro [C] Limpar memória [S] Adquirir espectros [B] Branco [Q] Retorno
MENU 4	ADQUIRIR ESPECTROS
	[I] Intensidade [T] Transmitância [A] Absorvância

Figura 2.11. Os vários menus do programa desenvolvido.

Executando o programa, inicialmente a matriz-S é lida de um arquivo do disco rígido e armazenada para cálculos posteriores. A seguir, ao usuário é apresentado um menu (MENU 1 na figura 2.11) do qual pode-se realizar o início da comunicação com o espectrofotômetro.

Se optar pela comunicação, surge um menu (MENU 2 na figura

2.11) com algumas opções. Uma delas é colocar na memória do sistema mínimo TSI 1020 o programa necessário para o controle do espectrofotômetro (item "PROGRAMA DE CONTROLE"). Outra é utilizada para a obtenção dos espectros (item "ESPECTROS"). Nesta opção, há o aparecimento de outro menu (MENU 3 na figura 2.11), onde é possível escolher quantos espectros devem ser registrados, quantas leituras de intensidade deverão ser efetuadas durante a passagem de cada máscara pelo feixe óptico, assim como o nome do arquivo onde serão armazenados os espectros (item "PARÂMETROS INICIAIS"). Também é possível obter um espectro na ausência de radiação da fonte (item "ESPECTRO NO ESCURO"), que pode ser utilizado para ajustes no instrumento, além da possibilidade da limpeza de todas posições da memória na TSI 1020 onde serão armazenados os dados de intensidade (item "LIMPAR MEMÓRIA"). A opção mais importante, relaciona-se ao item "ADQUIRIR ESPECTROS".

A seleção deste item, faz com que o microcomputador envie um comando ("S") ao sistema mínimo TSI 1020, para que este comece a aquisição dos dados de intensidade em cada máscara. Após isso, fica esperando que a TSI 1020 retorne um caracter "#", indicando que a aquisição de dados já se completou. O microcomputador manda então um novo comando ("E") que faz com que o sistema mínimo forneça os dados coletados, que é realizado de forma binária através da RS 232-C com a seguinte configuração : um *start bit*, 8 *bits* de dados e 2 *stop bits* à 9600 bits/segundo. Os dados são então armazenados em um arquivo no disco rígido sob o nome escolhido pelo usuário. Se o usuário não escolher nenhum nome, é criado um nome padrão para o arquivo com os espectros chamado de

"JOB" seguido pela data corrente.

A seguir, pré-tratamentos como a elaboração de médias de intensidades podem ser efetuadas. A transformada de *Hadamard* é aplicada aos dados de intensidade e o espectro original é recuperado. O usuário tem a opção de obter espectros de intensidade, absorvância ou transmitância (MENU 4 na figura 2.11). Se optar pelos dois últimos, deve inicialmente utilizar o item "BRANCO" para obter o espectro do solvente. Os valores de absorvância são calculados para cada ponto do espectro (61 pontos), a partir do logaritmo na base dez da relação entre os valores das intensidades do solvente e da amostra. Os valores de transmitância também são calculados para cada ponto do espectro, a partir da relação entre os valores das intensidades da amostra e do solvente.

O monitor de vídeo mostra então, um gráfico contendo as intensidades médias por máscara e, logo abaixo, o espectro correspondente. Um subprograma desenvolvido em QuickBasic 4.5 que realiza a obtenção de um espectro é apresentado no Apêndice 5. Finalmente, é possível imprimir os espectros numa impressora matricial, a partir de um subprograma desenvolvido exclusivamente para esta finalidade⁵⁶, e que é mostrado no Apêndice 6.

2.6. ESPECTROS OBTIDOS COM O ESPECTROFOTÔMETRO HADAMARD

Foram inicialmente obtidos espectros de emissão de uma lâmpada de tungstênio/halogênio. A figura 2.12 mostra um resultado típico dos dados de intensidade em cada máscara, e para o espectro recuperado após a realização da transformada de Hadamard. O

espectro é resultado de uma única revolução do disco, tomando-se dez medidas por máscara. O tempo total para a obtenção das intensidades foi de 300 ms.

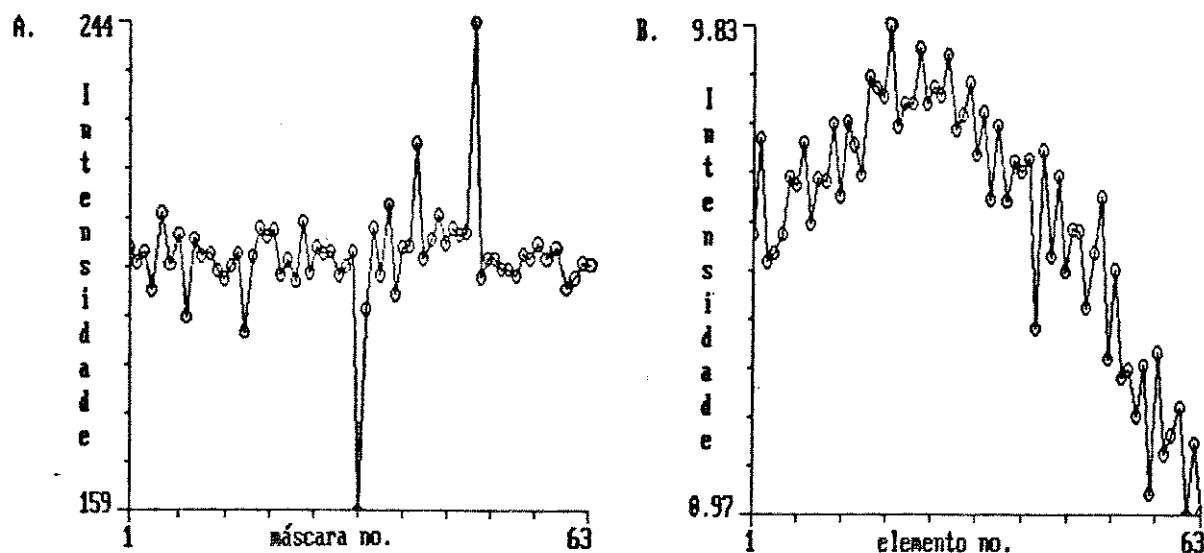


Figura 2.12. Espectro de uma fonte halógena. A. Intensidades medidas para cada máscara. B. Espectro obtido após a transformada de Hadamard. Dados de intensidade em unidades arbitrárias.

Ficou estabelecido que em todos procedimentos para a aquisição de um espectro, sempre seria utilizada uma única revolução no disco. Como já mencionado, o objetivo principal no desenvolvimento do instrumento, é que ele seja capaz de adquirir um espectro rapidamente.

Foi observado que com apenas uma única revolução no disco, pode-se obter desvios relativos médios da ordem de 1% nas leituras das intensidades, contra cerca de 0,7% para espectros tomados utilizando-se dez voltas consecutivas. Esses desvios relativos muito parecidos indicam que não devem ocorrer prejuízos, quando

da utilização de uma única revolução no disco.

O número de máximo de leituras possíveis de serem realizadas com a presente rotação do motor (3 voltas/segundo), enquanto o feixe óptico está passando por cada máscara é cerca de onze. Como o número de leituras por máscara não faz com que o tempo de aquisição de um espectro aumente, ficou estabelecido que seriam tomadas dez leituras por máscara e a média utilizada nos cálculos da transformada de Hadamard. Uma diminuição nos desvios relativos é obtida quando passa-se de uma única leitura por máscara (cerca de 4%) para uma média de 10 leituras (cerca de 1%).

Pode ser observado pela figura 2.12.B, que o espectro após a realização da transformada de *Hadamard* apresenta um alto grau de distorção. Para certificar-se que isso não se tratava de ruídos de origem eletrônica, ou da fonte de emissão, foi realizado um estudo sobre a reprodutibilidade dos dados de intensidade de cada elemento após a realização da transformada de *Hadamard*, a partir de 10 espectros semelhantes àqueles mostrados na figura 2.12.B. A média e o desvio padrão para as intensidades dos 63 elementos encontram-se listados na Tabela 2.1.

Como é possível observar, uma boa precisão é obtida para as intensidades referentes a cada elemento de resolução, indicando que os dados apresentam baixos ruídos de ordem eletrônica, ou da fonte, no período medido.

Uma explicação para este fato é que o espectro final deve refletir as imperfeições na confecção dos elementos das máscaras, ou seja, os elementos devem possuir tamanhos diferentes.

Tabela 2.1. Precisão das medidas de intensidade para cada um dos elementos de resolução. São apresentados os valores médios de 10 determinações seguidos da estimativa do desvio padrão.

nº	intensidade	nº	intensidade	nº	intensidade
1	6,04±0,04	22	8,43±0,04	43	7,13±0,04
2	7,78±0,05	23	8,43±0,05	44	5,40±0,06
3	5,57±0,04	24	9,43±0,03	45	6,17±0,06
4	5,72±0,07	25	8,45±0,03	46	6,13±0,05
5	6,07±0,06	26	8,75±0,06	47	4,74±0,05
6	7,09±0,03	27	8,61±0,03	48	5,75±0,03
7	6,92±0,06	28	9,33±0,04	49	6,77±0,06
8	7,70±0,04	29	7,96±0,06	50	3,81±0,06
9	6,26±0,06	30	8,27±0,05	51	5,43±0,06
10	7,07±0,05	31	8,08±0,08	52	3,48±0,05
11	6,99±0,03	32	7,53±0,09	53	3,64±0,04
12	8,04±0,06	33	8,27±0,07	54	2,77±0,09
13	6,76±0,04	34	6,72±0,07	55	3,71±0,04
14	8,09±0,04	35	8,05±0,04	56	1,37±0,09
15	7,65±0,06	36	6,66±0,06	57	3,96±0,04
16	7,11±0,09	37	7,42±0,05	58	2,11±0,04
17	8,89±0,03	38	7,20±0,06	59	2,43±0,06
18	8,70±0,06	39	7,57±0,09	60	2,93±0,06
19	8,55±0,05	40	4,36±0,09	61	0,97±0,05
20	9,82±0,04	41	7,61±0,09	62	2,29±0,06
21	7,99±0,06	42	5,65±0,08	63	0,99±0,07

Com o auxílio de um sistema de lentes para aumento, é possível notar que os elementos da máscara que devem estar abertos tem cerca de 5%-8% a mais no tamanho, quando encontram-se entre dois que devem estar fechados. Estas pequenas variações podem ser responsáveis pelo comportamento final no perfil do

espectro, que lembra pelo seu aspecto, um sinal de alto ruído.

Como já vem sendo realizado para máscaras estacionárias de cristal líquido^{38.39}, uma tentativa de correção destas imperfeições nos cálculos da transformada poderia ser proposta. Neste caso isso é mais difícil de ser realizado, pois muitas correções seriam necessárias, já que dependendo da posição de um elemento, seu tamanho pode variar.

Para tentar suavizar essas imperfeições nos espectros, foram utilizados alguns métodos de processamento de sinais⁵⁷, que acabam melhorando seu aspecto final, assim como tornando os dados mais reprodutíveis.

Pós-processamento dos sinais

Uma possibilidade aberta com a utilização do microcomputador externo IBM-PC acoplado ao espectrofotômetro, é a utilização de técnicas de processamento de sinais. Devido à característica do espectro obtido, optou-se por utilizar métodos de *Filtragem Digital*, ou mais especificamente, de métodos de *Alisamento** do sinal. Neste caso, os dados são modificados de maneira que os pontos individuais que são maiores que os imediatamente adjacentes são reduzidos, e os que são menores, ampliados. Este processo, naturalmente produz um sinal mais suavizado, mas não devem acontecer alterações significativas no perfil do espectro.

Foram incluídos no programa desenvolvido, dois procedimentos para a *Filtragem Digital*. Um deles, é o denominado *retangular*

*do inglês *smoothing*

ou *média móvel sem pesos**. Ele simplesmente muda o valor de cada ponto por uma média de "m" pontos adjacentes, onde "m" é um inteiro positivo denominado de "janela de alisamento". Foi utilizado um procedimento para $m = 3$, obtendo-se a relação:

$$SI_n = \frac{I_{n-1} + I_n + I_{n+1}}{3} \quad (2.1)$$

para $n = 2$ até $(p - 1)$, onde "p" é o número de pontos do espectro original, SI_n é a n-ésima intensidade filtrada, e I_n é o n-ésimo valor da intensidade original.

O outro procedimento implementado é denominado de *Triangular*, que tem o mesmo fundamento do anterior, exceto que incorpora pesos diferentes para cada ponto. A "janela de alisamento" (m), é uma meia-largura de um triângulo. Para o procedimento de cinco pontos ($m = 5$) implementado, tem-se a relação:

$$SI_n = \frac{I_{n-2} + 2I_{n-1} + 3I_n + 2I_{n+1} + I_{n+2}}{9} \quad (2.2)$$

para $n = 3$ até $(p - 2)$.

A figura 2.13, mostra os espectros formados a partir da aplicação das equações 2.1 e 2.2 ao espectro da figura 2.12.B.

Esses procedimentos de Filtragem Digital, também produzem uma diminuição na média dos desvios padrões relativos tomados

*do inglês *unweighted sliding-average smooth*

para as intensidades de cada elemento de resolução. Os valores dos desvios padrões das médias, para 10 espectros, caíram de 1,26% sem esses procedimentos, para 0,72% e 0,61% com a aplicação dos processos descritos pelas equações 2.1 e 2.2 respectivamente.

A escolha do melhor procedimento de *alisamento*, depende da largura e formato do sinal, assim como do intervalo dos pontos. Em geral, um aumento do número de pontos na "janela de alisamento" (maior valor de m), produz um aumento nas relações SINAL/RUÍDO, mas por outro lado, provoca uma redução na amplitude do espectro, além de poder provocar perdas na resolução espectral.

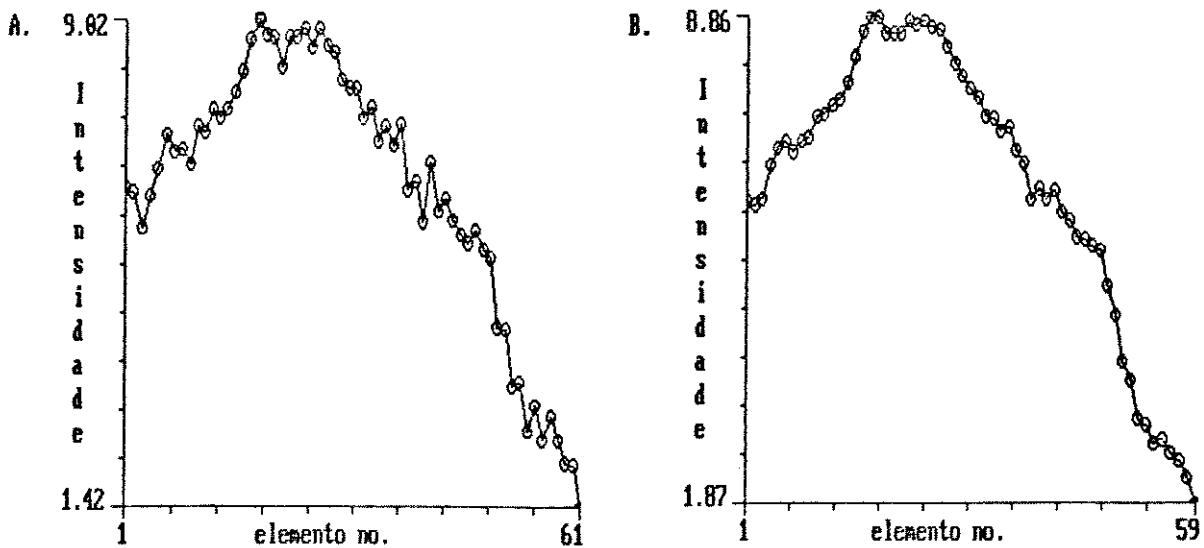


Figura 2.13. Espectros obtidos após utilizar-se os dois procedimentos de Filtragem digital. A. através da equação 2.1; B. através da equação 2.2. Dados de intensidade em unidades arbitrárias.

Para as aplicações posteriores, foi necessário definir qual tipo de procedimento de *Filtragem Digital* implementado seria

utilizado. A opção deveria recair para aquela que não provocasse perdas de detalhes espectrais importantes. Para isso foi utilizada uma solução de Cloreto de Neodímio 0,25 M. Os espectros de absorção dessas terras raras são frequentemente recomendados para este propósito, já que apresentam vários picos de absorção na região do visível. O Cloreto de Neodímio apresenta os seguintes picos⁵⁸ na região do visível: 512,00nm, 521,75nm e 574,75nm e 627,50nm. Ficou estabelecido que seria escolhido o procedimento de filtragem digital que tornasse os picos em 512,00nm e 521,75 nm visíveis.

A figura 2.14, mostra os espectros de absorvância dessa solução de Cloreto de Neodímio utilizando-se os dois procedimentos de *Filtragem digital*.

Como pode ser observado pela figura 2.14, o procedimento de *Filtragem digital* dado pela equação 2.1 preserva os dois picos, enquanto o outro faz com que se sobreponham, ocasionando uma perda na resolução. Desta forma, ficou estabelecido que sempre seria utilizado o procedimento de *Filtragem digital* 2.1 (média móvel sem pesos) nos espectros a serem obtidos.

2.7. AVALIAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO HADAMARD DESENVOLVIDO

Após o instrumento ter sido construído, determinado os tipos de pré-processamento do sinal, e utilização do procedimento de *Filtragem digital* baseado numa média móvel sem pesos, foi necessário avaliar a performance do instrumento para ser utilizado nas aplicações analíticas subsequentes.

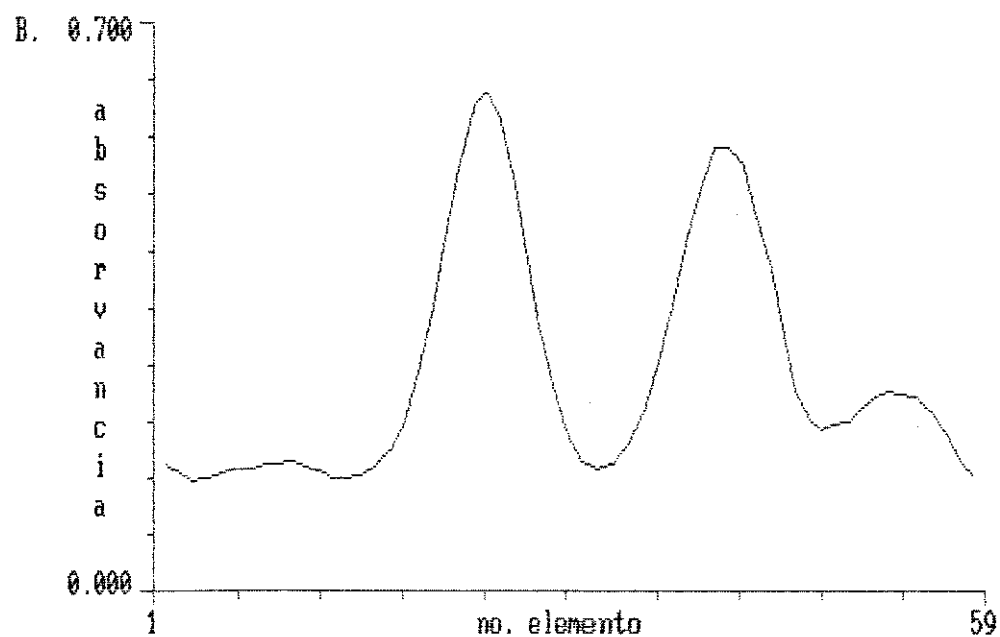
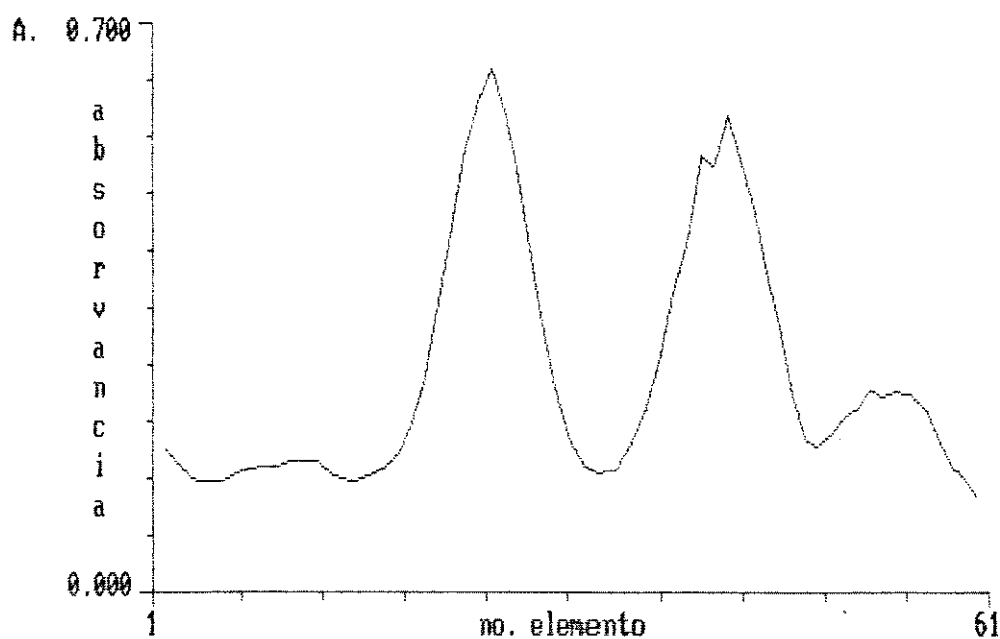


Figura 2.14. Espectros de absorvância de uma solução aquosa de Cloreto de Neodímio 0,25M, cujos dados foram filtrados digitalmente : **A.**através da equação 2.1; **B.**através da equação 2.2.

Dentre os parâmetros analisados estão a faixa espectral acompanhada, a possibilidade de realizar medidas fotométricas e a resolução, conforme recomendado pela ASTM (*American Society for Testing Materials*)⁵⁹. Também foi avaliado o tempo mínimo possível para a obtenção reprodutível de um espectro.

Um outro parâmetro muito importante que deve ser levado em conta na avaliação do espectrofotômetro, refere-se à largura da fenda de entrada, que também define a resolução no espectro. Fendas com larguras mínimas possíveis são desejáveis quando procura-se uma maior resolução no espectro. Por outro lado, isto provoca uma diminuição na potência da energia radiante na entrada, e medidas mais precisas ficam prejudicadas.

Foram construídas algumas fendas de tamanhos que variavam de 0,1 mm à 1mm. Com a montagem do sistema para a aquisição de espectros, há uma diminuição na potência da radiação que chega ao espectrofotômetro. Desta maneira, fendas mais estreitas que 0,4 mm não puderam ser utilizadas, optando-se pela de 0,4 mm em todos os experimentos.

A utilização deste tamanho de fenda, apesar de provocar diminuição na resolução, não deve gerar problemas futuros sérios, uma vez que o espectrofotômetro foi projetado para ser utilizado principalmente em aplicações quantitativas, e não nas qualitativas onde exige-se maior definição do espectro. Além disso, por operar na região do visível, onde os espectros normalmente são largos e não apresentam muitas bandas, uma maior resolução não causaria grandes benefícios.

Faixa de comprimentos de onda

A faixa de comprimentos de onda acompanhada com a presente configuração óptica do instrumento construído, foi determinada a partir das bandas do espectro da solução de Cloreto de Neodímio mostrado na figura 2.14.A.

Para a calibração da escala de comprimentos de onda em espectrofotômetros, nenhum método é superior aquele que utiliza uma lâmpada de mercúrio ou outra fonte que emita linhas espectrais^{58,59}. Entretanto, a lâmpada de Mercúrio que se dispunha não pode ser utilizada, já que sua emissão não era contínua, variando segundo a frequência de oscilação da rede elétrica. Os espectros obtidos refletiam esta oscilação, tornando-se completamente distorcidos.

Uma alternativa apontada⁵⁹ para o caso de não se dispor de lâmpadas de emissão de Mercúrio, é a utilização de espectros de elementos de terras raras como o Samário, Neodímio ou Holmio. Optou-se por utilizar uma solução de Cloreto de Neodímio, pois este apresenta mais bandas na região do visível, que é a de interesse, enquanto os outros apresentam mais bandas no ultra-violeta.

Utilizando-se a banda a 521,00 nm que aparece no elemento de resolução nº 40 da máscara, e a banda a 574,75 nm que aparece no elemento de resolução nº 26, pode-se determinar que a faixa espectral acompanhada inicia-se em 440 nm (referente ao elemento nº 61) e estende-se até 671 nm (referente ao elemento nº 1).

Para que se pudesse certificar desta calibração, foram

obtidos espectros com a utilização de três filtros de interferência que possuem intensidades máximas em 500, 550 e 650 nm. Os espectros de intensidade com a utilização desses filtros são mostrados na figura 2.15. Os espectros concordam, dentro da resolução do instrumento, com a calibração efetuada com a solução de Cloreto de Neodímio, com o máximo obtido para 500 nm no elemento nº 46, para 550 nm no elemento nº 33 e para 650 nm no elemento nº 7.

Neste momento, é necessário estabelecer que a rede de difração permanece estática durante toda a aquisição do espectro, e a faixa espectral acompanhada é aquela que passa pelas máscaras, apesar da fonte de radiação poder emitir numa faixa maior, e do fotodiodo detectar uma maior faixa de comprimentos de onda.

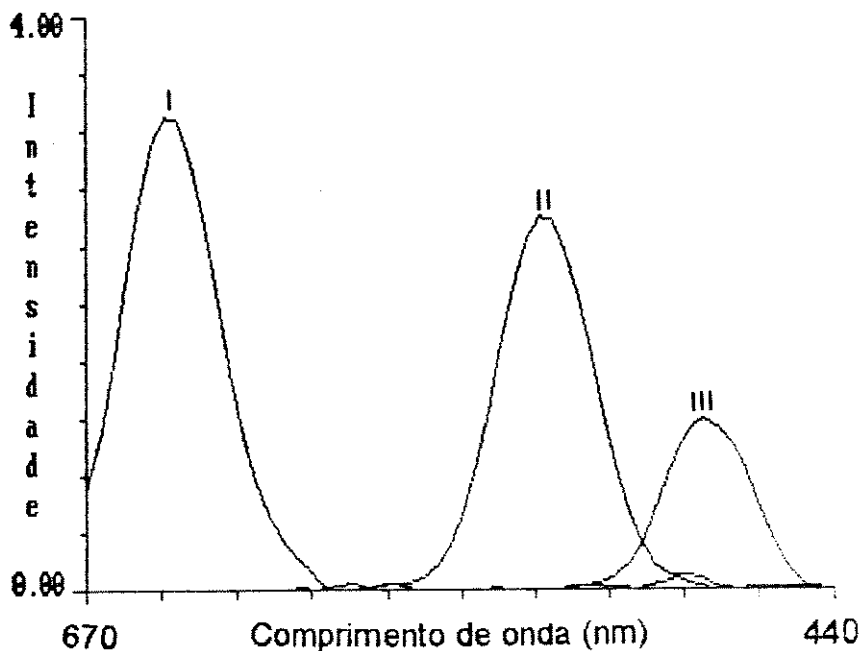


Figura 2.15. Espectros com a utilização de filtros de interferência com intensidades máximas em: I.650 nm, II.550 nm e III.500 nm. Dados de intensidade em unidades arbitrárias.

Medidas fotométricas

Foi avaliada a capacidade do instrumento desenvolvido em realizar medidas fotométricas, ou seja, em relacionar a absorção com a concentração de uma dada espécie em questão. Foram estudadas a linearidade na relação absorvância/concentração e a precisão nas medidas de absorvância.

A linearidade do instrumento foi avaliada a partir dos espectros de 5 soluções de KMnO_4 numa faixa de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$. A figura 2.16 mostra os espectros de absorvância obtidos, onde encontra-se uma relação linear ($r=0,9997$) entre a concentração de KMnO_4 e o valor máximo de absorvância, encontrado no elemento nº 41, que corresponde à 525 nm.

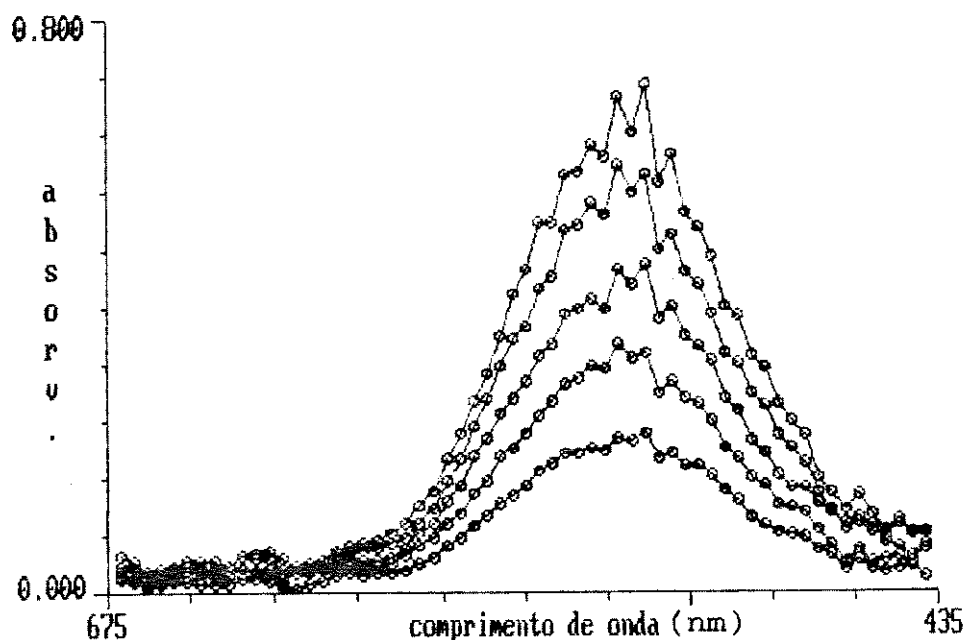


Figura 2.16. Espectros de absorvância de soluções de KMnO_4 com as seguintes concentrações : $5,00 \times 10^{-5} \text{ M}$; $7,50 \times 10^{-5} \text{ M}$; $1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$; $1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$; $1,50 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Além de avaliar a linearidade da curva analítica, também deve ser determinada a precisão nos dados fotométricos. Esta precisão representa a capacidade do sistema fotométrico em reproduzir o mesmo valor em determinações sucessivas da mesma amostra. O parâmetro utilizado para quantificar a precisão⁵⁹ foi o desvio padrão das medidas de absorvância.

A média e o desvio padrão de 10 medidas de absorvância consecutivas de uma solução de KMnO_4 $5,00 \times 10^{-4}$ M, tomando-se o valor máximo no espectro foi $0,250 \pm 0,003$ unidades, ou seja, um desvio padrão relativo de 1,2%. Este índice pode ser considerado dentro dos padrões normalmente encontrados nos espectrofotômetros comerciais, indicando a aplicabilidade do instrumento desenvolvido em determinações analíticas.

Resolução

Um parâmetro importante que deve ser obtido, e que determina a utilização prática do instrumento refere-se a sua resolução. Uma maneira para encontrar uma estimativa da resolução pode ser realizada a partir do fato que a faixa de comprimentos de onda analisada é de 231 nm (de 440 nm a 671 nm). Como uma máscara inteira tem 25,2 mm (63 elementos), pode-se chegar a conclusão que o espectro deve se espalhar a 9,17 nm/mm. Assim para um elemento (que representa uma fenda de saída e tem 0,4 mm) a resolução deve ser de 3,7 nm. Este valor, considerado limite e melhor valor possível nas condições atuais do instrumento, pode ser modificado pelos defeitos apresentados pelas máscaras e pela

necessidade do uso de *Filtros digitais* na obtenção de dados com maior precisão.

Velocidade na aquisição de espectros

O instrumento foi avaliado em termos do tempo de aquisição de espectros, utilizando-se um motor de corrente contínua para alterar a rotação do disco que contém as máscaras. Isto possibilitou a obtenção de tempos de aquisição de 30, 50, 100, 200, 300 e 600 ms. A figura 2.17 mostra os espectros de uma solução de KMnO_4 $1,00 \times 10^{-4}$ M para tempos de 30 ms, 50 ms e 600 ms.

Os espectros mostram que o limite na aquisição de um espectro completo com a presente eletrônica é de 50 ms. Como pode ser observado pela figura 2.17, o espectro torna-se extremamente distorcido quando obtido num tempo inferior a 50 ms. Por outro lado, para as velocidades de aquisição superiores, apresentam-se exatamente iguais. Para aquisições inferiores a 50 ms, não deve haver tempo suficiente entre duas leituras consecutivas para que o sinal possa ser manipulado e armazenado, ocasionando equívocos nas leituras das máscaras.

Nas aplicações posteriores, o espectrofotômetro foi configurado de modo a obter um espectro completo em 300 ms, utilizando-se o motor de passo, cuja velocidade de rotação é mais reprodutível que nos motores de corrente contínua, principalmente considerando-se a aplicação analítica a ser realizada que iria requerer uma alta reprodutibilidade no intervalo de tempo de aquisição dos espectros.

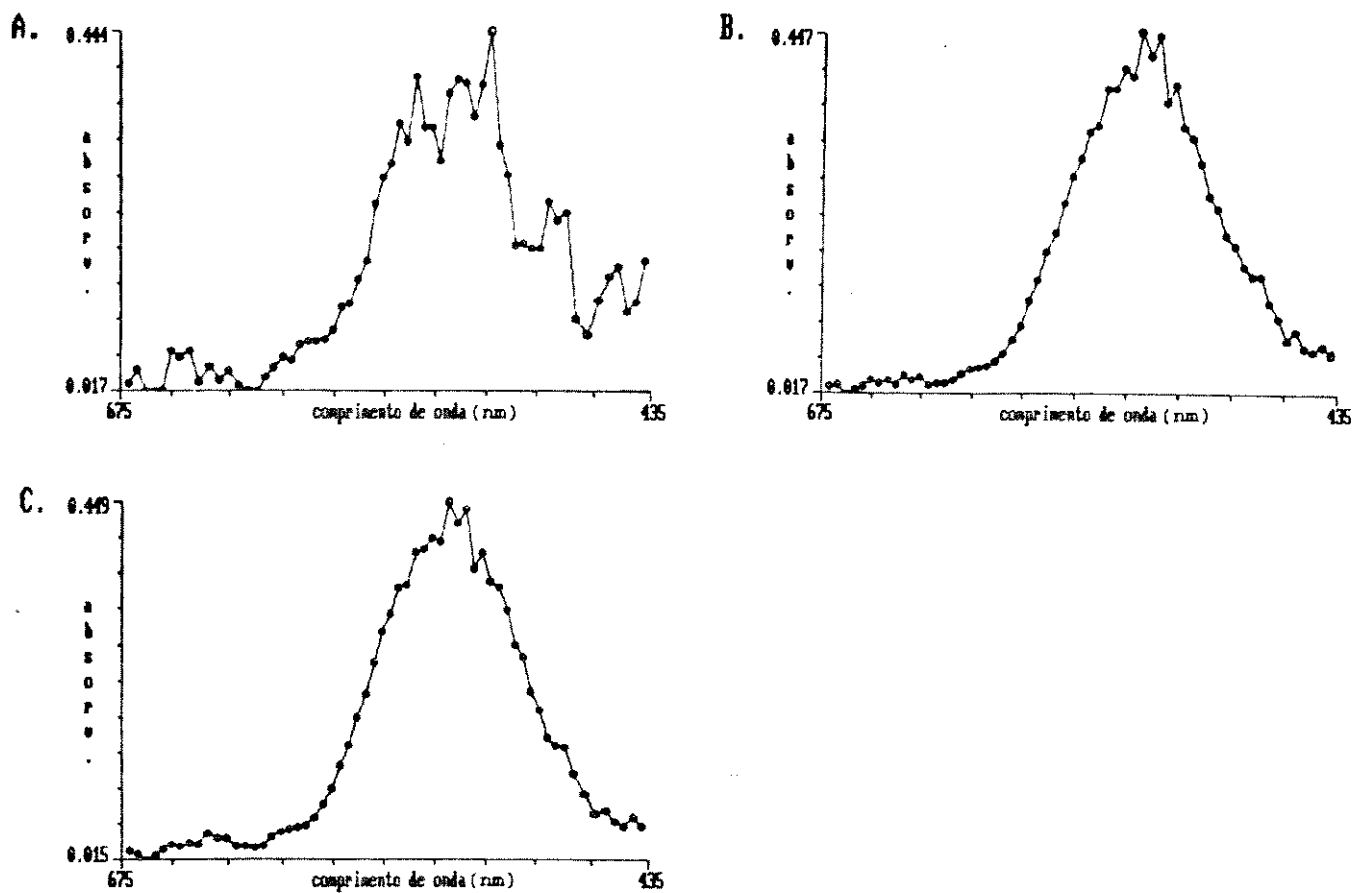


Figura 2.17. Espectros de absorvância de uma solução de KMnO_4 $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ obtidas com o espectrofotômetro construído. A. tempo de aquisição de 30 ms; B. tempo de aquisição de 50 ms; C. tempo de aquisição de 600 ms.

Capítulo 3

O ESPECTROFOTÔMETRO HADAMARD NA ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COMBINADA COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

3.1. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

A técnica de análise em fluxo contínuo denominada de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)* foi originalmente introduzida por *Ruzicka e Hansen* em 1975⁶⁰. Este processo analítico consiste na introdução de um volume discreto e reprodutível de uma amostra em um fluido carregador não segmentado que continuamente caminha em direção a um detector.

Devido as suas vantagens, como simplicidade na instrumentação, economia no consumo de amostra/reagentes, e velocidade de processamento, a Análise por Injeção em Fluxo teve rápida evolução. Diversos tipos de tratamentos da amostra, feitos em linha, como difusão gasosa^{61.62}, destilação isotérmica⁶³ e extração líquido-líquido⁶⁴ foram desenvolvidos, propiciando a adaptação da técnica a uma grande variedade de determinações rotineiras usualmente feitas de forma manual⁶⁵.

Os componentes básicos de um sistema para Análise por Inje-

* do inglês *Flow Injection Analysis*

ção em fluxo podem ser visualizados na figura 3.1, onde é mostrado um sistema de linha única, no qual o fluido carregador também contém os reagentes. O sistema é constituído de uma unidade para propulsão dos fluídos; um sistema para injeção da amostra; um micro-reator formado a partir dos condutos por onde os fluídos são transportados; e uma unidade para detecção.

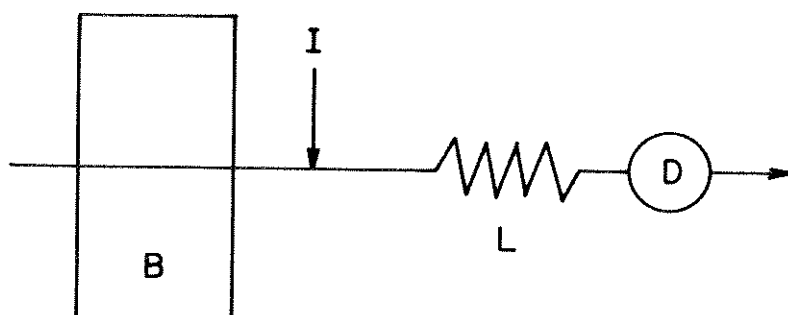


Figura 3.1. Componentes básicos de um sistema para Análise por Injeção em Fluxo. B. unidade de propulsão; I. sistema de injeção; L. micro-reator; D. unidade de detecção.

A análise por Injeção em Fluxo é uma combinação de três princípios básicos: injeção de uma amostra, dispersão controlada da amostra injetada e reprodutibilidade no tempo dos eventos que ocorrem desde a injeção até a chegada ao detector. Diferente de outros métodos, uma reação química ocorre enquanto a amostra injetada está dispersando no fluido carregador, isto é, enquanto um gradiente de concentração está sendo formado.

Uma zona de amostra homogênea com concentração C^0 , passando continuamente através de um detector apropriado num sistema de

Análise por Injeção em Fluxo deve fornecer um sinal cuja altura é proporcional à sua concentração, como mostrado na figura 3.2, à esquerda. Injetando esta amostra num fluido carregador que está em movimento, ocorre a formação de uma zona dispersa cuja forma depende da geometria do canal e da vazão. A curva de resposta tem agora um perfil que deve refletir a concentração da zona da amostra com o tempo, formando um gradiente de concentração contínuo, onde cada ponto corresponde uma determinada concentração, como mostrado na figura 3.2, à direita.

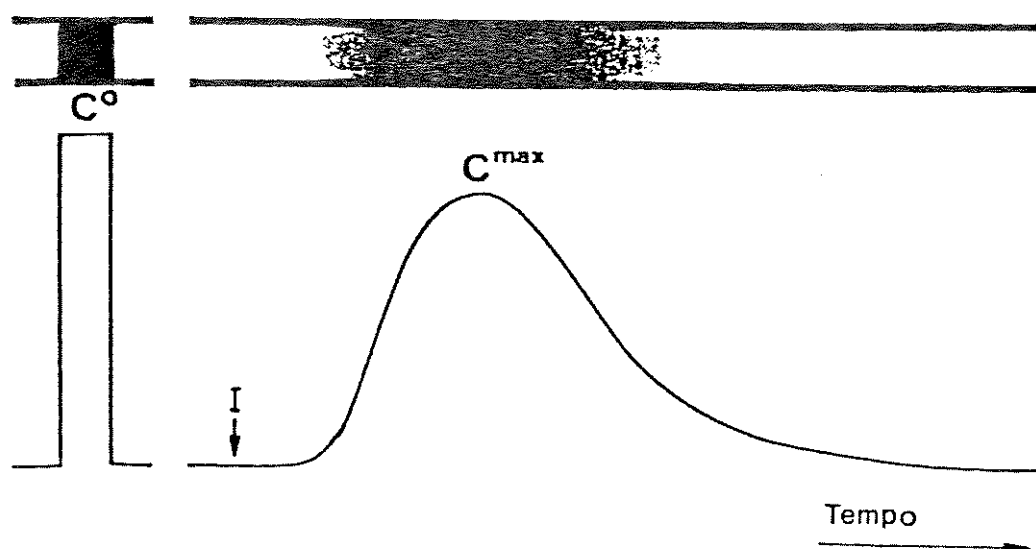


Figura 3.2. Perfil de uma zona de amostra e o sinal registrado, sem (à esquerda) e com (à direita) dispersão. O registro deve variar de uma forma quadrada (abaixo à esquerda), para um gradiente de concentração contínuo com máximo em C_{max} (abaixo à direita). I. Instante da injeção (Figura baseada em Hansen⁸⁸).

É possível visualizar esse contínuo como sendo formado por muitos elementos individuais do fluido, cada um apresentando uma determinada concentração C_1 da amostra.

Uma descrição quantitativa da dispersão pode ser realizada simplesmente pela relação entre a concentração original da amostra injetada C^0 , com sua concentração C_1 , após certo tempo da injeção, produzindo a relação : $D=C_1/C^0$. Quando C_1 corresponde à altura máxima obtida no sinal, D é denominado de *Coefficiente de Dispersão*⁶⁶.

O fenômeno da dispersão em FIA tem levado ao desenvolvimento de novas metodologias que dificilmente poderiam ser realizadas convencionalmente por métodos manuais, discretos automáticos⁶⁷ ou análise em fluxo contínuo segmentada⁶⁷.

A chamada *Titulação em Análise por Injeção em Fluxo*⁶⁸, foi a primeira aplicação desenvolvida dentre as técnicas baseadas no gradiente. Se uma amostra, por exemplo de um ácido, é injetada num fluxo carregador de uma base, a zona dispersa do ácido começará gradualmente a ser neutralizada pela base. Em ambos os lados da zona da amostra dispersa existem elementos do fluido carregador (a base) onde o ácido será neutralizado. Estes dois pontos de equivalência formam um par, com o mesmo valor de D , e sua distância (medida como um intervalo de tempo para um fluxo constante) aumentará com o aumento da concentração do ácido injetado ou com o decréscimo da concentração da base. Uma relação pode ser estabelecida entre esses intervalos de tempo e a concentração dos ácidos.

Foram também desenvolvidas técnicas de *Diluição por Gra-*

*diente*⁶⁸ e *Calibração por Gradiente*⁶⁹. Na primeira são realizadas leituras a determinados tempos pré-estabelecidos, a partir do máximo do pico, onde o processo de dispersão já causou diluição na amostra, evitando que diluições manuais sejam necessárias. A *Calibração por Gradiente* é uma extensão, onde a diluição causada pela dispersão é acompanhada por uma reação química, evitando que calibrações repetitivas sejam efetuadas.

A técnica de *Parada de Fluxo*^{*70} também tem sido utilizada em combinação com a *Diluição por Gradiente*⁶⁹, com o propósito de aumentar a sensibilidade das medidas através do aumento do tempo de residência, assim como medir a taxa da reação para servir de base para leituras posteriores.

Instrumentos que podem realizar uma varredura rapidamente** (ópticos ou eletroquímicos) também foram combinados com técnicas baseadas em gradientes^{71.72}, para promover um aumento da faixa de concentrações possíveis de serem detectadas numa única medida.

Técnicas de gradiente baseadas em *Zonas Coalescentes*^{***} têm sido desenvolvidas⁷³, onde gradientes de concentração são formados quando duas (ou mais) zonas de amostras são injetadas simultaneamente, produzindo curvas de resposta que podem ser completamente ou parcialmente superpostas. Este sistema tem servido de base para uma maneira econômica de introduzir reagentes em sistemas FIA⁷³, e para quantificar a extensão de inter-

*do inglês *stopped flow*

**do inglês *fast scanning*

***do inglês *merging zones*

ferentes em reações químicas⁷⁴.

Análise Multivariada em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo

A presença de um gradiente da amostra injetada na solução do reagente carregador faz com que se possa obter curvas de respostas complexas, cuja forma apresenta informações sobre as espécies presentes. Ao invés de um único pico, como normalmente encontrado, vários máximos e mínimos podem ser obtidos. Este princípio foi primeiro aplicado por *Betteridge e Fields*⁷⁵ que analisaram misturas binárias de íons complexos de metais, utilizando a dependência do pH na sua formação.

Um grande número de aplicações em FIA têm surgido com a utilização de detectores multicanais de varredura rápida, como os de *Arranjos Lineares de Diodos*⁷⁶. Esses detectores em sistemas de gradientes produzem superfícies complexas como resposta. Dados deste tipo requerem métodos mais sofisticados de interpretação baseados em técnicas quimiométricas, sem as quais, não seria possível obter informações úteis.

Com a ajuda de métodos multivariados no tratamento dos dados, a técnica da Análise por Injeção em Fluxo pode ser expandida, oferecendo a possibilidade de realizar determinações multicomponente, compensação de interferentes e detecção de amostras anômalas.

*Lukkari e Lindberg*⁷⁷ foram os primeiros a fazerem uso de gradientes de concentração e detectores de *Arranjos Lineares de Diodos* para determinação simultânea de ácidos orgânicos que

absorvem no ultravioleta, utilizando o *Método dos Mínimos Quadrados Parciais*.

Recentemente, foram determinados gradientes de pH e constantes de ácidos fracos utilizando um método quimiométrico denominado de *Evolução de Análise de Fatores**⁷⁸ e detectores multicanais.

O termo *Quimiografia em Fluxo* foi introduzido por Kowalski, Ruzicka e Christian¹¹ para descrever as técnicas como Análise por Injeção em Fluxo e Cromatografia⁷⁹, que podem apresentar, com o uso do microcomputador e detectores multicanais, a informação obtida na forma de uma imagem ou superfície. Esses autores defendem o emprego dessas técnicas juntamente com o uso de métodos quimiométricos como o *Método dos Mínimos Quadrados Parciais* e o *Método Generalizado de Aniquilação de Ordens***⁸⁰, na determinação simultânea de espécies na presença de interferentes, e no ensino da química de uma forma mais moderna.

3.2. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Os dados químicos multivariados podem ser arranjados na forma de uma tabela de dados, onde *objetos* são dispostos em linhas e *variáveis* em colunas. Os *objetos* frequentemente são compostos químicos, e as *variáveis* valores de concentração, pH, condutividade, tempos em sistemas de fluxo, alturas (ou áreas) de espectros ou picos cromatográficos.

*do inglês *Evolving Factor Analysis*

**do inglês *Generalized Rank Annihilation Method*

A tabela de dados pode ser representada como uma matriz, do tipo mostrado na figura 3.3, com n linhas e p colunas, onde o elemento da matriz x_{ki} , indica o valor do k -ésimo objeto e da i -ésima variável.

A notação normalmente empregada em álgebra linear e utilizada pelos principais autores de textos sobre *quimiometria*^{3,12} será aqui utilizada. Letras maiúsculas em negrito representarão matrizes, e letras minúsculas também em negrito vetores (linhas ou colunas de matrizes). As letras minúsculas normais representarão escalares, que podem ser elementos de matrizes (a_{ij}), de vetores (a_j) ou constantes (a). A transposta de uma matriz ou vetor será representado por um superescrito "T", como por exemplo $\mathbf{x}^T$. A operação da transposição é dada pela troca das linhas pelas colunas.

É possível estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados $\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}$, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. A forma de estabelecer essa relação é a base da *Calibração Multivariada*¹².

		variáveis →		
		1	i	p
O b j e t o s ↓	1	x_{11}	x_{1i}	x_{1p}
	k	x_{k1}	x_{ki}	x_{kp}
	n	x_{n1}	x_{ni}	x_{np}

Figura 3.3. A matriz de dados químicos.

A *Calibração Multivariada* consiste basicamente de duas fases: a *calibração* e a *previsão*.

Na *fase de calibração*, tomando como exemplo o caso das titulações a serem estudadas neste trabalho, n amostras de misturas de ácidos são tituladas, e p tempos são medidos a diferentes valores de pH. É obtida uma matriz X , com p colunas e n linhas, das curvas correspondentes às amostras com composição conhecida, e uma matriz Y , com q colunas e n linhas, das concentrações conhecidas dos q ácidos presentes na mistura. A matriz X forma o *Bloco das variáveis independentes*, enquanto a matriz Y o *Bloco das variáveis dependentes*. Os dados utilizados nesta etapa constituem o *Conjunto de Treinamento*.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado que melhor possa reproduzir Y a partir dos dados da matriz X . Esse modelo é utilizado na *fase de previsão* para estimar as concentrações dos constituintes de novas amostras, a partir de suas curvas de titulação. Os dados utilizados nesta fase formam o *Conjunto Teste*.

Os dados para a *Calibração Multivariada* podem ser organizados conforme mostrado na figura 3.4.

Muitas vezes, antes que o modelo seja desenvolvido, é conveniente tratar os dados de modo a tornar os cálculos computacionais melhor condicionados. Normalmente, o primeiro passo envolve um *escalonamento*^{B1} fazendo com que cada variável tenha a mesma influência no estágio inicial dos cálculos. Esta operação é realizada pela divisão de todos os termos de uma certa variável pelo seu desvio padrão, de forma que a *variância* torna-se unitá-

ria. Isso assegura que as influências relativas das diferentes variáveis sobre os cálculos sejam independentes das suas unidades, já que passam a ser expressas em unidades de desvio padrão. Os dados também podem ser *centrados na média*⁸¹, que corresponde a fazer com que, para cada variável, seus valores tenham média zero. Durante toda a descrição dos métodos matemáticos que serão discutidos a seguir, assume-se que as variáveis tem média zero.

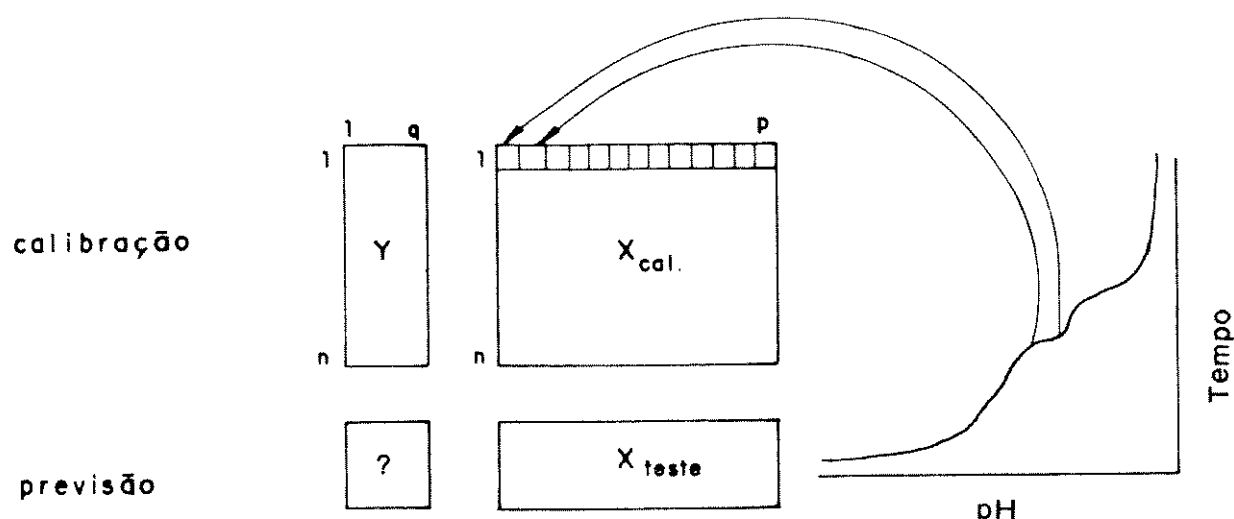


Figura 3.4. Organização dos dados para a Calibração Multivariada.

Métodos de Calibração Multivariada tem sido cada vez mais utilizados em química analítica¹⁰, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade. Dentre esses métodos, há um enorme destaque ao *Método dos Mínimos Quadrados Parciais* (PLS)*, que vem ganhando importância devido principalmente à simplicidade do algoritmo e excelente poder de

*do inglês *Partial Least Squares*

previsão.

Serão mostrados, a seguir, tópicos básicos a respeito da *Análise de Componentes Principais* e da *Regressão de Componentes Principais* que são necessários para um entendimento do PLS. Não é pretensão fornecer um tratamento completo destes tópicos, e para maiores informações serão referenciados textos mais abrangentes. As bases do PLS serão formuladas, assim como o algoritmo utilizado na construção do programa utilizado nas aplicações descritas neste trabalho.

Análise de Componentes Principais

A *Análise de Componentes Principais* (PCA)* foi introduzida na química por *Malinowski* no final dos anos 60, com o nome de *Análise de Fatores***, e a partir da década seguinte um grande número de aplicações foram desenvolvidas^{10.82.83}, o que a tornou muito conhecida e explorada.

Os principais objetivos desta técnica são o de encontrar relações entre *objetos*, e como classificá-los de acordo com suas similaridades. Associado a isto, está a detecção de amostras anômalas, que não devem pertencem a nenhuma das categorias conhecidas. Outro objetivo importante é a redução de dados, que torna-se muito útil quando grandes quantidades de informações necessitam ser manipuladas.

Serão abordadas apenas as partes fundamentais do PCA,

*do inglês *Principal Component Analysis*

**do inglês *Factor Analysis*

maiores detalhes podem ser encontrados em *S. Wold et al*⁸⁴ e *Kowalski*⁸⁵.

A *Análise de Componentes Principais* consiste na aproximação de uma tabela de dados, uma matriz X , em termos da soma de várias matrizes M_i , que não podem mais ser expandidas. As matrizes M_i constituem os chamados *Componentes Principais*, e são formadas pelo produto de dois vetores, t (os *scores*) e p (os *loadings*) :

$$X = M_1 + M_2 + \dots + M_a \quad (3.1)$$

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_a p_a^T \quad (3.2)$$

$$X = T P^T \quad (3.3)$$

para a componentes principais.

Uma representação gráfica, dessas matrizes é mostrada na figura 3.5.

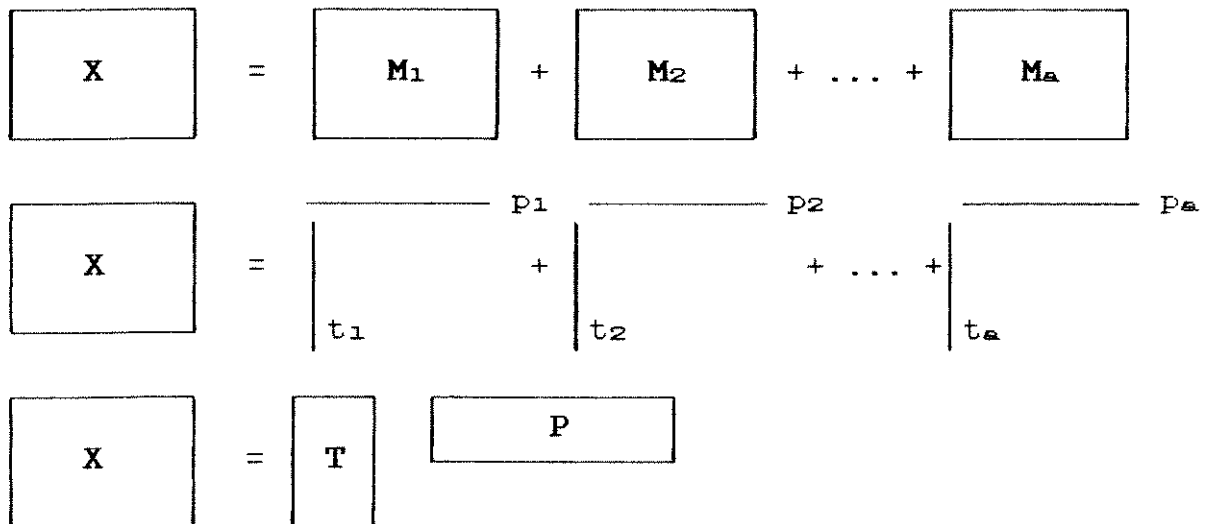


Figura 3.5. Representação gráfica do PCA.

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em X , ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes M_i

necessárias para descrever X , o que corresponde ao número de colunas em T , ou linhas em P . Assim, se for possível descrever uma matriz X , que tenha muitas variáveis, por um número pequeno dessas matrizes M_i , haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação.

Um operador deve ser encontrado que projete as colunas de X em uma única dimensão (um vetor), fazendo com que cada uma das colunas passe a ser representada por um escalar. Também se faz necessário um operador que projete as linhas de X em uma única dimensão e torne cada linha um escalar. Isso produz os *loadings* no primeiro caso, e os *scores* no segundo, como pode ser visto na figura 3.6.

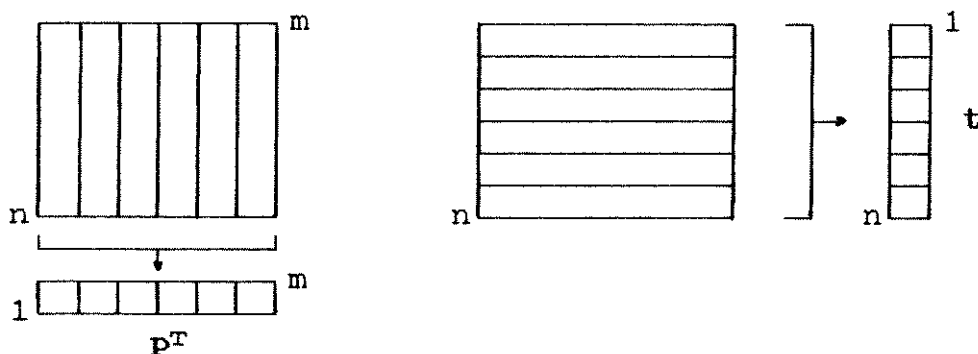


Figura 3.6. *Scores* (t) e *loadings* (p^T) são obtidos pela projeção de X em vetores. *Loadings*: cada coluna de X é projetada em um elemento de um vetor p^T . *Scores*: cada linha de X é projetada em um elemento de um vetor t .

Os vetores t e p são ortogonais entre si, ou seja, $p_i^T p_j = 0$ e $t_i^T t_j = 0$ para $i \neq j$.

Um método muito utilizado para essas transformações é o

NIPALS*, desenvolvido por *H. Wold*⁸⁸. Caracteriza-se por ser um processo iterativo, onde inicialmente t_1 e p_1^T são calculados, e o produto $t_1 p_1^T$ é subtraído de X , obtendo-se uma matriz residual E . Essa matriz residual é examinada, e se for muito pequena, quando comparada ao erro experimental, o processo cessa. Se não, calcula-se novos t_2 e p_2^T a partir da matriz E . O processo é repetido quantas vezes forem necessárias, até que a matriz de resíduos possa ser desprezada.

O algoritmo NIPALS pode ser escrito como:

(1) $h=1$

(2) pegue um vetor x_j de X e chame-o de t_h : $t_h = x_j$ (3.4)

(3) calcule p_h^T : $p_h^T = t_h X / t_h^T \cdot t_h$ (3.5)

(4) normalize p_h^T : $p_h^T = p_h^T / \| p_h^T \|$ (3.6)

(5) calcule t_h : $t_h = X p_h / p_h^T \cdot p_h$ (3.7)

(6) compare t_h usado no passo (3) com o obtido no passo (5). Se forem iguais, dentro do erro experimental, pare (a interação convergiu). Se forem diferentes, volte ao passo (3).

(7) Após a interação convergir, são calculados os erros:

$$E_h = E_{h-1} - t_h p_h^T \quad (\text{para } h=1, X=E_0) \quad (3.8)$$

Se os erros forem desprezíveis pare (a matriz X já foi descrita). Se ainda forem altos volte ao passo (2), para o cálculo do próximo componente, fazendo $X=E_h$ e $h=h+1$.

**Nonlinear Iterative Partial Least Squares* (Mínimos Quadros Parciais iterativos não-lineares)

Regressão de Componentes Principais

Este método de *Calibração Multivariada* consiste em inicialmente aplicar a *Análise de Componentes Principais* à matriz de variáveis independentes $\mathbf{X}$, resultando na representação dos objetos (linhas de $\mathbf{X}$) como sua matriz de *scores* $\mathbf{T}$, formando um novo conjunto de variáveis independentes.

Numa segunda etapa, utiliza-se a *Regressão Linear Múltipla*⁸⁷ para estabelecer a relação entre o bloco das variáveis dependentes, a matriz $\mathbf{Y}$, e a matriz de *scores* $\mathbf{T}$, o novo bloco de variáveis independentes. A fórmula para a *Regressão Linear Múltipla* pode ser estabelecida como :

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}\mathbf{B} + \mathbf{E} \quad (3.9)$$

e a solução para os coeficientes de regressão baseado no método dos mínimos quadrados é :

$$\mathbf{B} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^T\mathbf{Y} \quad (3.10)$$

A *Regressão de Componentes Principais* resolve dois problemas muito comuns à técnica da *Regressão Linear Múltipla*. A primeira relaciona-se ao fato que a inversão de $(\mathbf{T}^T\mathbf{T})$ pode ser realizada devido à ortogonalidade dos *scores*. Muitas vezes, existem altas correlações nos dados originais e a inversa de $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$ pode não existir, e mesmo que exista os valores estimados podem ter erros muito grandes.

O segundo problema relaciona-se ao fato que o número de variáveis independentes não pode ser maior que o número de amostras. Utilizando-se um pequeno número de *scores* no lugar da grande quantidade de variáveis originais, é possível estabelecer a modelagem com um menor número de amostras.

Na *Regressão de Componentes Principais*, uma das etapas fundamentais está na escolha correta do número de componentes principais (número de variáveis independentes) existindo o risco da perda de informações com a utilização de um número insuficiente. Por outro lado, o emprego de um número maior que o necessário só introduz ruídos na modelagem.

Este método ignora toda a informação contida na matriz *Y* quando a *Análise de Componentes Principais* é realizada na matriz *X*. O bloco das variáveis dependentes só é utilizado numa segunda fase, quando os componentes principais já foram determinados. Maiores detalhes à respeito da *Regressão de Componentes Principais* podem ser encontrados em *Mardia et al*⁸⁸.

O Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os primeiros trabalhos com a utilização do PLS em química foram realizados no início dos anos 80 pelos grupos de *S. Wold* e *H. Martins*⁸⁹. Alguns trabalhos⁹⁰ indicam que ele é uma boa alternativa aos mais clássicos *Regressão Linear Múltipla* e *Regressão de Componentes Principais*, pois os parâmetros do modelo não mudam muito quando diferentes amostras são utilizadas na calibração. Também possui vantagens na programação, pois seu algoritmo é

relativamente curto e fácil de ser implementado. É baseado numa extensão do algoritmo NIPALS, que decompõe a matriz de dados em uma soma do produto de dois vetores.

O algoritmo a ser mostrado, assim como toda a teoria, está baseado num trabalho de *Geladi e Kowalski*⁹¹. Entretanto, existem outras formulações para o PLS^{92,93}, cada qual tendo suas vantagens para uma determinada aplicação em particular.

Neste trabalho foi desenvolvido um programa em linguagem QuickBasic 4.5 baseado nesse algoritmo⁹¹. Os subprogramas mais importantes, como aquele para a modelagem e para a previsão são mostrados no Apêndice 7. Estes subprogramas foram acrescentados ao programa geral de controle do espectrofotômetro *Hadamard* de modo a ser possível realizar os cálculos diretamente a partir dos dados obtidos no instrumento, sem a necessidade da transferência de arquivos, poupando trabalho e tempo.

Construção do Modelo

No PLS tanto a matriz das variáveis independentes X , como a das variáveis dependentes Y são representadas pela *Análise de Componentes Principais* :

$$X = TPT^T + E \quad (3.11)$$

$$Y = UQT^T + F \quad (3.12)$$

Uma relação entre os dois blocos pode ser realizada correlacionando-se os *scores* para cada componente de cada vez, utilizando-se um modelo linear :

$$u_n = b_n t_n \quad (3.13)$$

onde :

$$b_h = \mathbf{u}_h^T \mathbf{t}_h / \mathbf{t}_h^T \mathbf{t}_h \quad (3.14)$$

para cada $h=1,2,\dots,a$, componentes principais.

Esse modelo, entretanto não é o melhor possível. Isto porque a *Análise de Componentes Principais* é realizada em cada matriz separadamente, podendo resultar numa relação não muito satisfatória (não linear) entre os *scores* dos dois blocos. Deve-se buscar um modelo onde as matrizes de resíduos **E** e **F** sejam as menores possíveis e, ao mesmo tempo, conseguir uma relação linear entre **t** e **u**.

No PLS isto é realizado por uma leve mudança nos valores dos *scores*, de forma a produzir a melhor relação possível. Há uma fusão das modelagens do algoritmo NIPALS para os dois blocos, sendo porém alterados os *scores* nos passos iniciais.

Um algoritmo para o PLS pode agora ser apresentado:

(1) $h=1$

$$(2) \mathbf{u}_{\text{inicial}} = \text{algum } \mathbf{y}_1 \quad (3.15)$$

$$(3) \mathbf{p}^T = \mathbf{u}^T \mathbf{X} / \mathbf{u}^T \mathbf{u} \quad (\mathbf{w}^T = \mathbf{u}^T \mathbf{X} / \mathbf{u}^T \mathbf{u}) \quad (3.16)$$

$$(4) \mathbf{p}^T = \mathbf{p}^T / \|\mathbf{p}^T\| \quad (\mathbf{w}^T = \mathbf{w}^T / \|\mathbf{w}^T\|) \quad (3.17)$$

$$(5) \mathbf{t} = \mathbf{X} \mathbf{p} / \mathbf{p}^T \mathbf{p} \quad (\mathbf{t} = \mathbf{X} \mathbf{w} / \mathbf{w}^T \mathbf{w}) \quad (3.18)$$

$$(6) \mathbf{q}^T = \mathbf{t}^T \mathbf{Y} / \mathbf{t}^T \mathbf{t} \quad (3.19)$$

$$(7) \mathbf{q}^T = \mathbf{q}^T / \|\mathbf{q}^T\| \quad (3.20)$$

$$(8) \mathbf{u} = \mathbf{Y} \mathbf{q} / \mathbf{q}^T \mathbf{q} \quad (3.21)$$

(9) Compare **t** no passo (5) com aquele da interação anterior. Se forem iguais, dentro do erro experimental, pare (a interação convergiu). Se não, volte ao passo (3).

Se o bloco **Y** tiver apenas uma variável, os passos 6-8 podem

ser omitidos fazendo $q = 1$.

Ainda há um problema, o algoritmo não produz valores de t ortogonais. A razão é que a ordem dos cálculos que foi usada para a *Análise de Componentes Principais* foi alterada. Para contornar esse problema, os p 's são mudados por pesos w 's (colocados entre parênteses acima).

Um cálculo extra é então incluído, após a convergência, para tornar os t 's ortogonais:

$$(10) \quad p^T = t^T X / t^T t \quad (3.22)$$

Com $p^T = p^T / \|p^T\|$ é possível calcular o novo valor de t : $t = Xp / p^T p$, mas isto por sua vez é apenas uma multiplicação escalar pela norma de p^T dado no passo (10) :

$$(11) \quad t = t \|p^T\| \quad (3.23)$$

Valores de t ortogonais não são absolutamente necessários, mas são importantes se relações entre variáveis também devem ser obtidas. Deve ser dado o mesmo escalonamento para os pesos w , de modo a tornar a previsão correta :

$$(12) \quad w = w \|p^T\| \quad (3.24)$$

Os valores de p^T , q^T e w^T são utilizados na previsão, e t e u para diagnóstico e/ou propósitos de classificação. A seguir, é encontrado o coeficiente de regressão b :

$$(13) \quad b = u^T t / t^T t \quad (3.25)$$

Numa etapa final são encontrados os resíduos para cada componente principal. Para o bloco X :

$$(14) \quad E_h = E_{h-1} - t_h p_h, \quad X = E_0 \quad (3.26)$$

Para o bloco Y : $F_h = F_{h-1} - u_h q_h^T$, $Y = F_0$, onde u_h pode ser trocado pela sua estimativa : $u_h = b_h t_h$ e uma relação mista é

obtida :

$$(15) \mathbf{F}_h = \mathbf{F}_{h-1} - \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \mathbf{q}_h^T. \quad (3.27)$$

(16) A partir dos valores dos resíduos, pode-se voltar ao passo (2) para a implementação do procedimento para o próximo componente fazendo $h=h+1$, ou então parar. Após o primeiro componente, $\mathbf{X}$ nos passos 3,5, e 10 e $\mathbf{Y}$ nos passos 6 e 8 são trocados por suas correspondentes matrizes residuais $\mathbf{E}_h$ e $\mathbf{F}_h$.

Previsão

Na etapa da previsão, são utilizados os $\mathbf{p}^T$, $\mathbf{q}^T$, $\mathbf{w}^T$ e $\mathbf{b}$ calculados na *Fase de Calibração* para cada componente. Uma matrix $\mathbf{X}_t$ é formada a partir das amostras desconhecidas. Os parâmetros $\mathbf{t}_t$ (*scores*) são calculados pelo ajuste de $\mathbf{X}_t$ para $\mathbf{w}^T$:

$$(17) \mathbf{t}_t = \mathbf{X}_t \mathbf{w}^T \quad (3.28)$$

A partir dos coeficientes de regressão $\mathbf{b}$, os *scores* $\mathbf{t}_t$ produzem uma estimativa da matriz das concentrações, já que :

$$(18) \mathbf{Y} = \mathbf{t}_t \mathbf{b} \mathbf{q}^T \quad (3.29)$$

3.3. TITULAÇÕES DE MISTURAS DE ÁCIDOS

Após a construção do espectrofotômetro Hadamard e todos os testes para estabelecer suas características principais, foi desenvolvida uma aplicação analítica deste instrumento. O espectrofotômetro foi utilizado como unidade de detecção num sistema FIA para titulações de misturas de ácidos, devido à possibilidade de adquirir um espectro completo na região visível rapidamente.

Nas titulações ácido-base de misturas de ácidos fracos, principalmente com pK_a 's próximos, é difícil a detecção dos pontos finais. Recorre-se, então, a ajustes dos dados experimentais a equações dos equilíbrios envolvidos⁹⁴. Esses métodos requerem valores muito exatos dos parâmetros utilizados, como constantes de equilíbrio e força iônica. A *Calibração Multivariada* surge como uma alternativa, podendo resolver alguns desses problemas, já que nenhum parâmetro físico-químico necessita ser conhecido ou determinado.

Misturas de ácidos fracos foram titulados pela metodologia potenciométrica clássica, com os dados tratados por *Métodos de Calibração Multivariada*, obtendo-se excelentes resultados⁹⁵. Por outro lado, é necessário que as amostras a serem analisadas tenham matrizes semelhantes às utilizadas na *Fase de Calibração*. Fatores externos devem ser mantidos constantes ou sob controle.

Os métodos multivariados exigem que um grande número de dados sejam obtidos para a construção do modelo. Neste ponto, as técnicas automáticas como a *Análise por Injeção em Fluxo*, apresentam-se como ferramentas muito úteis, tornando a titulação mais simples, rápida e reprodutível. A conexão de titulações em sistemas FIA com métodos multivariados, principalmente a *Calibração Multivariada*, parece ser muito atrativa, principalmente levando-se em conta a enorme demanda de determinações de ácidos fracos em química alimentícia, ambiental e agrícola.

Rotineiramente as medidas de pH são realizadas potenciometricamente com um eletrodo de vidro. Em sistemas FIA, principalmente em titulações, é necessário acompanhar a variação do pH

mais rapidamente, e os eletrodos de vidro não podem ser utilizados, devido a resposta mais lenta.

Medidas espectrofotométricas de pH na presença de indicadores ácido-base, apesar de não serem comuns, sob condições ótimas podem ser tão precisas quanto a potenciometria⁹⁶. É utilizada em situações onde os eletrodos de vidro não apresentam bons resultados, como para medidas rápidas, em locais inacessíveis ou ambientes muito corrosivos.

Recentemente, foi relatada a utilização de uma mistura de indicadores para acompanhar titulações em fluxo contínuo de misturas de ácidos⁹⁷. Neste trabalho, um aumento linear na vazão do fluxo de uma solução alcalina é realizada, para gerar curvas de titulação similares às clássicas. Os dados são tratados da maneira convencional, procurando-se os pontos finais nas curvas de titulação. Também titulações de misturas de ácidos, que absorvem na região do ultravioleta, em sistemas FIA foram realizadas, utilizando *Métodos de Calibração Multivariada* para tratar os dados gerados por um detector multicanal⁷⁷. A necessidade de ácidos cujas formas ácida e/ou básica absorvam no ultravioleta, impõe certa limitação a esta metodologia.

A presente aplicação está baseada na titulação de misturas de ácidos num sistema FIA na presença de uma mistura de indicadores ácido-base que absorvem na região do visível. A variação do pH é acompanhada pela mudança nas formas ácida e básica dos indicadores, a partir dos seus espectros de absorvância. *Métodos de Calibração Multivariada*, baseados no PLS, são utilizados no tratamento dos dados, para a redução de variáveis e quantificação

dos ácidos individuais presentes.

3.4. SISTEMA FIA UTILIZADO NAS TITULAÇÕES

A figura 3.7 mostra um diagrama básico do sistema FIA empregado nas titulações, apresentando o espectrofotômetro Hadamard desenvolvido como unidade de detecção.

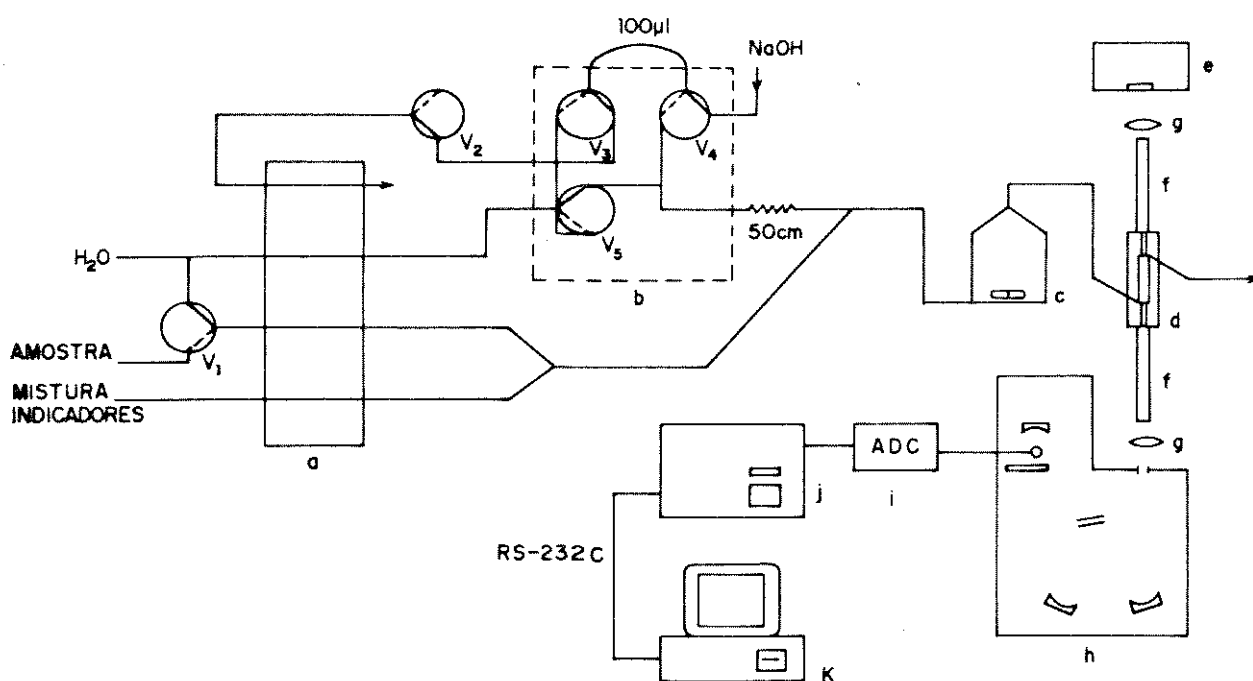


Figura 3.7. Diagrama do Sistema FIA para titulações espectrofotométricas ácido-base. **a.** bomba peristáltica; **b.** módulo de injeção; **c.** câmara de mistura; **d.** cela de fluxo; **e.** fonte de luz; **f.** fibras ópticas; **g.** lentes convergentes; **h.** espectrofotômetro Hadamard; **i.** conversor analógico-digital; **j.** sistema mínimo TSI 1020; **k.** Microcomputador IBM PC-AT.

v₁ - v₅ : válvulas eletromecânicas.

Fundamentalmente, o sistema é constituído de uma bomba peristáltica multicanal (Ismatec MP-13R), com vazões iguais em todas as linhas, que dependeram da titulação efetuada. Microválvulas eletromecânicas de 3 vias (NRResearch) são empregadas na seleção dos fluídos reagentes (válvula v_1 na figura 3.6) e na confecção da unidade de introdução da amostra^{BB} (válvulas $v_2 - v_5$ na figura 3.6). A radiação de uma fonte halógena é guiada para uma cela de fluxo (1,0 cm de caminho óptico), e desta para a entrada do espectrofotômetro Hadamard por cabos de fibra óptica (REICHENBACH - Instrumentos e Fibra Óptica Ltda.) de 50 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro. Uma câmara de dispersão^{BB} com agitação magnética e volume de 1,5 mL é utilizada para gerar um gradiente de concentração da espécie injetada.

A unidade de introdução da amostra e a outra válvula são controladas pelo sistema mínimo de microcomputador TSI 1020. As rotinas em ASSEMBLER-8085 desenvolvidas para o controle do sistema FIA encontram-se listadas no Apêndice 4.

Para as titulações efetuadas, o intervalo entre cada aquisição de um espectro nunca foi inferior a um segundo. Desta forma, o microcomputador externo e o sistema mínimo que controla o espectrofotômetro podem trabalhar em paralelo. Enquanto um novo espectro está sendo adquirido sob controle do sistema mínimo (esta operação leva cerca de 0,3 segundos quando o motor de passo é utilizado para movimentar o disco que contém as máscaras), o microcomputador externo pode realizar os cálculos necessários para recuperar o espectro (transformada de Hadamard), e armazená-los no disco para utilização posterior.

Quando em operação, a amostra (mistura de ácidos) flui continuamente, e merge com a solução da mistura de indicadores ácido-base. Sob controle do microcomputador um volume definido de uma solução alcalina é injetada, chegando até um ponto de confluência, coalescendo com a mistura amostra/indicadores. Essa solução passa então pela câmara de dispersão, onde um gradiente alcalino é gerado.

Os ácidos presentes são sequencialmente titulados, e as mudanças nos espectros de absorção dos indicadores, que refletem o pH da solução a cada instante, podem ser acompanhadas pelo espectrofotômetro Hadamard. Os tempos para o início e final da aquisição dos dados, foram determinados a partir de injeções de soluções de KMnO_4 no sistema com água destilada nas linhas, para que se pudesse obter o perfil da dispersão. Foram escolhidos tempos para o início da aquisição dos espectros após o máximo de concentração no perfil obtido, e o final do monitoramento foi estabelecido para um tempo onde não havia mais a espécie injetada na linha. A figura 3.8 mostra um perfil de concentração de uma espécie injetada, e os tempos utilizados nas titulações.

São obtidas superfícies absorvância *versus* tempo *versus* comprimento de onda. Foi desenvolvido um programa específico em QuickBasic 4.5 para a visualização das superfícies obtidas, que se encontra listado no Apêndice 8. Essas superfícies são transformadas em curvas bidimensionais absorvância x tempo, ou pH x tempo, devido à grande quantidade de dados, que não poderiam ser manipulados no microcomputador IBM PC-AT utilizado. A partir dessas curvas é que são realizados os cálculos com o PLS.

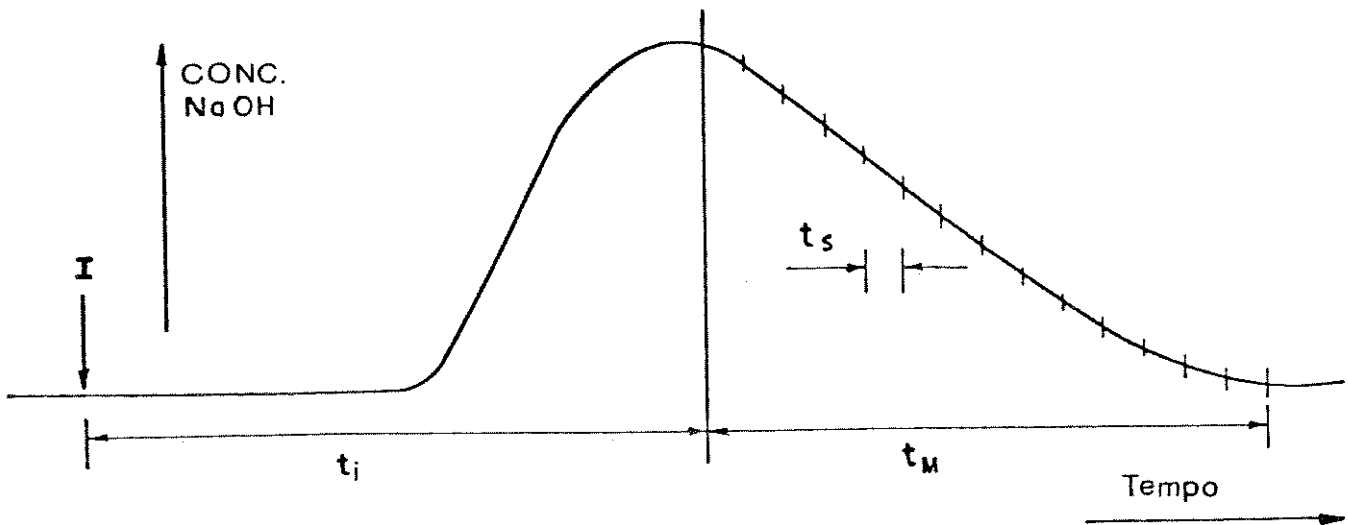


Figura 3.8. Perfil de concentração gerado no sistema FIA, e os tempos utilizados nas titulações. I.instante da injeção; t_i .intervalo de tempo para o início da aquisição dos espectros; t_m . intervalo de tempo total da aquisição dos dados; t_s .intervalo de tempo entre cada aquisição dos espectros.

Foram tituladas misturas de um ácido forte (Ácido Clorídrico) e um fraco (Ácido Acético), e misturas de dois ácidos fracos: cítrico/tartárico e acético/benzóico.

3.5. TITULAÇÃO DE MISTURAS DOS ÁCIDOS CLORÍDRICO E ACÉTICO UTILIZANDO MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Experimental

Nas titulações simultâneas dos ácidos clorídrico e acético, foi utilizada uma mistura de dois indicadores: Verde de Bromocre-

sol (pH de transição entre 3,5-5,4) e Fenolftaleína (pH de transição entre 8,0-10,0). As concentrações dos indicadores foram ajustadas para que a absorvância máxima obtida no sistema FIA não ultrapassasse 1,00 unidade de absorvância.

A vazão do sistema FIA foi estabelecida em 1,0 mL/min., sendo adquiridos 55 espectros a intervalos de tempos de 1,0 segundo. O início da coleção dos espectros foi estabelecido à 65 segundos após a injeção. Foram injetados 100 μ L de uma solução de NaOH 0,75 M isenta de Carbonato para produzir o gradiente alcalino.

Foram preparadas 12 soluções de misturas dos ácidos clorídrico e acético com concentrações na faixa de $1,25 \times 10^{-3}$ M à $5,00 \times 10^{-3}$ M, sendo 8 delas para serem utilizadas na etapa da construção do modelo, na *fase de treinamento*, e outras 4 para testar a capacidade de previsão do modelo desenvolvido.

Pré-processamento dos dados

As superfícies absorvância x tempo x comprimento de onda obtidas para titulações de 2 misturas dos ácidos são similares àquelas mostradas na figura 3.9.

As superfícies refletem os estágios da titulação, sendo possível observar onde a titulação do ácido acético começa, com o Verde de Bromocresol mudando de cor, de amarelo para azul, refletindo no seu espectro de absorção com máximo ao redor de 600 nm, e onde a titulação termina, assinalada pela mudança abrupta na cor da Fenolftaleína, de incolor para rosa, cujo espectro

aparece ao redor de 550 nm.

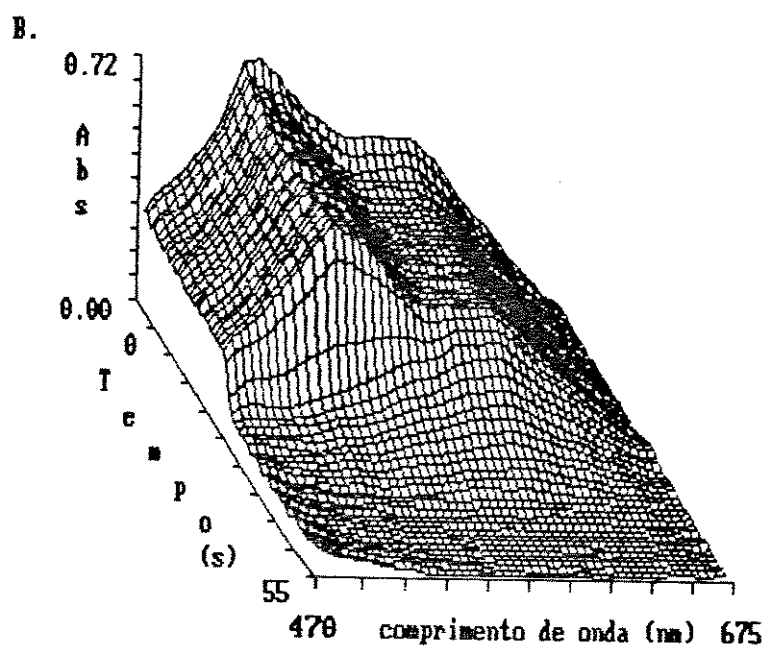
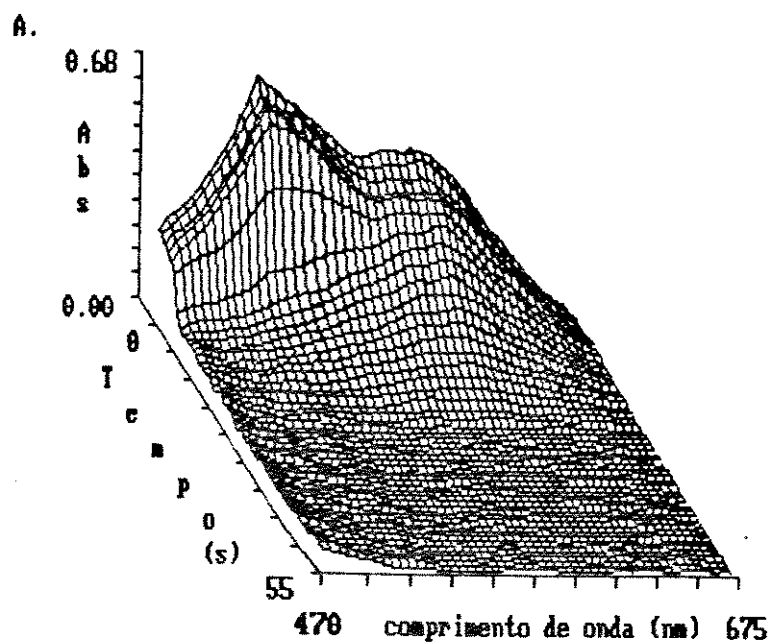


Figura 3.9. Superfícies absorvância x tempo x comprimento de onda para a titulação da mistura dos ácidos clorídrico e acético.

A. ácido clorídrico $5,00 \times 10^{-3}$ M e ácido acético $5,00 \times 10^{-3}$ M.

B. ácido clorídrico $2,50 \times 10^{-3}$ M e ácido acético $2,50 \times 10^{-3}$ M.

As superfícies inteiras poderiam ser, a princípio, utilizadas na modelagem como proposto por *Wold et al*¹⁰⁰. Para diminuir a quantidade de dados e o tempo de processamento, cada superfície foi reduzida para uma curva bidimensional absorvância x tempo. Para isso foi utilizada a soma de duas curvas à 550 nm (onde o espectro da Fenolftaleína na forma básica apresenta seu máximo) e à 615 nm (onde o espectro do Verde de Bromocresol na forma básica apresenta seu máximo). Cada superfície é transformada numa curva de titulação espectrofotométrica, como mostrado na figura 3.10, para as duas superfícies da figura 3.9.

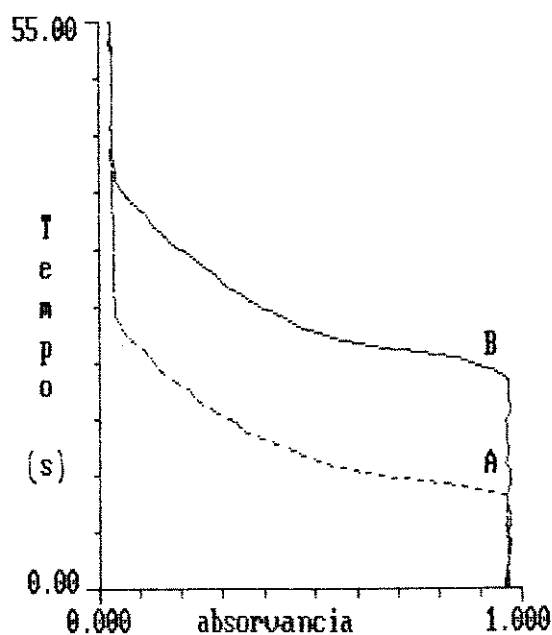


Figura 3.10. Curvas absorvância x tempo para misturas de ácido clorídrico e acético.

A. ácido clorídrico $5,00 \times 10^{-3}$ M e ácido acético $5,00 \times 10^{-3}$ M.

B. ácido clorídrico $2,50 \times 10^{-3}$ M e ácido acético $2,50 \times 10^{-3}$ M.

Cálculos e resultados

Um conjunto de 8 curvas de titulação absorvância x tempo foi empregado para estabelecer a modelagem com o PLS. A informação relevante para obter uma modelagem satisfatória está presente numa faixa de 0,015 à 0,75 unidades de absorvância. Foi formada uma matriz **X**, de tempos, com 50 colunas (intervalos de 0,015 unidades de absorvância) e 8 linhas (número de amostras utilizadas) e uma matriz **Y** de concentrações, com 2 colunas (referentes aos ácidos clorídrico e acético) e 8 linhas (número de amostras).

Os dados foram escalonados para média zero e desvio padrão unitário. Foi determinado o número de componentes principais necessários para os cálculos a partir dos Erros Padrão de Previsão (EPP), quando o número de componentes principais varia de um até quatro.

Os Erros Padrão de Previsão (EPP) são calculados a partir das previsões realizadas com o PLS para as amostras do conjunto teste, sendo dado por :

$$EPP = \sqrt{\sum (C^{prev} - C^{verd})^2 / N} \quad (3.30)$$

onde **C^{prev}** é a concentração prevista, **C^{verd}** é o valor verdadeiro e **N** é o número de amostras no conjunto teste.

Deve ser escolhido o número de componentes principais que forneça um menor erro possível nas previsões. Um gráfico do Erro Padrão de Previsão contra o número de componentes principais é mostrado na figura 3.11. Pode ser observado neste gráfico, que

após o segundo componente principal os erros na previsão praticamente não mais se alteram, indicando que devem ser utilizados dois componentes principais nos cálculos.

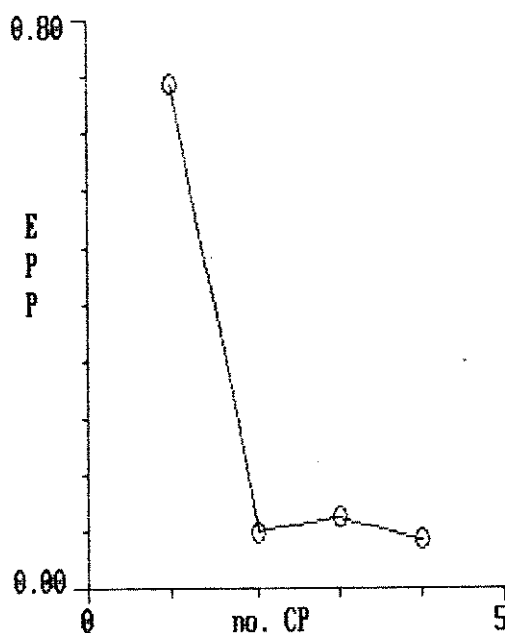


Figura 3.11. Gráfico do Erro Padrão de Previsão contra o número de Componentes Principais para a titulação da mistura dos ácidos acético e clorídrico.

Esse número de componentes, pode descrever 94,6% da variância original dos dados da matriz X . As 61 variáveis originais foram reduzidas para apenas 2, sem perda de informação.

Esperava-se encontrar esse número de componentes principais, uma vez que trata-se da titulação de dois ácidos, e o número mínimo de variáveis que o sistema pode possuir é exatamente uma para cada ácido. Não deve-se utilizar um número maior de componentes principais, apesar dos erros na previsão serem ainda

muito pequenos, porque apenas ruídos estarão sendo modelados.

Analisando-se a relação entre os *scores* das matrizes X e Y, percebe-se que há uma forte dependência linear nos 2 primeiros componentes principais, enquanto para o terceiro não há mais essa dependência, como mostrado na figura 3.12. Isso é mais um indicativo de que 2 componentes principais são suficientes para modelar os dados, enquanto o terceiro componente contém apenas ruídos.

Os valores previstos para as amostras utilizadas como teste, com 2 componentes principais na modelagem, são mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Previsões das concentrações individuais dos ácidos clorídrico e acético, utilizando o sistema FIA/titulação e PLS.

Amos- tra nº	Ácido Clorídrico(10 ⁻³ M)			Ácido Acético(10 ⁻³ M)		
	REAL	PREVISTO	ERRO	REAL	PREVISTO	ERRO
1	5,00	5,05	-0,05	2,50	2,46	0,04
2	2,50	2,55	-0,05	2,50	2,44	0,06
3	2,50	2,57	-0,07	1,25	1,09	0,16
4	1,25	1,34	-0,09	5,00	5,03	-0,03
Erro Relativo Médio*			2,4%	3,2%		

$$* ([\sum(y_r - y_p)^2/n]^*)/(\sum y_r/n)$$

Titulações/FIA, realizadas do modo inicialmente proposto por *Ruzicka et al*⁹ (sem a utilização de métodos multivariados, e para determinações de apenas um ácido), relacionam o logaritmo das concentrações dos ácidos diretamente contra os intervalos de tempos. Isso deve ser feito porque o gradiente alcalino gerado numa câmara de mistura é exponencial, e para linearizar a relação

aplica-se essa correção.

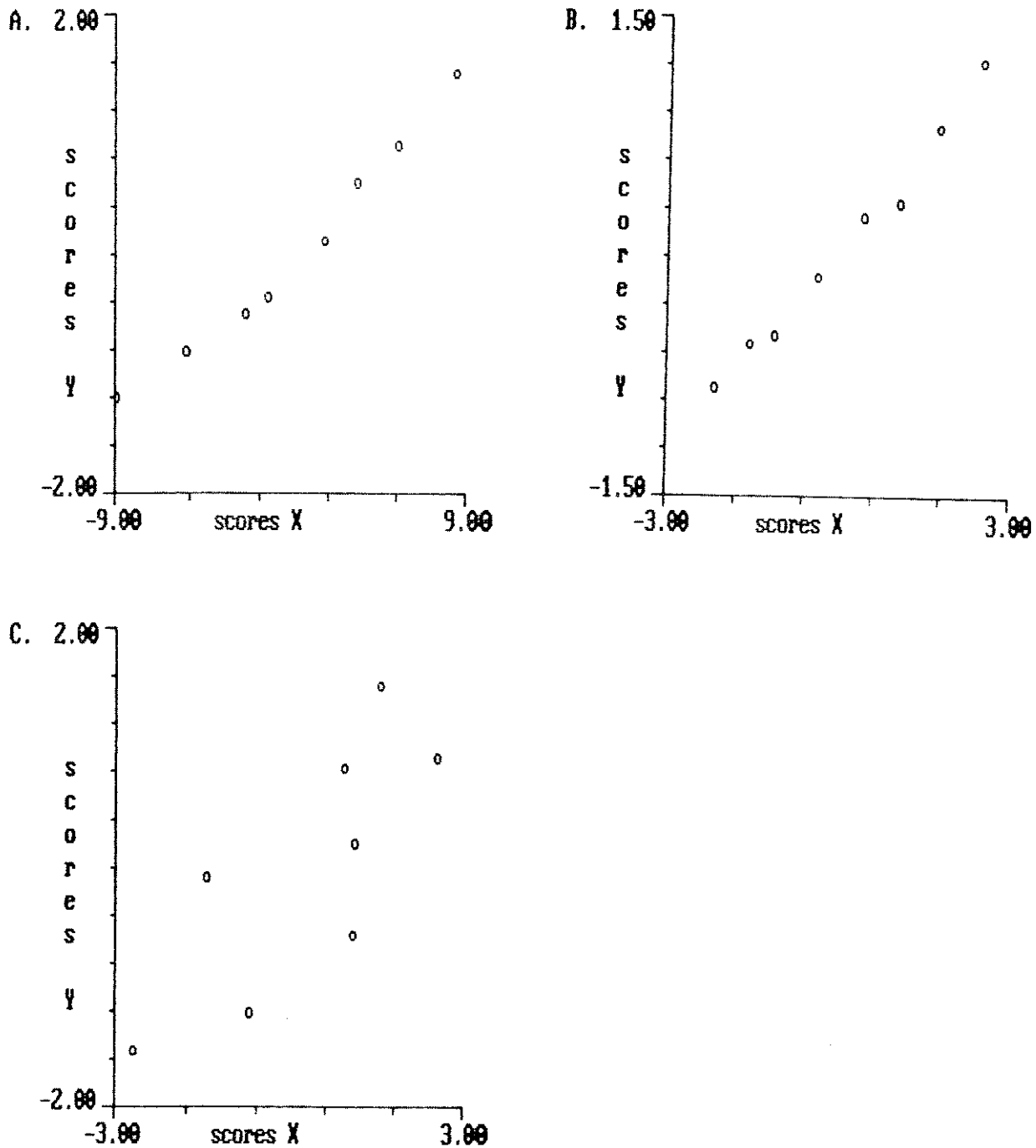


Figura 3.12. Gráficos dos *scores* da matriz X contra os *scores* da matriz Y. A. 1ª Componente Principal; B. 2ª Componente Principal; C. 3ª Componente Principal.

No presente caso também foi verificado a aplicação dessa correção. Entretanto, isso não resultou em previsões mais satisfatórias, quando comparadas àqueles onde não foi utilizada essa correção. Os valores previstos, e o número de componentes principais a serem utilizados não se alteraram. Provavelmente isto deve-se ao fato da região do gradiente utilizada ser praticamente linear, não sendo, portanto, necessária essa correção.

Uma grande vantagem da metodologia proposta é sua rapidez. Após o sistema estar calibrado (ter sido estabelecida a modelagem com o PLS na *fase de treinamento*) uma titulação completa, inclusive com resultados, pode processar-se automaticamente em cerca de 2 minutos. Análises de rotina, como monitoramento contínuo em linha, aparecem como aplicações muito promissoras.

3.6. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE pH EM SISTEMAS DE FLUXO UTILIZANDO MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Na titulação das misturas dos ácidos fracos cítrico/tartárico e acético/benzóico, devido à maior complexidade dos dados, não foi possível utilizar a mesma mistura de indicadores.

Uma mistura de indicadores capaz de fornecer informações sobre toda a faixa de pH onde a titulação irá ocorrer foi selecionada. A utilização desta mistura mais complexa de indicadores torna difícil, por sua vez, a seleção de alguns comprimentos de onda para recuperar uma curva de titulação espectrofotométrica, como anteriormente realizado.

Uma alternativa seria colocar os dados de cada espectro

lado a lado, formando uma longa linha que reflete cada titulação. Uma matriz muito extensa seria formada, que impossibilitaria sua manipulação no microcomputador disponível. Esses dados poderiam ser reduzidos pela aplicação da *Análise de Componentes Principais*, como já sugerido por Öhman et al¹⁰¹.

Foi observado que era possível calibrar cada espectro de uma mistura de indicadores em função do pH com o PLS. Cada superfície de titulação pode então ser transformada numa curva pH x tempo, e esta nova curva utilizada para estimar as concentrações dos ácidos presentes utilizando-se o PLS uma segunda vez. Desta forma, um método de *Calibração Multivariada* é utilizado inicialmente para redução de dados, e numa segunda etapa para uma determinação quantitativa.

Sessão Teórica

Pode ser demonstrado como os espectros de absorção de uma mistura de indicadores podem ser correlacionados com os valores de pH.

Para cada indicador presente na mistura é possível escrever o equilíbrio (por exemplo para o indicador 1):



A absorvância total da solução, em cada comprimento de onda, contendo o indicador ($HInd_1$) será a soma das absorvâncias das formas ionizada e não ionizada :

$$A_{T1} = A_{Ind_1^-} + A_{HInd_1} \quad (3.32)$$

e de acordo com a *Lei de Beer* :

$$A_{T1} = \epsilon_{Ind_1^-} \cdot a \cdot [Ind_1^-] + \epsilon_{HInd_1} \cdot a \cdot [HInd_1] \quad (3.33)$$

onde ϵ é a absorvidade molar num comprimento de onda, a é o caminho óptico e $[]$ denota concentração molar.

A constante de ionização do indicador é expressa como :

$$K_a = \frac{[H^+] [Ind_1^-]}{[HInd_1]} \quad (3.34)$$

A expressão dada em 3.34 pode ser manipulada para que se possa obter:

$$pk_a = pH - \log \frac{[Ind_1^-]}{[HInd_1]} \quad (3.35)$$

ou,

$$[HInd_1] = \frac{[Ind_1^-]}{10^{(pk_a - pH)}} \quad (3.36)$$

O balanço de massa para o indicador é :

$$C_{HInd_1} = [Ind_1^-] + [HInd_1] \quad (3.37)$$

onde C_{HInd_1} é a sua concentração analítica.

Substituindo 3.36 em 3.37 :

$$[HInd_1] = \frac{C_{HInd_1} \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1+10^{(pH-pK_a)}} \quad (3.38)$$

e substituindo 3.36 e 3.38 em 3.33 :

$$A_{T1} = \left(\epsilon_{HInd_1} \cdot a + \left(\frac{\epsilon_{HInd_1} \cdot a}{10^{(pH-pK_a)}} \right) \right) \cdot \left(\frac{C_{HInd_1} 10^{(pH-pK_a)}}{1+10^{(pH-pK_a)}} \right) \quad (3.39)$$

A absorvância total de uma solução contendo n indicadores, a um dado comprimento de onda, considerando-se a aditividade da Lei de Beer será :

$$A_T = A_{T1} + A_{T2} + A_{T3} + \dots + A_{Tn} \quad (3.40)$$

onde cada termo da equação 3.40 é igual ao mostrado para o indicador 1 na equação 3.39.

Uma análise da equação 3.39 mostra que para um indicador que apresenta absorvidades molares diferentes, a um dado comprimento de onda, para as formas ionizada e não ionizada, será observada uma mudança efetiva da absorvância quando o pH da solução aproxima-se do valor do seu pK_a . Uma curva sigmóide é obtida, sendo que não há mais mudança na absorvância quando o pH atinge um valor que é duas ou três unidades maior que o seu pK_a . Entretanto, para valores de $pK_a \pm 1$ ou $pK_a \pm 1,5$ a absorvância mudará linearmente com o pH. Este fato, juntamente com a equação 3.40 pode guiar a seleção da mistura de indicadores a ser utilizada, que dependerá da faixa de pH a ser acompanhada.

As diferenças entre os valores de pK_a 's sucessivos devem

ser da ordem de 2 unidades no máximo. Isso assegura que quando um indicador não está mais fornecendo informações numa faixa linear de pH, outro deve estar entrando nessa situação. Os indicadores devem, de preferência, serem selecionados de forma a apresentarem valores distintos nas suas absorvâncias molares máximas em diferentes comprimentos de onda. Isto faz com que a aditividade das absorvâncias seja válida durante toda a faixa de pH a ser monitorada, reduzindo a probabilidade de saturação em um dado comprimento de onda.

Outra característica desses indicadores ácido-base, consiste na sua elevada absorvidade molar, o que torna possível utilização de soluções muito diluídas (da ordem de 10^{-5} M), não influenciando na titulação de ácidos mais concentrados (da ordem de 10^{-3} M). Por outro lado, como a mistura de indicadores está sempre presente na mesma concentração em todas as titulações, esse efeito (se significativo) será cancelado pela modelagem, não influenciando os resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

Mistura de Indicadores

Uma mistura de cinco indicadores, conforme mostrados na tabela 3.2 com seus valores de pK_a 's, faixas de pH de viragem e as cores nas formas ácida e básica, foi utilizada para a modelagem. Foram preparadas soluções estoque desses indicadores como recomendado por Bányai¹⁰². As concentrações dos indicadores na

mistura foram ajustadas observando-se os espectros no sistema FIA mostrado na figura 3.7, a diferentes valores de pH (na faixa de interesse para as titulações que seriam realizadas). As misturas mostraram absorvâncias mínima e máxima de 0,2 à 1,2 para uma faixa de pH de 2,4 à 9,2. O indicador utilizado em maior concentração foi o Alaranjado de Metila cuja concentração era cerca de 3×10^{-5} M, enquanto os outros ficaram por volta de 1×10^{-5} M.

Tabela 3.2. Mistura de indicadores utilizada.

Indicador	pK _a	faixa/pH	COR
Alaranjado de Metila	3,46	3,1 - 4,4	vermelho/amarelo
Verde de Bromocresol	4,66	3,8 - 5,4	amarelo/azul
Vermelho de Clorofenol	6,00	4,8 - 6,4	amarelo/violeta
Azul de Bromotimol	7,10	6,0 - 7,6	amarelo/azul
Vermelho de Cresol	8,25	7,0 - 8,8	amarelo/violeta

Soluções Tampão

Foram preparadas 15 soluções de tampão com pH's na faixa de 2,8 à 8,8. Misturas de Ácido Cítrico 0,1 M e Fosfato de Potássio Dibásico 0,2 M foram utilizados para os tampões numa faixa de pH de 2,8 à 7,6, e misturas de Ácido Bórico 0,1 M e NaOH 0,1 M para a faixa de pH de 8,0 à 8,8, conforme recomendado por *Perrin et al*¹⁰³. A força iônica foi ajustada para 0,5 M com KNO₃ em todas as soluções. Foram realizadas medidas potenciométricas, com um eletrodo de vidro, para certificar-se dos pH's das soluções. Na modelagem foram utilizados esses valores de pH medidos potenciometricamente.

Outras cinco soluções de tampões também foram utilizadas, além daquelas empregadas na modelagem. Estas soluções serviram para estabelecer os parâmetros do modelo e testar o poder de previsão do sistema. Foram constituídas pelos tampões de Ácido Cítrico/Fosfato de Potássio Dibásico, Ácido Acético/Acetato de Sódio e Ácido Bórico/NaOH, com os seguintes pH's: 3,00; 4,00; 4,75; 6,25 e 8,00.

Sistema para a obtenção dos espectros

Para a obtenção dos espectros da mistura de indicadores, foi utilizado o mesmo sistema mostrado na figura 3.7. A solução da mistura de indicadores e cada uma das soluções tampão são bombeadas continuamente, com a mesma vazão, e mergem chegando até a câmara de dispersão. Foi bombeada água nas outras linhas do sistema para promover a mesma diluição da mistura de indicadores que deve ocorrer durante uma titulação.

Os espectros da mistura de indicadores, para as 15 amostras de solução tampão, são mostrados na figura 3.13, como uma superfície absorvância x pH x comprimento de onda.

Cálculos e Resultados

Na modelagem com o PLS, foi construída uma matriz **X** consistindo de valores de absorvância à 50 comprimentos de onda (linhas) das 15 soluções tampão (colunas), e uma matriz **Y** dos valores de pH (a única coluna) das 15 soluções (linhas). Os dados

foram escalonados para média zero e desvio padrão unitário.

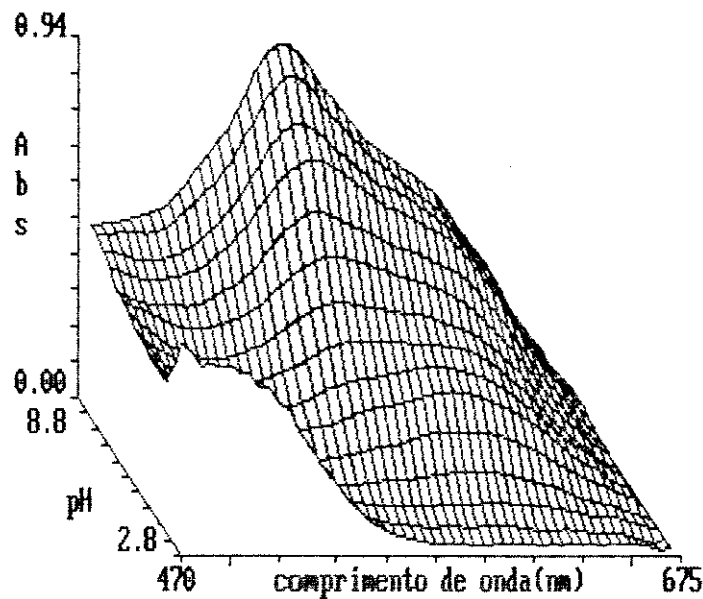


Figura 3.13. Superfície absorvância x pH x comprimento de onda para as soluções tampão preparadas.

Para que se pudesse determinar o número de componentes principais a serem utilizados, foram realizadas previsões dos pH's das outras 5 soluções tampão que não entraram na construção do modelo. Foi calculado o erro padrão de previsão (EPP), dado pela equação 3.30, para as previsões com o número de componentes principais variando de um até quatro. Um gráfico do Erro Padrão de Previsão (EPP) contra o número de componentes principais é mostrado na figura 3.14.

Uma análise da figura 3.14, mostra que após o segundo componente principal, não há uma variação apreciável do erro. Com isso, conclui-se que devem ser utilizados dois componentes principais nos cálculos. A utilização de apenas dois componentes

principais consegue descrever 99,6% da variância original dos dados da matriz X.

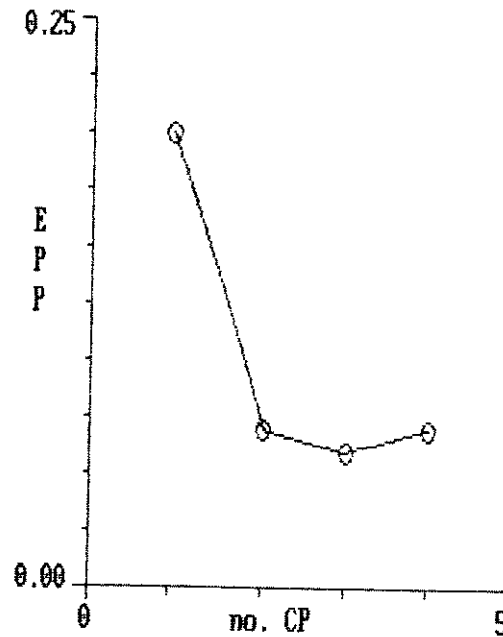


Figura 3.14. Gráfico do Erro Padrão de Pervisão (EPP) como função do número de componentes principais.

Uma boa relação linear entre os *scores* das matrizes X e Y, para as 15 amostras utilizadas na construção do modelo, para o primeiro componente principal, pode ser observado na figura 3.15.

Desta maneira, conclui-se que com a mistura de indicadores proposta é possível estabelecer uma relação linear com os valores de pH numa faixa de 2,8 à 8,8.

Com a utilização de dois componentes principais, o Erro Relativo Médio para as previsões das 5 amostras que não entraram na calibração foi de 1,28%. A tabela 3.3 mostra os valores previstos para cada uma dessas amostras.

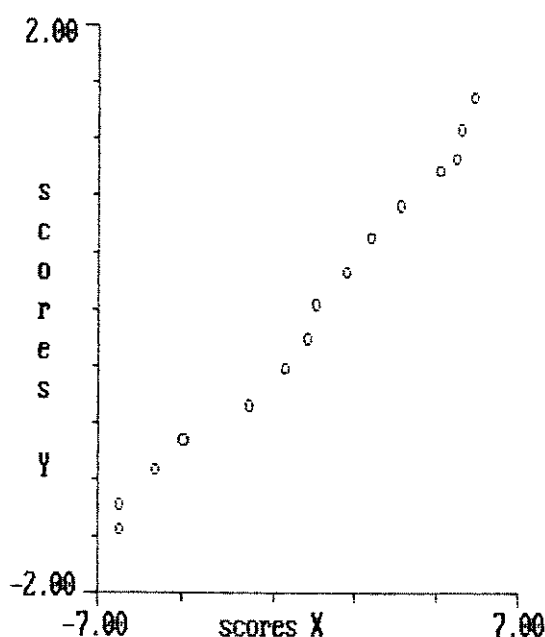


Figura 3.15. Gráfico dos *scores* da matriz de absorvâncias contra os *scores* da matriz de pH's, para o primeiro componente principal.

Tabela 3.3. Previsões para o pH de 5 soluções tampão utilizando-se 2 componentes principais nos cálculos com o PLS.

Amostra nº	pH real*	pH previsto	ERRO/pH
1	3,09	3,13	-0,04
2	4,01	3,93	-0,08
3	4,75	4,77	-0,02
4	6,36	6,35	0,01
5	7,95	8,07	0,12

* determinado potenciométricamente.

Para que se pudesse determinar a precisão nas determinações de pH, foram realizadas cinco medidas para uma mesma amostra, cujo valor de pH era 4,75. O valor médio dessas determinações foi 4,77 com um desvio padrão de 0,02.

3.7. TITULAÇÃO DE ÁCIDOS FRACOS UTILIZANDO METODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (PLS)

Sessão Teórica

Pode ser demonstrado como é a dependência do tempo com o pH na titulação de uma mistura de dois ácidos fracos monopróticos HA e HB (extensões para mais ácidos ou ácidos polipróticos são facilmente realizadas) no sistema titulação/FIA utilizado, e como a calibração multivariada pode ser utilizada nessas situações para obter as concentrações dos ácidos individuais a partir das curvas obtidas.

Quando um volume fixo de uma solução alcalina homogênea é injetado num sistema FIA, como mostrado na figura 3.7 que tem uma câmara de mistura, um gradiente de concentração com o tempo é gerado. Um modelo que descreve o gradiente gerado numa câmara de mistura é a dos *tanques em série*¹⁰⁴, que pode ser descrito por uma função puramente exponencial, tomando-se um tempo "t" após a injeção, na porção da cauda do perfil do pico:

$$C_{OH^-} = C^0 e^{-\frac{t}{T}} \quad (3.41)$$

onde C_{OH^-} é a concentração a cada instante t, C^0 é a concentração inicial da solução alcalina, e T é o *tempo de residência médio* de um elemento do fluido no interior da câmara de mistura.

O tempo de residência médio pode ser expresso como :

$$T = \frac{V_m}{Q} \quad (3.42)$$

onde Q é a vazão da solução através da câmara de mistura e V_m é o seu volume interno.

O perfil do gradiente alcalino a ser gerado, pode ser controlado pelo ajuste de parâmetros físicos como V_m e Q , além da concentração inicial da base. Podem ser obtidos gradientes cujas concentrações podem variar muito lentamente com o tempo, e de maneira praticamente linear em certos intervalos.

Nas titulações efetuadas, as amostras são continuamente bombeadas, confluindo com a solução alcalina imediatamente antes da câmara de mistura. A partir desse ponto de confluência, não é necessário considerar alterações na concentração analítica dos ácidos uma vez que são constantes.

A titulação processa-se com uma adição de hidróxido variável (devido ao gradiente formado) a volume final constante. Desta maneira não são necessárias correções de volume.

As reações ácido-base no interior da câmara de mistura são muito rápidas, assim o equilíbrio é atingido instantaneamente.

O balanço de carga para este sistema é :

$$[Na^+] + [H^+] = [OH^-] + [A^-] + [B^-] \quad (3.43)$$

Como $[Na^+]$ vem da solução alcalina injetada, então da equação 3.41:

$$[OH^-] = [Na^+] = C_0^{OH^-} e^{-\frac{t}{T}} \quad (3.44)$$

As seguintes constantes podem ser apresentadas :

- produto iônico da água :

$$K_w = [H^+] [OH^-] \quad (3.45)$$

- Constante de ionização do ácido HA :

$$K_{HA} = \frac{[H^+] [A^-]}{[HA]} \quad (3.46)$$

- Constante de ionização do ácido HB :

$$K_{HB} = \frac{[H^+] [B^-]}{[HB]} \quad (3.47)$$

Os balanços de massa para os dois ácidos são dados por:

$$C_{HA} = [HA] + [A^-] \quad (3.48)$$

$$C_{HB} = [HB] + [B^-] \quad (3.49)$$

onde C_{HA} e C_{HB} são as concentrações analíticas.

É possível estabelecer a seguinte relação a partir de 3.46 e 3.48 :

$$[A^-] = \frac{K_{HA} C_{HA}}{[H^+] + K_{HA}} \quad (3.50)$$

e a partir de 3.47 e 3.49 :

$$[B^-] = \frac{K_{HB} C_{HB}}{[H^+] + K_{HB}} \quad (3.51)$$

Agora substituindo 3.44, 3.45, 3.50 e 3.51 em 3.43 :

$$C_o^{OH^-} e^{-\frac{t}{T}} + [H^+] = \frac{K_w}{[H^+]} + \frac{K_{HA} C_{HA}}{[H^+] + K_{HA}} + \frac{K_{HB} C_{HB}}{[H^+] + K_{HB}} \quad (3.52)$$

ou,

$$-\frac{t}{T} = \ln \left(\frac{\frac{K_w}{[H^+]} + \frac{K_{HA} C_{HA}}{[H^+] + K_{HA}} + \frac{K_{HB} C_{HB}}{[H^+] + K_{HB}} - [H^+]}{C_o^{OH^-}} \right) \quad (3.53)$$

A metodologia proposta emprega os tempos necessários para alcançar um determinado pH como variáveis independentes. Pela equação 3.53 pode ser observado que estes intervalos de tempos dependem tanto das concentrações iniciais dos ácidos como de seus valores de pK_a . Isto significa que esses tempos contém informações quantitativas e qualitativas à respeito da composição da amostra.

O método de Calibração Multivariada utilizado, baseado no PLS, supõe que as variáveis (tempos) apresentam uma dependência linear com a concentração dos ácidos. Analisando a equação 3.53, este fato impõe uma certa limitação na metodologia, uma vez que para uma faixa relativamente grande de concentrações esta dependência deixa de ser linear. Por exemplo para os ácidos HA com pK_a 3,12 e HB com pK_a 5,3, concentração inicial da base 0,2 M à pH 4,0, e o ácido HA numa faixa de concentrações de 1×10^{-3} M à 5×10^{-3} M a relação é praticamente linear. Entretanto, para este mesmo ácido HA, esta relação deixa de ser linear para concentrações numa faixa de 5×10^{-4} M à 5×10^{-2} M, como mostrado na

figura 3.16. Desta forma, somente ácidos dentro de uma faixa mais estreita de concentrações poderão ser titulados, utilizando-se a metodologia proposta.

O perfil do gradiente alcalino é importante na linearidade das relações entre as concentrações dos ácidos e o tempo. Deve-se buscar uma parte do gradiente que seja o mais linear possível. Isso é alcançado em regiões localizadas no final da cauda do perfil, onde o decréscimo da concentração da base é muito lenta. É importante otimizar o sistema para que a titulação aconteça em tempos mais para o final do perfil, pois assegura-se uma adição extremamente suave de base, tornando possível a titulação de ácidos com pK_a 's muito próximos.

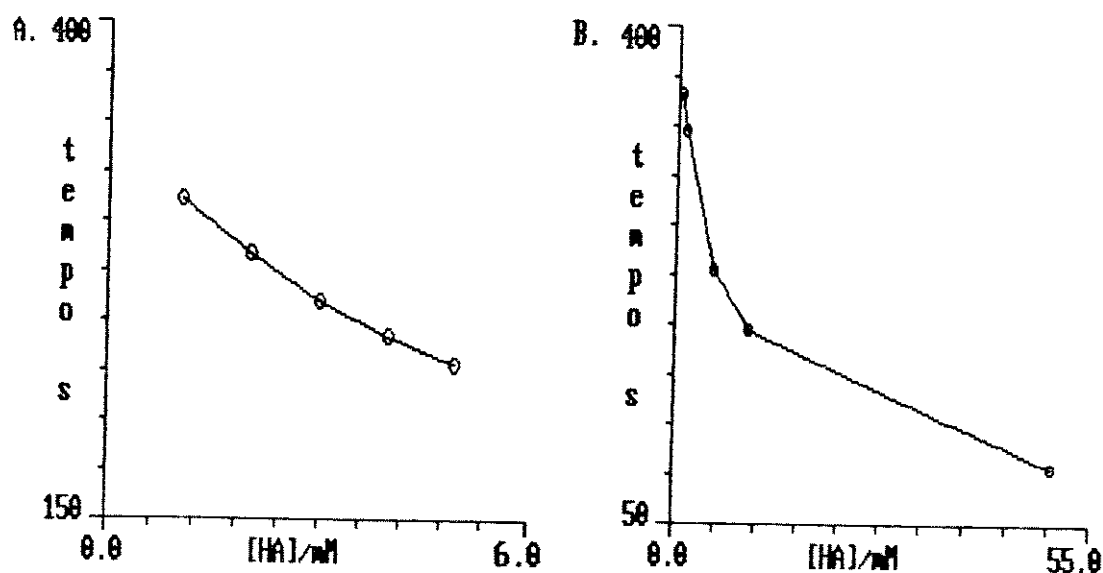


Figura 3.16. Dependência do tempo com a concentração do ácido HA segundo a equação 3.53. Condições : $pH = 4,0$; $[HB] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K_{HA} = 7,5 \times 10^{-4}$; $K_{HB} = 5 \times 10^{-6}$; $K_w = 1 \times 10^{-14}$; $C^o = 0,2 \text{ M}$; $T = 1 \text{ s}$.
A. $[HA] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ à $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ e **B.** $[HA] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ à $5 \times 10^{-2} \text{ M}$.

TITULAÇÃO DOS ÁCIDOS CÍTRICO E TARTÁRICO

Parte Experimental

Na titulação da mistura dos ácidos cítrico (um ácido fraco triprótico com $pK_1=2,80$; $pK_2=4,08$ e $pK_3=5,33$) e tartárico (um ácido fraco diprótico com $pK_1=2,69$ e $pK_2=3,73$)¹⁰⁵, foi estabelecida uma vazão de 0,30 mL/min., sendo coletados em cada titulação 120 espectros à intervalos de 2 segundos entre cada aquisição. O início da coleção dos espectros foi estabelecida à 210 segundos após a injeção. Foram injetados 100 μ L de uma solução 0,2 M de NaOH isenta de Carbonato para produzir o gradiente alcalino.

Duas superfícies absorvância x tempo x comprimento de onda obtidas para titulações dessas misturas de ácidos encontram-se na figura 3.17.

A figura 3.18 mostra as 2 curvas pH x tempo obtidas com o procedimento de conversão dos espectros das misturas de indicadores para pH, das 2 superfícies mostradas na figura 3.17.

Foram preparadas 15 soluções das misturas dos ácidos cítrico e tartárico com concentrações na faixa de $1,00 \times 10^{-3}$ M à $4,00 \times 10^{-3}$ M, sendo 10 delas para serem utilizadas na etapa da construção do modelo, na *fase de treinamento*, e outras 5 para testar a capacidade de previsão do modelo desenvolvido.

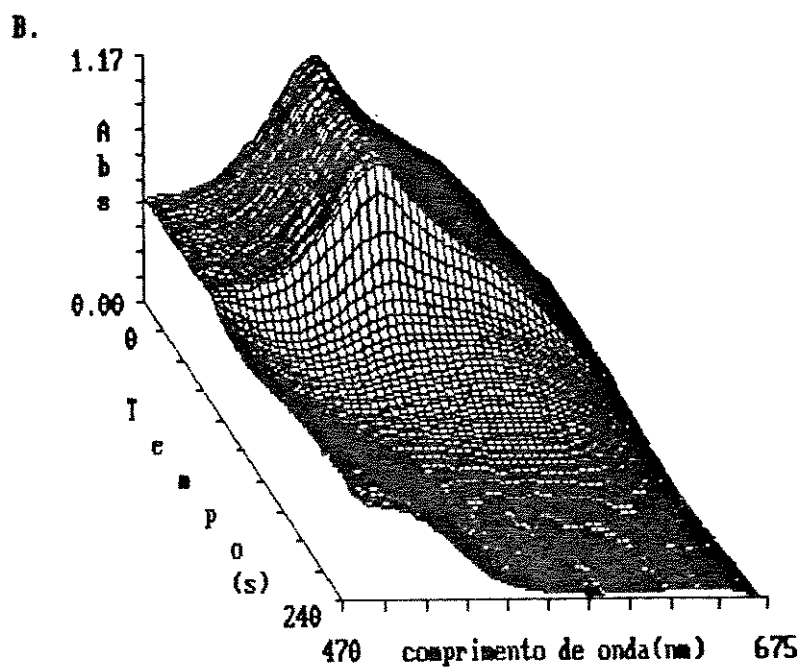
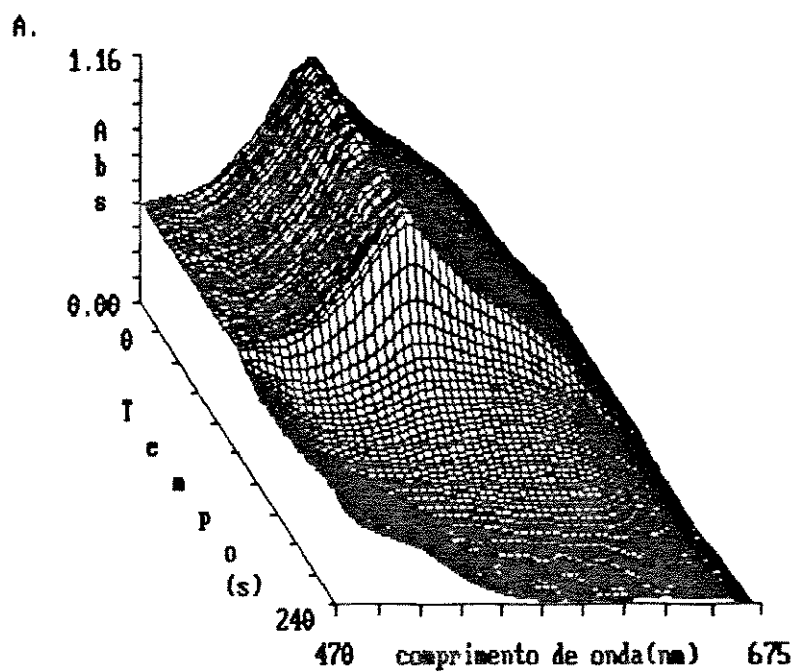


Figura 3.17. Superfícies absorvância x tempo x comprimento de onda para a titulação das misturas dos ácidos cítrico e tartárico.

A. Ácido Cítrico 2×10^{-3} M e Ácido Tartárico 1×10^{-3} M.

B. Ácido Cítrico 3×10^{-3} M e Ácido Tartárico 2×10^{-3} M.

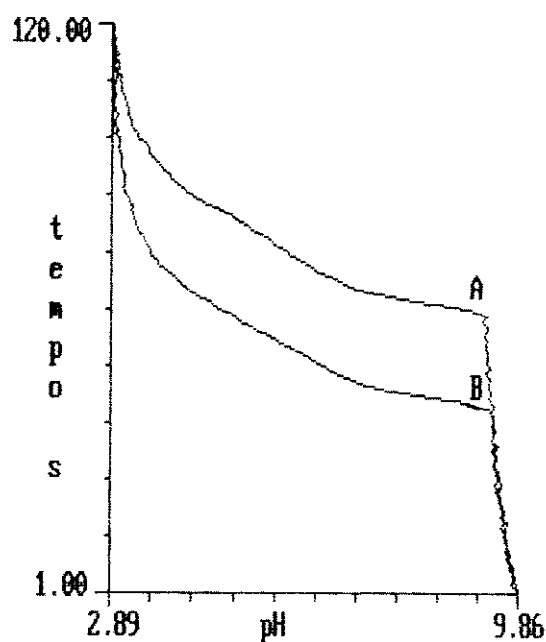


Figura 3.18. Curvas pH x tempo para as misturas dos ácidos cítrico e tartárico.

A. Ácido Cítrico 2×10^{-3} M e Ácido Tartárico 1×10^{-3} M.

B. Ácido Cítrico 3×10^{-3} M e Ácido Tartárico 2×10^{-3} M.

Cálculos e Resultados

Um conjunto de 10 curvas pH x tempo foram empregadas para estabelecer a modelagem com o PLS, numa faixa de pH de 2,7 a 8,7. Foi formada uma matriz X, de tempos, com 40 colunas (intervalos de 0,15 unidades de pH) e 10 linhas (as amostras) e uma matriz Y, de concentrações, com 2 colunas (referentes aos ácidos cítrico e tartárico) e 10 linhas (número de amostras). Os dados foram escalonados para média zero e desvio padrão unitário.

Inicialmente, foi estimado o número de componentes princi-

país necessários para uma previsão satisfatória, a partir dos Erros Padrão de Previsão (EPP), dado pela equação 3.30, quando o número de componentes principais varia de um até cinco.

A figura 3.19 mostra o gráfico do Erro Padrão de Previsão contra o número de componentes principais. Por esta figura, é possível observar que 3 componentes principais são necessários para a realização dos cálculos, uma vez que após esse número de componentes não há mais uma variação apreciável do erro. Com 3 componentes principais é possível descrever 99,2% da variância original dos dados da matriz X .

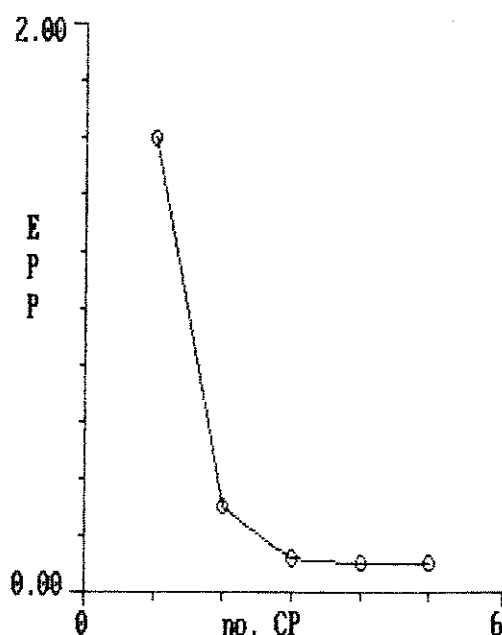


Figura 3.19. Gráfico do Erro Padrão de Previsão contra o número de componentes principais para a titulação da mistura dos ácidos cítrico e tartárico.

A necessidade de três componentes principais para que se possa realizar a previsão de maneira satisfatória é difícil de

ser analisada. Seria esperado que fossem necessários 2 componentes principais, um para cada ácido. Um terceiro componente principal pode ser devido à não linearidade total dos dados, uma vez que o gradiente alcalino não é linear com o tempo.

Uma análise da relação entre os scores das matrizes X e Y, mostra que para os 3 primeiros componentes principais há uma forte tendência à linearidade, como pode ser verificado pela figura 3.20. Isso é mais um indicativo que realmente devem ser utilizados 3 componentes principais nos cálculos.

As concentrações individuais de cada ácido previstas para as amostras utilizadas como teste, com a utilização de 3 componentes principais, estão apresentadas na tabela 3.4.

Os resultados obtidos mostram que a metodologia proposta é viável para ser aplicada em titulações mais complexas, tendo como grande vantagem a rapidez e facilidade de execução, com uma titulação completa podendo ser realizada em cerca de cinco minutos.

Tabela 3.4. Previsões das concentrações individuais dos ácidos cítrico e tartárico, utilizando o sistema FIA/titulação e PLS.

Amo- stra nº	Ácido Cítrico ($10^{-3}M$)			Ácido Tartárico ($10^{-3}M$)		
	REAL	PREVISTO	ERRO	REAL	PREVISTO	ERRO
1	1,00	1,08	0,08	3,00	2,93	0,07
2	2,00	2,09	-0,09	4,00	3,82	0,18
3	3,00	3,10	-0,10	3,00	3,04	-0,04
4	4,00	3,76	0,24	2,00	2,02	-0,02
5	4,00	4,07	0,07	1,00	1,13	-0,13
Erro Relativo médio*			5,1%	4,1%		

* Conforme mostrado na tabela 3.1.

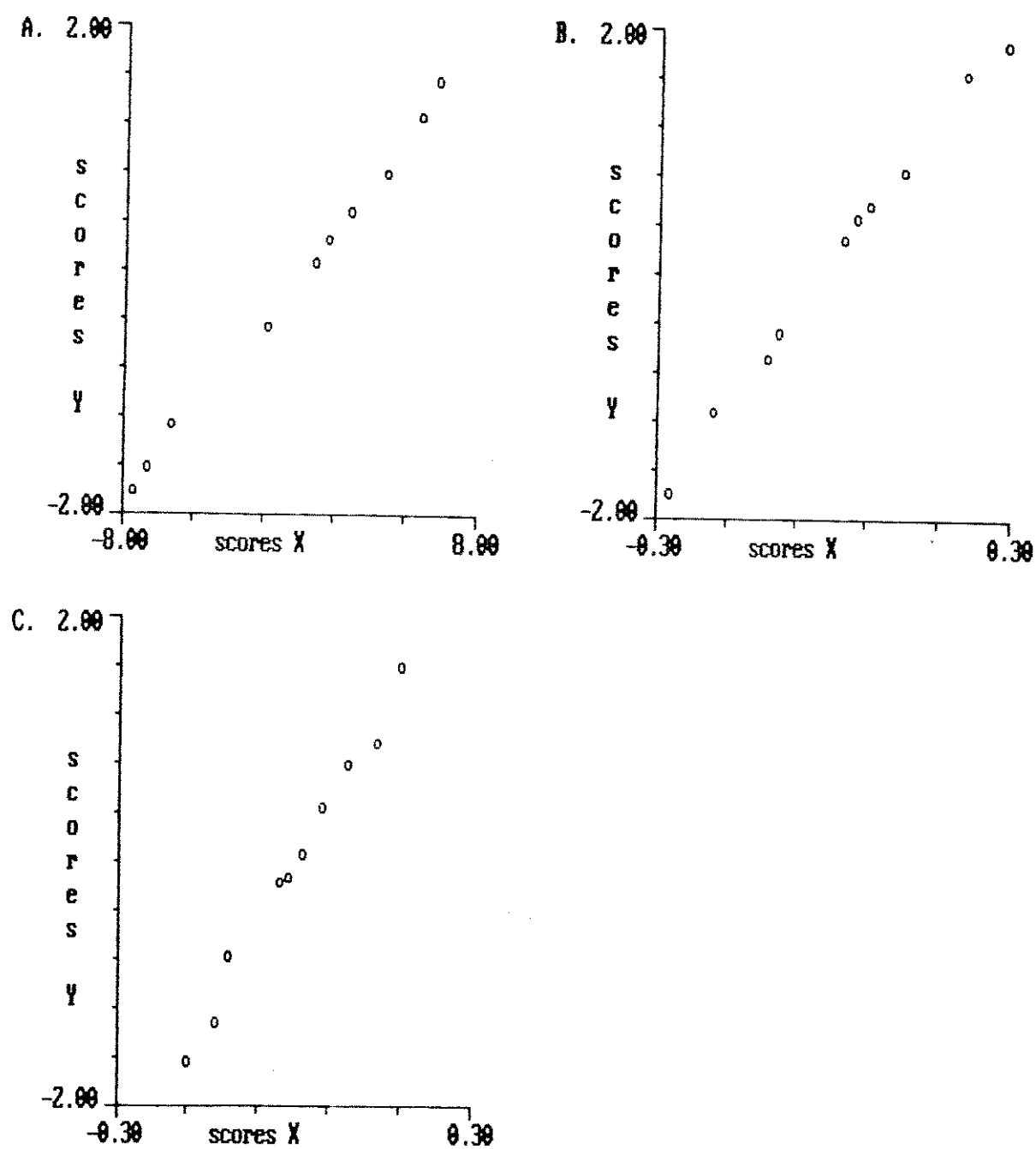


Figura 3.20. Gráficos dos *scores* da matriz X contra os *scores* da matriz Y. A. 1ª componente principal; B. 2ª componente principal; C. 3ª componente principal.

Porém, como já formulado na sessão teórica, apenas uma faixa estreita de concentrações dos ácidos pode ser titulada. Uma tentativa em expandir a faixa de concentrações de 10^{-2} M à 10^{-4} M resultou em previsões com erros relativos médios superiores à 15%. Nem uma possível correção na linearidade, utilizando-se o logaritmo das concentrações nos cálculos resultou em previsões mais satisfatórias.

Em análises de rotina, onde essa metodologia melhor pode se adequar, o fato das concentrações necessitarem estar numa faixa mais estreita não deve impor grandes prejuízos. Na maioria das vezes as faixas de concentrações são definidas e invariáveis, e a modelagem pode ser estabelecida com padrões cujas concentrações sejam próximas das amostras a serem analisadas. Amostras com concentrações muito diferentes da faixa modelada não poderão ser quantificadas, mas a partir do modelo desenvolvido poderão ser identificadas com a utilização da *Análise de Componentes Principais*.

TITULAÇÃO DOS ÁCIDOS ACÉTICO E BENZÓICO

Parte Experimental

A metodologia proposta, da titulação simultânea de ácidos fracos utilizando o PLS, também foi aplicada para casos de dois ácidos monopróticos com pK_a 's muito próximos, para avaliar a possibilidade da análise mesmo em situações onde as curvas de titulação individuais de cada ácido são muito semelhantes.

Foram tituladas misturas dos ácidos acético ($pK_a=4,47$) e benzoico ($pK_a=4,18$)¹⁰⁵, utilizando o mesmo procedimento anteriormente aplicado, incluindo a redução das superfícies para curvas tempo x pH.

O sistema FIA utilizado foi o mesmo mostrado na figura 3.7, sendo estabelecida uma vazão de 0,30 mL/min. nas 3 linhas, coletando-se em cada titulação 120 espectros a intervalos de 2 segundos entre cada aquisição. O início da coleção de espectros foi estabelecido à 250 segundos após a injeção. Foram injetados 100 μ L de uma solução 0,2 M de NaOH isenta de carbonato para produzir o gradiente alcalino.

Foram preparadas 15 soluções das misturas dos ácidos acético e benzoico, com concentrações na faixa de $1,00 \times 10^{-3}$ M a $4,00 \times 10^{-3}$ M, sendo 10 delas para serem utilizadas na *fase de treinamento* para a construção do modelo, e outras 5 para testar a capacidade de previsão do modelo desenvolvido.

Cálculos e resultados

Um conjunto de 10 curvas de titulação tempo x pH foram empregadas para estabelecer a modelagem com o PLS, num intervalo de pH de 3,0 à 7,0. Foi formada uma matriz **X**, de tempos, com 40 colunas (intervalos de 0,10 unidades de pH) e 10 linhas (as amostras) e uma matriz **Y**, de concentração, com 2 colunas (referentes aos ácidos acético e benzoico) e 10 linhas (as amostras). Houve um escalonamento para média zero e desvio padrão unitário.

O número de componentes principais necessários para os

cálculos foi estimado da mesma forma das titulações anteriores, a partir dos Erros Padrão de Previsão. Novamente foi determinado que 3 componentes principais são necessários para a realização dos cálculos, e com esse número é possível descrever 98,7% da variância original dos dados da matriz X. A tabela 3.5 mostra as concentrações previstas para as 5 amostras teste, com a utilização de 3 componentes principais.

Tabela 3.5. Previsões das concentrações individuais dos ácidos acético e benzóico, utilizando o sistema FIA/titulação e PLS.

Amos- tra nº	Ácido Acético ($10^{-3}M$)			Ácido Benzóico ($10^{-3} M$)		
	REAL	PREVISTO	ERRO	REAL	PREVISTO	ERRO
1	1,00	1,14	-0,14	2,00	1,93	0,07
2	2,00	2,02	-0,02	2,00	1,83	0,17
3	2,00	2,09	-0,09	3,00	3,03	-0,03
4	3,00	2,83	0,17	3,00	3,29	-0,29
5	4,00	4,27	0,27	1,00	1,05	-0,05
Erro Relativo Médio*			6,7%	7,1%		

* Conforme mostrado na tabela 3.1.

Os erros obtidos são maiores que para a mistura cítrico/tartárico, devido principalmente ao fato que as curvas de titulação para cada ácido individualmente são muito similares e as regiões de pH que oferecerem informações qualitativas e quantitativas são mais restritas.

O sistema utilizado na aquisição dos dados deve ter uma precisão extremamente alta neste caso, pequenas flutuações podem originar previsões completamente errôneas. Um exemplo disso pode

ser observado quando foram realizadas quatro titulações para uma mesma amostra composta por Ácido Acético $2,00 \times 10^{-3}$ M e Ácido Benzóico $3,00 \times 10^{-3}$ M. A figura 3.21 mostra as curvas tempo x pH obtidas para estas quatro titulações.

Pode ser observado que 3 dessas curvas são muito parecidas, enquanto uma outra tem o perfil um pouco diferente. Realizando-se as previsões, mostradas na tabela 3.6, aquela curva que é um pouco diferente gera uma previsão totalmente falha, com erro relativo maior que 35%.

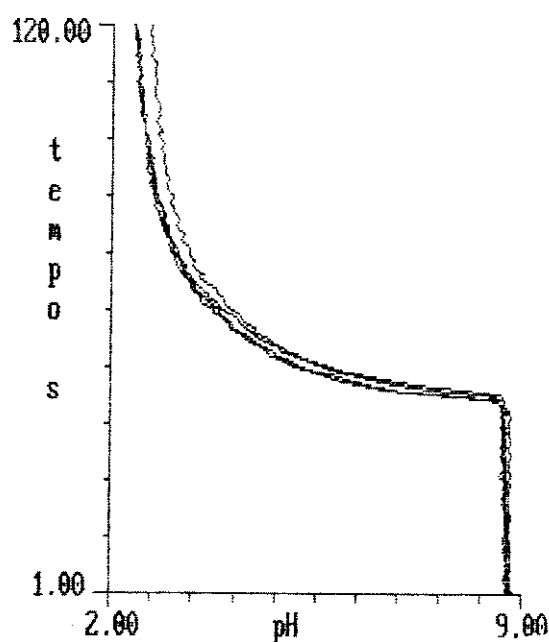


Figura 3.21. 4 curvas de titulação para a mesma amostra composta por Ácido Acético $2,00 \times 10^{-3}$ M e Ácido Benzóico 3×10^{-3} M.

A identificação de curvas que devem originar esses erros muito grandes é difícil de ser realizada, e nem mesmo com a utilização de métodos de classificação baseados na *Análise de*

Componentes Principais isso talvez possa ser possível. Como todas as curvas são muito parecidas, pequenas flutuações podem originar desvios no seu perfil, tornando-a parecida com uma outra cuja concentração é diferente.

Tabela 3.6. Previsões realizadas para as 4 titulações mostradas na figura 3.21, composta por Ácido Acético $2,00 \times 10^{-3}$ M e Ácido Benzoico $3,00 \times 10^{-3}$ M.

TITU- LAÇÃO nº	Ácido Acético (10^{-3} M)		Ácido Benzoico (10^{-3} M)	
	PREVISTO	ERRO REL. %	PREVISTO	ERRO REL. %
1	2,09	4,3	3,03	1,0
2	3,16	36,7	2,19	35,0
3	1,99	0,5	3,23	7,1
4	2,07	3,4	3,09	2,9

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrada a possibilidade da construção de um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard* para aquisição de espectros na região do visível em intervalos de tempo muito baixos.

Em aplicações que requerem medidas rápidas, principalmente em casos de baixa intensidade de radiação luminosa, a vantagem da multiplexação, presente nos instrumentos baseados na transformada de *Hadamard*, pode proporcionar melhores resultados que os baseados em *Arranjos Lineares de Diodos*, que necessitam maiores tempos de integração e apresentam custos muito mais elevados. Além disso, o espectrofotômetro *Hadamard* pode ser construído a partir de componentes facilmente obtidos no mercado nacional.

O principal problema encontrado na utilização de máscaras móveis nos instrumentos com transformada de *Hadamard* até aqui descritos, e talvez a principal razão para sua pouca utilização nos últimos anos, deve-se ao alinhamento das máscaras no feixe de luz dispersa e da perda do controle dos deslocamentos dos elementos das máscaras, resultando em espectros com codificação falha. Estes problemas foram eliminados com a utilização de marcadores óptico-eletrônicos, assegurando um rígido controle da codificação e um longo tempo de operação sem problemas.

Os espectros de absorção na região do visível têm bandas

largas. Desta forma a resolução obtida no instrumento desenvolvido pode ser considerada suficiente para as aplicações mais comumente realizadas nesta região do espectro.

A utilização de procedimentos de *Filtragem Digital* muito simples, mostrou-se muito importante para uma melhor apresentação visual dos espectros, assim como para a obtenção de melhor reprodutibilidade das medidas espectrofotométricas.

Na aplicação analítica realizada com o instrumento desenvolvido, deve ser destacado que esta foi a primeira vez que um espectrofotômetro com transformada de *Hadamard* foi utilizado como unidade de detecção num sistema de Análise por Injeção em Fluxo.

A metodologia proposta da utilização do PLS duas vezes em sequência, primeiro para redução dos dados, e numa segunda etapa para previsão, também nunca havia antes sido proposto para sistemas químicos.

O procedimento para determinação do pH a partir dos espectros da mistura de indicadores pode ser utilizado para outros propósitos, além da redução de dados, principalmente em situações onde medidas rápidas e precisas do pH necessitem ser efetuadas.

Uma grande vantagem da metodologia proposta é a sua rapidez. Cada ciclo completo de análise pode ser realizado em 2 ou 5 minutos, dependendo da mistura dos ácidos, após o sistema estar calibrado. Nesse procedimento não é necessário que nenhum parâmetro físico-químico, como constantes de equilíbrio e força iônica, sejam conhecidos, e apenas fatores externos devem ser mantidos sob controle. O procedimento também não necessita que seja determinado ou conhecido onde a titulação começa ou onde estão

localizados os pontos de equivalência para cada ácido.

Como desvantagens podem ser enumeradas o grande número de amostras que devem ser preparadas para que seja estabelecida a modelagem com o PLS, além de problemas de matriz nas amostras desconhecidas que não podem ser solucionados. Isto é, como na maioria dos métodos de calibração, a matriz das amostras deve-se igualar o máximo possível à matriz dos padrões de calibração.

Outra possível desvantagem, está no fato que apenas ácidos numa pequena de faixa de concentrações poderem ser analisados, embora, como já enfatizado, em análises de rotina isso não deve constituir uma limitação muito séria.

Este trabalho não procurou ser um estudo aprofundado da aplicação de *Métodos de Calibração Multivariada* em titulações em sistemas FIA, mas os resultados obtidos indicam claramente que esta metodologia pode ser uma importante alternativa para análises de misturas de ácidos fracos, e futuros projetos serão necessários para uma melhor avaliação.

PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS

O espectrofotômetro *Hadamard* desenvolvido de forma satisfatória e com excelente confiabilidade, principalmente devido ao controle do processo de aquisição dos dados, torna possível que futuros projetos estendam sua região espectral para o ultravioleta e infravermelho.

Pode-se pensar no desenvolvimento de um espectrofluorímetro com codificação *Hadamard* tanto da fonte de excitação como do espectro de emissão. Também é possível desenvolver um espectrofotômetro *Hadamard* para o ultravioleta e utilizá-lo como unidade de detecção em sistemas de quimiluminescência em fluxo, aproveitando seu potencial de conseguir adquirir espectros de maneira reprodutível mesmo com baixas intensidades de radiação luminosa.

Um aperfeiçoamento do instrumento desenvolvido, seria outra etapa importante na continuação do trabalho. Para isso seria necessário um aumento na resolução, investindo-se na construção de máscaras com um maior número de elementos. Neste caso, seria necessário encontrar uma alternativa ao processo de corrosão química utilizado, talvez com cortes à LASER, ou mesmo processos de fotocomposição. Um aumento na velocidade da aquisição dos espectros também poderia ser obtido a partir de mudanças na eletrônica e mecânica utilizada, com a substituição do sistema mínimo de computador TSI 1020 no controle do instrumento. No caso

de obter-se um aumento na taxa de aquisição de espectros, este instrumento seria muito útil no acompanhamento de reações muito rápidas.

Na região do infravermelho, surgem vários projetos para dar continuidade ao trabalho iniciado. O desenvolvimento de um instrumento para medidas de reflectância no infravermelho próximo, mais uma vez aproveitando o potencial da multiplexação, aparece como uma possibilidade muito interessante. Este instrumento, juntamente com os métodos quimiométricos desenvolvidos, como o PLS, pode tornar possível a análise quantitativa em sólidos sem a destruição da amostra.

Para monitoramento ambiental, poderia ser desenvolvido um espectrofotômetro *Hadamard* para a região do infravermelho para ser utilizado no campo, que pode ser muito mais simples e robusto que os normalmente utilizados.

A aplicação analítica realizada, que produziu resultados animadores, também possui várias frentes que ainda podem ser exploradas. Uma delas, seria a de aprofundar mais os estudos no sentido de uma melhor avaliação das perspectivas de utilização em amostras reais da metodologia baseada na titulação em FIA, com o tratamento dos dados através do PLS.

Baseado nos mesmos princípios utilizados nas titulações de ácidos fracos, poderão ser realizadas determinações de metais pela reação com complexantes que produzam espécies coloridas, explorando a dependência do pH na formação dos produtos. Também metodologias baseadas em titulações condutométricas ou potenciométricas, utilizando-se o PLS no tratamento dos dados podem ser

desenvolvidas.

Uma calibração das superfícies inteiras obtidas nas titulações utilizando-se um algoritmo do PLS para esta finalidade, com o conseqüente desenvolvimento do programa, seria um trabalho futuro mais especificamente voltado para a área de quimiometria. Neste caso, devido à enorme quantidade de dados a serem manipulados, seriam necessários microcomputadores dotados de mais memória, outra linguagem com maiores recursos, e mesmo um outro sistema operacional além do DOS. Também novos algoritmos para o PLS baseados em sistemas não lineares tem sido recentemente propostos^{106,107} e poderiam ser utilizados no desenvolvimento de novos programas para que sistemas que não se comportem de maneira totalmente linear possam ser tratados com o PLS.

Novas metodologias têm surgido para o tratamento específico dessas superfícies bilineares, como o EFA - *Envolving Factor Analysis* - e o GRAM - *Generalized Rank Annihilation Method* - que poderiam ser exploradas em dados obtidos no sistema FIA proposto. Por exemplo, com o GRAM seria possível realizar-se adições padrão nas titulações dos ácidos, e um menor número de amostras seriam necessárias para a sua aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. M. Harwit, "Hadamard Transform Analytical Systems", em *Transform Techniques in Chemistry*, P. R. Griffiths (editor), Heyden, London, 1978, Cap. 7, pags. 173-199.
2. J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis", Wiley, New York, 2a. ed., 1988, pags. 285-291.
3. M. A. Sharaf, D. L. Illman e B. R. Kowalski, "Chemometrics", Wiley, New York, 1986, pags. 179-295.
4. K. W. Bush e M. A. Bush, "Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis", Wiley, New York, 1990, pags. 491-493.
5. R. G. Brereton, "Fourier Transforms: Use, Theory and Applications to Spectroscopic and Related Data", *Chemom. Intell. Lab. Systems* **1** (1986) 17-31.
6. P. J. Treado e M. D. Morris, "The Hadamard Transform in Chemical Analysis and Instrumentation", *Anal. Chem.* **61** (1989) 723A-734A.

7. D. C. Tillota, R. M. Hammaker e W. G. Fateley, "A visible Near-Infrared Hadamard Transform Spectrometer based on a Liquid Crystal Spatial Light Modulator Array: A New Approach in Spectrometry", *Appl. Spectrosc.* 41 (1987) 727-734.
8. J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Homogeneous and Heterogeneous Systems. Flow Injection Analysis Today and Tomorrow", *Anal. Chim. Acta* 214 (1988) 1-27.
9. J. Ruzicka, E. H. Hansen e H. Mosbæk, "Flow Injection Analysis. Part IX. A New Approach to Continuous Flow Titration", *Anal. Chim. Acta* 92 (1977) 235-249.
10. S. D. Brown, R. S. Bear Jr. e T. B. Blank, "Chemometrics", *Anal. Chem.* 64 (1992) 22R-49R.
11. B. R. Kowalski, J. Ruzicka e G. A. Christian, "Flow Chemography - The Future of Chemical Education ?", *Trends Anal. Chem.* 9 (1990) 8-13.
12. K. R. Beebe e B. R. Kowalski, "An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis", *Anal. Chem.* 59 (1987) 1007A - 1017A.
13. J. D. Winefordner, J. J. Fitzgerald e N. Omenetto, "Review of Multielement Atomic Spectroscopic Methods", *Appl. Spectrosc.* 29 (1975) 369-383.

14. D. A. Skoog, D. M. West e F. J. Holler, "Fundamentals of Analytical Chemistry", Saunders College Publishing, Philadelphia, 6a. ed., 1992, pag. 555.
15. H. H. Willard, L. L. Merritt Jr., J. A. Dean, F. A. Settle Jr., "Instrumental Methods of Analysis", Wadworth Publishing Company, Belmont, 1988, pag. 125.
16. D. A. Skoog, J. J. Leary, "Principles of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, 4a. ed., 1992, pag. 112.
17. T. Török, J. Mika, E. Gegus, "Emission Spectrochemical Analysis", Adam Hilgler, Briston, 1978, pag. 249-259.
18. L. Brett, A. Kalsi, S. Cummins e D. Thombs, "Approach to the Computer Aided Interpretation of Spectra Produced on a Diode Array Sistem", *Anal. Proc.* 28 (1991) 224-231.
19. D. G. Jones, "Photodiode Array Detectors in UV-VIS Spectroscopy : Part I", *Anal. Chem.* 57 (1985) 1057A-1037A.
20. K. W. Bush e L. D. Benton, "Multiplex Methods in Atomic Spectroscopy", *Anal. Chem.* 55 (1983) 445A-460A.
21. G. A. Vanasse (ed.), "Spectrometric Techniques", Academic Press, New York, 1977, Cap. 1, pags. 2-69.

22. R. S. Macomber, "A Primer on Fourier Transform NMR", *J. Chem. Educ.* 62 (1985) 213-214.
23. C. L. Wilkins e M. L. Grass, "Fourier Transform Mass Spectrometry for Analysis", *Anal. Chem.* 53 (1981) 1661A-1676A.
24. D. E. Smith, "Data Processing in Electrochemistry", *Anal. Chem.* 48 (1976) 517A-526A.
25. P. R. Griffiths, "Fourier transform Infrared Spectrometry : Theory and Instrumentation", em *Transform Techniques in Chemistry*, P. R. Griffiths (editor), Heyden, London, 1978, Cap.5, pags. 132-133.
26. P. R. Griffiths, "Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy", John Wiley & Sons, New York, 1975, pag. 3-6.
27. K. S. Banerjee, "Weighing Designs", Marcel Decker, New York, 1975, Cap. 2, pags. 17-32.
28. E. D. Nelson, M. L. Fredmar, "Hadamard Spectroscopy", *J. Opt. Soc. Am.* 60 (1970) 1664-1669.
29. R. N. Ibbet, D. Spinall, J. F. Grainger, "Real-Time Multiplexing of Dispersed Spectra in any Wavelength Region", *Appl. Opt.* 7 (1968) 1089-1094.

30. N. J. A. Sloane e M. Harwit, "Masks for Hadamard Transform Optics and Weighing Designs", *Appl. Opt.* 15 (1976) 107-114.
31. M. J. E. Golay, "Static Multislit Spectrometry and its Application to the Panoramic Display of Infrared Spectra", *J. Opt. Soc. Am.* 41 (1951) 468-472.
32. J. A. Decker Jr. e M. O. Harwit, "Sequential Encoding with multislit Spectrometers", *Appl. Opt.* 7 (1968) 2205-2209.
33. P. Hansen e J. Strong, "High Resolution Hadamard Transform Spectrometer", *Appl. Opt.* 11 (1972) 502-506.
34. F. K. Fotiou e M. D. Morris, "Performance of a Hadamard Transform Photothermal Deflection Imager with Continuous Wave Laser Illumination", *Anal. Chem.* 59 (1987) 185-189.
35. N. J. A. Sloane, "Hadamard and Other Discrete Transforms", em *Fourier, Hadamard and Hilbert Transformations in Chemistry*, A. G. Marshall (editor), Plenum, New York, 1982, Cap. 2, pags. 45-67.
36. D. C. Tilotta, R. D. Freeman, W. G. Fateley, "Hadamard transform Visible Raman Spectrometry", *Appl. Spectrosc.* 41 (1987) 1280-1287.
37. D. C. Tilotta, R. M. Hammaker, W. G. Fateley, "The Feasibility of Near-Infrared Electrooptic Hadamard Transform

Raman Spectrometry", *Spectrochim. Acta* 42A (1987) 1493-1495.

38. S. A. Dyer, B. K. Harms, J. B. Park, T. W. Johnson e R. A. Dyer, "A Fast Spectrum-Recovery Method for Hadamard Transform Spectrometers having Nonideal Masks", *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 435-440.

39. T. W. Johnson, J. B. Park, S. A. Dyer, B. H. Harms e R. A. Dyer, "An Efficient Method for Recovering the Optimal Unbiased Linear Spectrum-Estimate from Hadamard Transform Spectrometers having Nonideal Masks", *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 746-750.

40. A. P. Bohlke, J. D. Tate, J. S. White, J. V. Paukstelis, R. M. Hammaker e W. G. Fateley, "Near-Infrared Hadamard Raman Spectrometry", *J. Mol. Structure (Theochem)* 200 (1991) 471-481.

41. S. A. Dyer, "Hadamard Transform Spectrometry", *Chemom. Intell. Lab. Systems* 12 (1991) 101-105.

42. P. Gottlieb, "A Television Scanning Scheme for a Detector-Noise-Limited System", *IEEE Trans. Inform. Theor.* IT-14 (1968) 428-433.

43. R. D. Swift, R. B. Wattson, J. A. Decker Jr., R. Paganetti, M. Harwit, "Hadamard transform Imager and Imaging Spectrometer", *Appl. Opt.* 15 (1976) 1595-1609.

-
44. P. J. Treado, M. D. Morris, "A Hadamard Transform Raman Microprobe", *Appl. Spectrosc.* **43** (1989) 190-193.
45. P. G. Phillips e M. Harwit, "Doubly Multiplexing Dispersive Spectrometer", *Appl. Opt.* **10** (1971) 2780-2781.
46. H. V. Malmstadt, C. G. Enke e S. R. Crouch, "Electronics and Instrumentation for Scientists", The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, 1981, pags. 99-100.
47. K. W. Busch e M. A. Busch, "Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis", Wiley, New York, 1990, pags. 120-121.
48. D. J. Malcolm-Lawes, "Microcomputers and Laboratory Instrumentation", Plenum, London, 2a. ed., 1988, pags. 201-218.
49. K. W. Busch e M. A. Busch, "Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis", Wiley, New York, 1990, pag. 361.
50. P. Horowitz e H. Hill, "The Art of Electronics", Cambridge University Press, London, 1987, pags. 484-489.
51. "Placa Experimental de Microcomputador - PEM - TSI 1020. Manual Técnico", Telemática Sistemas Inteligentes Ltda, 1980.
52. G. Currel, "Instrumentation" em *Analytical Chemistry by Open*

Learning, N. B. Chapman (editor), Wiley, New York, 1987, pags. 71-74.

53. P. Horowitz e H. Hill, "The Art of Electronics", Cambridge University Press, London, 1987, pags. 538-540.

54. "Huntsville Macro Assembler - Relocable Z80 version. User's Manual", Huntsville Microsystems, 1985.

55. "MICROSOFT QuickBasic - Programming in BASIC - version 4.5 for IBM Personal Computers and Compatibles", Microsoft Corporation, 1988.

56. C. Pasquini e R. J. Poppi, "A Versatile Graphics Screen Printer Routine for IBM PC's", *Laboratory Microcomputer* 11 (1992) 70-73.

57. T. C. O'Haver, "An Introduction to Signal Processing in Chemical Measurement", *J. Chem. Ed.* 68 (1991) A147-A150.

58. J. Fog e E. Osnes, "Calibration of Wavelength Scale on Spectrophotometers by Samarium and Neodymium Chlorides", *Analyst* 87 (1962) 760-761.

59. "Standard Methods for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet, Visible and Near Infrared Spectrophotometers", *Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 14.01, 1987, E 275-83,

- American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, 1987, pags. 408-423.
60. J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis", *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145-157.
61. W. E. Van Der Linden, "Membrane Separation in Flow Injection Analysis. Gas Diffusion", *Anal. Chim. Acta* 151 (1983) 359-369.
62. C. Pasquini, L. C. de Faria, "Flow Injection Determination of Ammonia in Kjeldahl Digests by Gas Diffusion and Conductometry", *Anal. Chim. Acta* 193 (1987) 19-27.
63. E. A. Zaggato, B. F. Reis, H. Bergamin F^o. e F. J. Krug, "Isothermal distillation in Flow Injection Analysis. Determination of Total Nitrogen in Plant Material", *Anal. Chim. Acta* 109 (1979) 45-54.
64. V. Kubán, "Liquid-Liquid Extraction Flow Injection Analysis", *Crit. Rev. Anal. Chem.* 22 (1991) 477-557.
65. J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis", Wiley, New York, 2a. ed., 1988, pags. 383-475.
66. E. H. Hansen, "Exploitation of Gradient Techniques in Flow Injection Analysis", *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329 (1988) 656-659.

67. M. Valcarcel Cases, M. D. Luque de Castro, "Análisis por Inyección en Flujo", Imprenta San Pablo, Córdoba, 1984, Cap. 1, pags. 9-43.
68. J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Recent Developments in Flow Injection Analysis. Gradient Techniques and Hydrodynamic Injection", *Anal. Chim. Acta* 145 (1983) 1-15.
69. S. Olsen, J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Gradient Techniques in Flow Injection Analysis. Stopped-Flow Measurements of the Activity of Lactate Dehydrogenase with Electronic Dilution", *Anal. Chim. Acta* 136 (1982) 101-112.
70. J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis. Part X. Theory, Techniques and Trends", *Anal. Chim. Acta* 99 (1978) 37-76.
71. Z. Fang, J. M. Harris, J. Ruzicka e E. H. Hansen, "Simultaneous Flame Photometric Determination of Lithium, Sodium, Potassium and Calcium by Flow Injection Analysis with Gradient Scanning Standard Addition", *Anal. Chem.* 57 (1985) 1457-1461.
72. J. Janata e J. Ruzicka, "Combination of Flow Injection Analysis and Voltammetry", *Anal. Chim. Acta* 139 (1982) 105-115.
73. H. Bergamin Fº, E. A. Zagatto, F. J. Krug e B. F. Reis, "Merging Zones in Flow Injection Analysis. Part I. Double Proportional Injector and Reagent Consumption", *Anal. Chim. Acta*

101 (1978) 17-23.

74. E. H. Hansen, J. Ruzicka, F. J. Krug e E. A. G. Zagatto, "Selectivity in Flow Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta* 148 (1983) 111-125.

75. D. Betteridge e B. Fields, "The Application of pH Gradients in Flow Injection Analysis. A Method for Simultaneous Determination of Binary of Metal Ions in Solution", *Anal. Chim. Acta* 132 (1981) 139-155.

76. M. Blanco, J. Gene, H. Iturriaga, S. MasPOCH e J. Riba, "Diode-Array Detectors in Flow Injection analysis. Mixture Resolution by Multi-Wavelength Analysis", *Talanta* 34 (1987) 987-993.

77. I. Lukkari, W. Lindberg, "Multicomponent Determinations in Flow Systems by Partial Least Squares Modeling", *Anal. Chim. Acta* 211 (1988) 1-10.

78. L. Nørgaard, "Determination of pH gradients and Acidity Constants in Flow Injection Analysis Systems by Envolving Factor Analysis", *Anal. Chim. Acta* 225 (1991) 143-148.

79. R. P. W. Scott, "Liquid Chromatography Detectors", Elsevier, Amsterdam, 1977, Cap. 5, pags. 223-245.

80. E. Sanchez e B. R. Kowalski, "Generalized Rank Annihilation Factor Analysis", *Anal. Chem.* **58** (1986) 496-499.
81. B. R. Kowalski, C. F. Bender, "Pattern Recognition. A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data", *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 5632-5639.
82. S. D. Brown, "Chemometrics", *Anal. Chem.* **62** (1990) 84R-101R.
83. R. G. Brereton, "Chemometrics in Analytical Chemistry. A Review", *Analyst* **112** (1987) 1635-1657.
84. S. Wold, K. Esbensen e P. Geladi, "Principal Component Analysis", *Chemom. Intell. Lab. Systems* **2** (1987) 37-52.
85. S. Wold, C. Albano, W. Dunn III, U. Edlund, K. Esbensen, P. Geladi, S. Hellberg, E. Johansson, W. Lindberg e M. Sjöström, "Multivariate Data Analysis in Chemistry", em *Chemometrics : Mathematics and Statistics in Chemistry*, B. R. Kowalski (editor), Reidel, Dordrecht, 1984, pags. 17-95.
86. H. Wold, "Nonlinear Estimation by Iterative Least Squares Procedures", em *Research Papers in Statistics*, F. Davis (editor), Wiley, New York, 1966, pags. 411-444.
87. T. Naes e H. Martens, "Multivariate Calibration II. Chemometric Methods", *Trends Anal. Chem.* **3** (1984) 266-271.

88. K. V. Mardia, J. T. Kent e J. M. Bibby, "Multivariate Analysis", Academic Press, London, 1979, pags. 244-246.
89. M. Sjöström, S. Wold, W. Lindberg, J. Persson, H. Martens, "A Multivariate Calibration Problem in Analytical Chemistry Solved by Partial Least Squares Models in Latent Variables", *Anal. Chim. Acta* 150 (1983) 61-70.
90. M. Otto, W. Wegscheider, "Spectrophotometric Multicomponent Analysis Applied to Trace Metal Determinations", *Anal. Chem.* 57 (1985) 63-69.
91. P. Geladi e B. R. Kowalski, "Partial Least Squares Regression A Tutorial. *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.
92. R. Manne, "Analysis of Two Partial Least Squares Algorithms for Multivariate Calibration", *Chemom. Intell. Lab. Systems* 2 (1987) 187-197.
93. A. Lorber e B. R. Kowalski, "A Note on the Use of the Partial Least Squares Method for Multivariate Calibration", *Appl. Spectrosc.* 42 (1988) 1572-1574.
94. L. M. Aleixo, O. E. S. Godinho e W. F. da Costa, "Potentiometric Study of Acid-Base Properties of Humic Acid Using Linear Functions for Treatment of Titration Data", *Anal. Chim. Acta* 257 (1992) 35-39.

95. W. Lindberg e B. R. Kowalski, "Evaluation of Potentiometric Acid-Base Titrations by Partial Least Squares Calibration", *Anal. Chim. Acta* 206 (1988) 125-135.
96. R. G. Bates, "Determination of pH. Theory and Practice", Wiley, New York, 1964, pag. 131.
97. J. Marcos, A. Ríos e M. Valcárcel, "Automatic Titrations in Unsegmented Flow Systems Based on Variable Flow-Rate Patterns", *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 489-494.
98. C. Pasquini e L. C. de Faria, "Operator-Free Flow Injection Analyser", *J. Autom. Chem.* 13 (1991) 143-146.
99. J. F. Tyson, "Peak Width and reagent Dispersion in Flow Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta* 179 (1986) 131-148.
100. S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen e J. Öhman, "Multi-Way Principal Components and PLS Analysis", *J. Chemometrics* 1 (1987) 41-56.
101. J. Öhman, W. Lindberg e S. Wold, "Data Reduction of Bilinear Matrices Prior to Calibration", *Anal. Chem.* 60 (1988) 2756-2760.
102. E. Bányai, "Acid-Base Indicators" em *Indicators*, E. Bishop (editor) Pergamon Press, Oxford, 1972, Cap. 3, pags. 65-170.

-
103. D. D. Perrin e B. Dempsey, "Buffers for pH and Metal Ion Control", Chapman and Hall, London, 1974, Apend. II, pags. 128-156.
104. O. Levenspiel, "Chemical Reaction Engineering", Cap. 9, 2a. ed., Wiley, New York, 1972.
105. A. E. Martell e R. M. Smith, "Critical Stability Constants", vol. 3 - Other Organic Ligands, Plenum Press, New York, 1977.
106. S. Wold, N. Kettaneh-Wold e B. Skagerberg, "Nonlinear PLS Modelling", *Chemom. Intell. Lab. Systems* 7 (1989) 53-65.
107. I. E. Frank, "A Nonlinear PLS Model", *Chemom. Intell. Lab. Systems* 8 (1990) 109-119.

APÊNDICE 1

PROGRAMA EM FORTRAN PARA ELABORAÇÃO DO DESENHO DO DISCO DAS MÁSCARAS

```
c Este programa faz o desenho do disco que contém as máscaras
c em um ploter (DIGICON)
c
  program mask5
  dimension m(64,64)
  pi=3.1416
  read(6,99)((m(i,j),j=1,63,i=1,64)
99 format(64i2)
  write(*,*) 'ALTURA : '
  read(*,*) dy
  write(*,*) 'LARGURA : '
  read(*,*) dx
  teta=(2.0*pi/64.0)
  r=7.1
  write(*,*) 'TETA=',teta*360.0/(2.0*pi)
  dteta=(2.0*pi/64.0)
  teta=-(2.0*pi/64.0)
  x0=18.3
  y0=x0
  pause
  fi=0.0
c inicialização do ploter
  call plots(1)
c circunferência maior
  do 1 i=1,1000
    x=x0+(1.0*cos(fi))
    y=y0+(1.0*sin(fi))
    fi=fi+(2.0*pi)/1000.0
    if(i.eq.1) then
      call plot(x,y,3)
    endif
1 continue
  call plot(x,y,2)
  call plot(x0,y0,3)
c circunferência menor
  do 2 i=1,1000
    x=x0+0.2*r*cos(fi)
    y=y0+0.2*r*sin(fi)
    fi=fi+(2.0*pi)/1000.0
```

```

    if(i.eq.1) then
        call plot(x,y,3)
    endif
2 continue
    call plot(x,y,2)
    call plot(x0,y0,3)
    do 10 i=1,64
c pontos para fixação
    if((i.eq.1).or.(i.eq.17).or.(i.eq.33).or.(i.eq.49)) then
        if(i.eq.1) then
            xx=x0+3.6
            yy=y0
        endif
        if(i.eq.17) then
            xx=x0
            yy=y0-3.6
        endif
        if(i.eq.33) then
            xx=x0-3.6
            yy=y0
        endif
        if(i.eq.49) then
            xx=x0
            yy=y0+3.6
        endif
        f1=0.0
        do 3 j=1,1000
            xx1=xx+0.05*r*cos(f1)
            yy1=yy+0.05*r*sin(f1)
            f1=f1+(2.0*pi)/1000.0
            if(j.eq.1) then
                call plot(xx1,yy1,3)
            endif
3        continue
            call plot(xx1,yy1,2)
        endif
        teta=teta+dteta
        call plot(x0,y0,3)
        x=0.0
        y=0.0
c elementos da máscara
        do 9 j=63,1,-1
            if(m(i,j).eq.0) then
                ipena=3
            else
                ipena=2
            endif
            y1=y+dy/2.0
            y2=y-dy/2.0
            x1=x+2.0*dx
            x2=x-2.0*dx
            call plot(x0+xr(x+r,y1,teta),y0+yr(x+r,y1,teta),3)
            call plot(x0+xr(x1+r,y1,teta),y0+yr(x1+r,y1,teta),ipena)
            call plot(x0+xr(x1+r,y2,teta),y0+yr(x1+r,y2,teta),ipena)

```

```

        call plot(x0+xr(x+r,y2,teta),y0+yr(x+r,y2,teta),ipena)
        call plot(x0+xr(x+r,y1,teta),y0+yr(x+r,y1,teta),ipena)
        x=x1+0.06
9      continue
c    marcadores ópticos
        x=x+(10.0*dx)
        y1=y+dy/2.0
        y2=y-dy/2.0
        x1=x+12.0*dx
        x2=x-12.0*dx
        if(i.eq.64) then
            call plot(x0+xr(x+r-11.0,y,teta),y0+yr(x+r-11.0,y,teta),3)
            call plot(x0+xr(x1+r-11.0,y,teta),y0+yr(x1+r-11.0,y,teta),2)
            call plot(x0+xr(x1+r-11.0,y2,teta),y0+yr(x1+r-11.0,y2,teta),2)
            call plot(x0+xr(x+r-11.0,y2,teta),y0+yr(x+r-11.0,y2,teta),2)
            call plot(x0+xr(x+r-11.0,y,teta),y0+yr(x+r-11.0,y,teta),2)
        endif
        call plot(x0+xr(x+r,y,teta),y0+yr(x+r,y,teta),3)
        call plot(x0+xr(x1+r,y,teta),y0+yr(x1+r,y,teta),2)
        call plot(x0+xr(x1+r,y2,teta),y0+yr(x1+r,y2,teta),2)
        call plot(x0+xr(x+r,y2,teta),y0+yr(x+r,y2,teta),2)
        call plot(x0+xr(x+r,y,teta),y0+yr(x+r,y,teta),2)
10     continue
        stop
        end
c
        function xr(x,y,teta)
            xr=x*cos(teta)+y*sin(teta)
            return
        end
c
        function yr(x,y,teta)
            yr=-x*sin(teta)+y*cos(teta)
            return
        end
c
c    subrotina p/ habilitar o ploter
c
        subroutine plots(i)
            go to(10,20)i
c    porta serial com1=aux
10     open(6,file='aux')
c    habilita o ploter, estabelece origem absoluta e resolução de 0.1 mm
        write(6,*)';H A ECM '
        go to 30
c    estabelece origem absoluta
20     write(6,*)' H A '
30     continue
        return
        end
c
c    subrotina plot
c
        subroutine plot(x,y,ic)

```

```

character*1 ll(5)
c ajuste de parâmetros para res. de 0.1 usa-se fator 100.0
ix=ifix(x*100.0)
iy=ifix(y*100.0)
if(ic.eq.999) then
    write(6,*)'U Z '
    return
endif
if(ic.gt.3) then
    n=8
else
    n=ic+4
endif
go to(10,20,50,50,50,20,10,40)n
10 write(6,*)'U '
go to 30
20 write(6,*)'D '
30 write(6,28)ix,iy
28 format(' ',i6,',',i6,',')
if(ic.lt.0) then
    write(6,*)'O '
endif
go to 50
c escolhe tipo de linha
40 ll(1)='D '
ll(2)=' '
ll(3)='L '
ll(4)=':'
ll(5)=' '
if((ic-4).le.9) then
    write(ll(4),29)ic-4
endif
29 format(a1)
write(6,27)(ll(i),i=1,5)
27 format(5a1)
go to 30
50 continue
return
end

```

[illegible]

00000001111111100000000111111111111111000000001111111100000000
1010101101010100101010110101010101010010101011010101001010101
011001111001100001100111100110011001100001100111100110000110011
110011010011001011001101001100110011001011001101001100101100110
00011111111000000001111111100001111000000001111111000000001111
101101010100101010110101010010110100101010101010101010010101011010
011110011000011001111001100001111000011001111001100001100111100
110100110010110011010011001011010010110011010011001011001101001
0000000000000000111111111111111111111111111111110000000000000000
101010101010101101
0110011001100111100110011001100110011001100110011000011001100110011
1100110011001101001100110011001100110011001100110010110011001100110
000111100001111111100001111000011110000111100000000111100001111
1011010010110101010010110100101101001011010010101010101010101010
011110000111100110000111100001111000011110000110011110000111100
110100101101001100101101001011010010110100101100110100101101001
000000011111111111111110000000011111111000000000000000011111111
1010101101010101010101001010101101010100101010101010101010101010
011001111001100110011000011001111001100001100110011001111001100
110011010011001100110010110011010011001011001100110011010011001
000111111110000111100000000111111110000000011110000111111110000
101101010100101101001010101101010100101010110100101101010100101
011110011000011110000110011110011000011001111000011110011000011
110100110010110100101100110100110010110011010010110100110010110

APÊNDICE 3

PROGRAMA EM ASSEMBLER PARA COMUNICAÇÃO ESPECTROFOTÔMETRO/MICROCOMPUTADOR

Equates:

```
UPDAD          ; subrotina do programa monitor
ORG 800h       ; início do programa
```

INICIO *****

```
LXI SP, 20C0h ; carrega o ponteiro da pilha
MVI A, 08h    ; carrega acumulador A para
SIM           ; setar a mascara de interrupcoes
CALL MODEUSART ; programa a usart
```

MENU *****

desvia o programa para o endereco apontado por HL

```
MENU: LXI D, 0DESf ; carrega DE com 0DESf
CALL UPDAD         ; mostra 0DESf no campo de dados
CALL INIADD        ; chama iniadd (carrega par HL)
PCHL               ; desvia programa para endereco apontado por HL
```

LOAD *****

carrega programa no SDK 8085 atraves do microcomputador

```
LOAD: LXI D, 10ADh ; carrega DE com 10AD
CALL UPDAD         ; mostra 10AD no campo de dados
CALL MODEDATA      ; chama MODEDATA (formato dos dados)
RBYTE: CALL RECEIVE ; chama receive (recebe um byte)
MOV M, A           ; move byte recebido para a memoria apontada por HL
INX H              ; incrementa endereco da memoria (par HL)
DCX D              ; decrementa contador de bytes (par DE)
MOV A, D           ; verifica se todos os bytes foram enviados
ORA E              ; (ora = 1, se A ou E = 1)
JNZ RBYTE          ; se nao, retorna para receber outro byte
JMP MENU           ; se sim, desvia para endjob (final de tarefa)
```

MODEDATA *****

Recebe o formato da mensagem a ser enviada:

- no. de bytes
- endereço inicial do programa a ser recebido

Parte desta subrotina é constituída por INIADD, que recebe o endereço inicial de um programa a ser executado através do microcomputador (ver MENU).

```
MODEDATA: CALL RECEIVE      ; no. de bytes
           MOV D,A           ; coloca o byte no contador de bytes
           CALL RECEIVE      ; usando o par DE
           MOV E,A           ; 1o. o byte mais e depois o menos significativo
INIADD:   CALL RECEIVE      ; carrega o par HL com
           MOV H,A           ; o endereço inicial do programa
           CALL RECEIVE      ; a ser recebido ou a ser executado
           MOV L,A           ; 1o. o byte mais e depois o menos significativo
           RET               ; retorna
```

RECEIVE *****

Recebe dois caracteres ascii (de 0 a F) do microcomputador, transformando-os em um byte, usando o registrador C e armazenando o resultado final no acumulador A.

```
RECEIVE: MVI C, 00h         ; limpa registrador C
           CALL INUSART      ; le caracter mais significativo do byte
           CALL ASCBYTE      ; chama ascbyte
           RLC               ; rotacao do acumulador A para a esquerda,
           RLC               ; transformando o caracter lido no caracter
           RLC               ; mais significativo do byte (acumulador A tera
           RLC               ; zero nos 4 bits menos significativos)
           MOV C,A           ; resultado armazenado em C
           CALL INUSART      ; le caracter menos significativo do byte
           CALL ASCBYTE      ; chama ascbyte
           ADD C              ; soma os dois caracteres
           RET               ; retorna
```

ASCBYTE *****

Transforma um caracter ascii no binario correspondente:

30h = 0, 31h = 1, ... 39h = 9 e 41h = A, 42h = B, ... 46h = F.

```
ASCBYTE: SUI 30h            ; subtrai 30
           CPI 0Ah          ; compara com A
           RM               ; se menor, retorna (conversao efetuada)
           SUI 07h          ; se nao, subtrai 7 (conversao efetuada)
           RET              ; retorna
```

MODEUSART *****

Programa a interface de comunicacao 8251 (usart):

4E => clock = 16 x Baud, 8 bits/caracter, paridade desabilitada, 1 stop bit

27 => transmissao e recepcao

```
MODEUSART:MVI A, 4Eh      ; instrucao do modo de operacao da usart
          OUT 29h
          MVI A, 27h      ; instrucao de comando da usart
          OUT 29h
          RET              ; retorna
```

INUSART *****

Le a usart (SDK 8085 recebe um caracter ascii enviado pelo microcomputador)

```
INUSART: IN 29h           ; le status da usart para verificar
          ANI 02h         ; se existe dado na usart para ser lido
          JZ INUSART      ; se nao, verifica status novamente
          IN 28h          ; se existe, le usart
          RET              ; retorna

          END
```

APÊNDICE 4

PROGRAMA EM ASSEMBLER PARA CONTROLE DO ESPECTROFOTÔMETRO HADAMARD

Equates:

```
UPDAD EQU 0363h    ; subrotina do monitor
OUTPT EQU 02B7h    ; subrotina do monitor
MENU EQU 0809h     ; subrotina do programa principal
MODEDATA EQU 082Ah ; subrotina do programa principal
RECEIVE EQU 083Bh  ; subrotina do programa principal
INUSART EQU 0861h  ; subrotina do programa principal

ORG 3000h          ; inicio do programa
```

RUN *****

Obtem os espectros, possibilitando inicialmente limpar as memórias
onde estes espectros serao armazenados

```
RUN: MVI A, 02h      ; Pa = in , Pb = out , Pc = in
      OUT 20h
      MVI A, 01h     ; start conversion (wr) = 1
      OUT 22h        ; inicializacao do AD
      CALL SAVEBYTE  ; salva byte da porta B
RUN2: MVI A, 00h     ; campo de enderecos
      MVI B, 00h     ; ponto decimal desligado
      LXI H, 2020h   ; endereco do texto
      CALL OUTPT     ; subrotina para escrever mensagem
      CALL INUSART   ; espera comando do micro
      CPI 49h        ; tecla I do micro determina as condicoes
      JZ INIPAR
      CPI 43h        ; tecla C do micro limpa as memórias
      JZ CLEAR
      CPI 53h        ; tecla S do micro obtem os espectros
      JZ SPECT
      CPI 45h        ; tecla E do micro envio dados para o micro
      JZ SEND
      CPI 42h        ; tecla B do micro inicializa o FIA
      JZ FIA
      CPI 46h        ; tecla F do micro retorna para o menu principal
      JZ MENU
```

```

CPI 4Fh          ; tecla O do micro liga a valvula
JZ VALOP
CPI 4Eh          ; tecla N do micro desliga a valvula
JZ VALCL
JMP RUN2         ; nada ocorre se outra tecla for apertada

```

INIPAR *****

coloca valor na posicao de memoria

```

INIPAR: MVI A, 00h      ; campo de enderecos
        MVI B, 00h      ; ponto decimal desligado
        LXI H, 2024h    ; endereco do texto
        CALL OUTPT      ; subrotina para escrever a mensagem
        CALL MODEDATA   ; chama modedata (formato dos dados)
NREC:   CALL RECEIVE    ; chama receive (recebe um byte)
        MOV M,A         ; byte recebido para memoria apontada por HL
        INX H           ; incrementa par HL
        DCX D           ; decrementa par DE
        MOV A,D         ; move conteudo de D para acumulador A
        ORA E           ; testa se todos bytes foram enviados
        JNZ NREC        ; se nao for zero, recebe novo byte
        JMP RUN2        ; retorna para o menu de run

```

CLEAR *****

Limpa as memorias do SDK 8085 onde serao armazenados os espectros

```

CLEAR:  MVI A, 00h      ; campo de enderecos
        MVI B, 00h      ; ponto decimal desligado
        LXI H, 2028h    ; endereco do texto
        CALL OUTPT      ; subrotina para escrever a mensagem
        LXI H, 3200h    ; carrega HL com endereco inicial das memorias
        MVI D, 00h      ; carrega D com zero
CMEMO:  MOV M,D         ; zera a memoria apontada por HL
        INX H           ; incrementa par HL
        MOV A,H         ; verifica byte mais significativo da memoria
        CPI 3Fh         ; se = 3F, toda a memoria foi limpa
        JM CMEMO        ; se nao, continua limpando
        JMP RUN2        ; retorna para o menu de RUN

```

SPECT *****

obtencao dos espectros

```

SPECT:  CALL SPEC       ; leitura e armazenamento dos espectros
        JMP RUN2        ; retorna para o menu de RUN

```

SPEC *****

Leitura e armazenamento dos espectros na memória apontada por HL

```

SPEC: MVI A, 00h      ; campo de enderecos
      MVI B, 00h      ; ponto decimal desligado
      LXI H, 202Ch    ; endereco do texto
      CALL OUTPT      ; subrotina para escrever a mensagem
      LXI H, 2000h    ; aponta par HL para posicao de memoria 2000
      MOV C, M        ; move valor da memoria para C
      LXI H, 3200h    ; carrega Hl com o endereco inicial dos espectros
      CALL OPTREF     ; monitora opto-refletor
NREV: MVI D, 40h      ; carrega contador D para as 64 mascaras
MASK: CALL OPTSWI     ; monitora chave-optica
      CALL CONVER     ; subrotina para ler o AD
      DCR D           ; decrementa D (nova mascara)
      JNZ MASK        ; proxima mascara
      DCR C           ; decrementa C (nova volta)
      JNZ NREV        ; proxima volta
      MVI A, 23h      ; move 23 (caracter #) para acumulador A
      CALL OUTUSART   ; envia o byte para o micro
      RET

```

OPTSWI *****

monitora chave-optica

```

OPTSWI: IN 23h        ; le o opto-sensor
      ANI 02h         ; verifica o nivel
      JNZ OPTSWI      ; se estiver alto, volta e le novamente
MIRROR: IN 23h        ; le opto-sensor
      ANI 02h         ; verifica o nivel
      JZ MIRROR       ; se estiver baixo, volta e le novamente
      RET

```

OPTREF *****

monitora opto-refletor

```

OPTREF: IN 23h        ; le o opto-sensor
      ANI 04h         ; verifica o nivel
      JZ OPTREF       ; se estiver baixo, volta e le novamente
DARK: IN 23h          ; le o opto-sensor
      ANI 04h         ; verifica o nivel
      JNZ DARK        ; se estiver alto, volta e le novamente
      RET

```

CONVER *****

Leitura do AD

```

CONVER: PUSH H        ; salva par HL
      LXI H, 2001h    ; aponta par HL para posicao 2001 da memoria

```



```

        MOV B, M           ; coloca em B o valor da memoria
        POP H              ; recupera o par HL
COM:    CALL READBYTE      ; le byte porta B
        ANI 06h            ; Pb(0)=0
        OUT 22h            ; )pulsa Pb(0) para iniciar conversao
        ORI 01h            ; Pb(0)=1
        OUT 22h
        CALL SAVEBYTE      ; salva byte porta B
END:    IN 23h             ; verifica final de conversao
        ANI 01h            ; se nao terminou
        JZ END             ; verifica novamente
        IN 21h             ; le o AD e coloca o valor em A
        MOV M,A            ; move A p/ memoria apontada por HL
        INX H              ; incrementa par HL
        DCR B              ; decrementa B (para nova leitura do AD)
        JNZ COM            ; outra leitura p/ mesma mascara
        RET                ; retorna p/ subrotina SPECT

```

SEND *****

envio de espectros

```

SEND:   CALL SENDATA       ; envio de dados
        JMP RUN2           ; retorna para o menu de RUN

```

SENDATA *****

envia dados (espectros) para o microcomputador

```

SENDATA: MVI A, 00h        ; campo de enderecos
        MVI B, 00h        ; ponto decimal desligado
        LXI H, 2030h      ; endereco do texto
        CALL OUTPT        ; subrotina para escrever a mensagem
        LXI H, 2005h      ; aponta par HL p/ 2005 (no. bytes)
        MOV D, M           ; move valor da memoria para E
        INX H              ; incrementa par HL
        MOV E,M           ; move valor da memoria para D
        LXI H, 3200h      ; aponta par HL p/ 3200h
TBYTE:  CALL TRANSMIT      ; chama transmit (envia um byte para micro)
        INX H              ; incrementa o endereco da memoria (par HL)
        DCX D              ; decrementa contador de bytes (par DE)
        MOV A,D            ; verifica se todos os bytes foram enviados
        ORA E              ; (ora = 1, se A ou E = 1)
        JNZ TBYTE         ; se nao, retorna para enviar outro byte
        RET

```

TRANSMIT *****

O byte existente na memoria apontada por HL é enviado ao microcomputador

```

TRANSMIT: MOV A,M          ; memoria apontada por HL colocada em A
        CALL OUTUSART      ; envia o byte para o micro
        RET                ; retorna

```

OUTUSART *****

Escreve na usart (SDK 8085 envia um byte para o microcomputador)

```
OUTUSART: PUSH PSW          ; salva conteudo de A na pilha
CHECK: IN 29h              ; le status da usart para verificar
      ANI 01h              ; se o caracter pode ser enviado.
      JZ CHECK              ; se nao, verifica status novamente
      POP PSW              ; coloca em A caracter a ser enviado
      OUT 28h              ; envia o caracter
      RET                  ; retorna
```

FIA *****

Obtém os espectros com o FIA

```
FIA: MVI A, 00h            ; campo de enderecos
      MVI B, 00h            ; ponto decimal desligado
      LXI H, 2034h          ; endereco do texto
      CALL OUTPT            ; subrotina para escrever a mensagem
      CALL OPTREF           ; monitora opto-refletor
      LXI H, 2002h          ; aponta par HL p/ 2002 (no. espectros)
      MOV B, M              ; move valor da memoria para B
      CALL INJECT           ; injecao no FIA
      LXI H, 2003h          ; aponta par HL p/ 2003 (tempo apos injecao)
      MOV C, M              ; move valor da memoria para C
NTEMP10: CALL ATRAS010      ; conta tempo de 1 seg.
      DCR C                 ; decrementa C (tempo = C*1seg.)
      JNZ NTEMP10           ; nova contagem de tempo
NSPECT: LXI H, 2004h        ; aponta par HL p/ 2004 (tempo entre leituras)
      MOV C, M              ; move valor da memoria para C
      PUSH B                ; salva par BC
      CALL SPEC             ; leitura do espectro
      CALL SENDATA          ; envio dos espectros
      POP B                 ; recupera par BC
NTEMP1: CALL ATRAS01        ; conta tempo de 0.1 seg.
      DCR C                 ; decrementa C (tempo = C*0.1seg.)
      JNZ NTEMP1           ; nova contagem de tempo
      DCR B                 ; decrementa B
      JNZ NSPECT            ; proximo espectro
      MVI A, 21h            ; move 21 (caracter !) para acumulador A
      CALL OUTUSART         ; envia o byte para o micro
      JMP RUN2
```

INJECT *****

Controle do injetor do FIA

```
INJECT: CALL READBYTE      ; le byte porta B
      ORI 02h              ; Pb(1)=1
      OUT 22h              ;
      CALL SAVEBYTE        ; salva byte porta B
      LXI H, 2007h          ; aponta par HL p/2007 (tempo de amostragem)
      MOV D, M              ; move valor da memoria para D
```

```

ITEMP: PUSH D          ; salva D
      CALL ATRAS010    ; conta tempo de 1 seg.(D*1)
      POP D           ; recupera D
      DCR D           ; decrementa D
      JNZ ITEMP       ; nova contagem de tempo
      CALL READBYTE    ; le porta B
      ANI 05h         ; Pb(1)=0
      OUT 22h
      CALL SAVEBYTE    ; salva byte porta B
      RET

```

ATRAS01 *****

atraso de 0.1 segundos

```

ATRAS01: LXI D, 2C01h   ; carrega par DE com 2C00h
      DECRC: DCR D      ; decrementa par DE
      MOV A,E          ; move para A valor de E
      CPI 00h          ; compara com 00h
      JNZ DECRC        ; volta se nao for 00h
      MOV A,D          ; move para A valor de D
      CPI 00h          ; compara com 00h
      JNZ DECRC        ; volta se nao for 00h
      RET

```

ATRAS010 *****

atraso de 1 segundo

```

ATRAS010: MVI D, 0Ah    ; carrega acumulador A com valor 0Ah(10d)
      NATRAS0: PUSH D    ; salva A
      CALL ATRAS01      ; conta tempo de 0.1 seg.
      POP D            ; recupera A
      DCR D            ; decrementa A
      JNZ NATRAS0      ; nova contagem de tempo
      RET

```

READBYTE *****

le valor do endereco 2040h

```

READBYTE: PUSH H        ; salva par HL
      LXI H, 2040h      ; aponta par HL para 2040h
      MOV A, M          ; move valor para acumulador A
      POP H            ; recupera par HL
      RET

```

SAVEBYTE *****

salva valor no endereco 2040h

```

SAVEBYTE: PUSH H        ; salva par HL
      LXI H, 2040h      ; aponta par HL para 2040h

```

```

MOV M, A      ; move valor para memoria apontada para 2040h
POP H         ; recupera par HL
RET

```

VALOP *****

aciona valvula de amostragem

```

VALOP: CALL READBYTE    ; le byte porta B
      ORI 04h           ; Pb(2)=1
      OUT 22h
      CALL SAVEBYTE     ; salva byte porta B
      JMP RUN2

```

VALCL *****

desliga valvula de amostragem

```

VALCL: CALL READBYTE    ; le porta B
      ANI 03h           ; Pb(2)=0
      OUT 22h
      CALL SAVEBYTE     ; salva byte porta B
      JMP RUN2

```

END

APÊNDICE 5

PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA

A OBTENÇÃO DOS ESPECTROS

```
SUB ESPECTRO (rev, rm, spechad(), spectrans())
' Este subprograma realiza a obtenção dos dados de intensidade, e a trans-
' formada de Hadamard
' Requer os seguintes subprogramas auxiliares : initload, runspec, baserecor,
' recordspec, meanspec, ordref, hadamard, smooth, waitbyte
' As seguintes matrizes devem ser dimensionadas como globais :
' DIM SHARED had(63,63), readdata(3150), specint(63)
' DIM SHARED spechad(63), spectrans(63)
' No programa principal deve ser aberta a comunicação serial :
' OPEN "COM1:9600,N,8,1,RS,CDO,CS0,DS0,RB4000,TB4000" FOR RANDOM AS #3
' Os parâmetros do programa são os seguintes :
' rev : número de voltas consecutivas no disco em cada espectro
' rm : número de leituras por máscara
' spechad : vetor contendo as leituras por máscara
' spectrans : vetor contendo o espectro de intensidades

    nbytes = 64 * rev * rm                'número de bytes
    CALL initload(had())
    CALL runspec
    WHILE as$ <> "#"                        ' Espera pelo caracter "#"
        CALL waitbyte(as$)
    WEND
    CALL sendinit
    CALL recordspec(nbytes, readdata())
    CALL meanspec(rev, rm, readdata(), specint())
    CALL ordref(specint(), spechad())
    CALL hadamard(had(), spechad(), spectrans())
    CALL smooth(spectrans())
END SUB

SUB hadamard (had(), spechad(), spectrans())
' realiza a transformada de Hadamard
    DIM hadinv(64, 64)
    FOR i = 1 TO 63
        spectrans(i) = 0
    NEXT i
    FOR i = 1 TO 63
        FOR j = 1 TO 63
            IF had(i, j) = 0 THEN hadinv(i, j) = -(1 / 32)
```

```

        IF had(i, j) = 1 THEN hadinv(i, j) = (1 / 32)
    NEXT j
NEXT i
FOR i = 1 TO 63
    FOR j = 1 TO 63
        spectrans(i) = spectrans(i) + hadinv(i, j) * spechad(j)
    NEXT j
NEXT i
END SUB

```

```

SUB initload (had())
' carrega a matriz-S do disco
OPEN "HADAMARD.ASC" FOR BINARY ACCESS READ AS #1
FOR i = 1 TO 63
    FOR j = 1 TO 63
        ins$ = INPUT$(1, #1)
        had(i, j) = VAL(ins$)
    NEXT j
NEXT i
CLOSE #1
END SUB

```

```

SUB meanspec (rev, rm, readdata(), specint()) STATIC
' calcula as médias
DIM spectemp(64)
ERASE spectemp, specint
k = 1
FOR l = 1 TO rev
    A% = (l - 1) * (64 * rm) + 1
    b% = l * (64 * rm)
    FOR i = A% TO b% STEP rm
        FOR j = 1 TO rm
            spectemp(k) = spectemp(k) + readdata(i + j - 1)
        NEXT j
        k = k + 1
    NEXT i
    m = 1
    c% = (l - 1) * 64 + 1
    d% = l * 64
    FOR i = c% TO d%
        specint(m) = specint(m) + (spectemp(i) / rm)
        m = m + 1
    NEXT i
NEXT l
FOR j = 1 TO 64
    specint(j) = specint(j) / rev
NEXT j
END SUB

```

```

SUB ordref (specint(), spechad())
' reordena os dados lidos para ficarem de acordo com a matriz-S
set = 47
k = 1
FOR l = (set - 1) TO 1 STEP -1

```

```
        spechad(k) = specint(l)
        k = k + 1
    NEXT l
    FOR h = 64 TO (set + 1) STEP -1
        spechad(k) = specint(h)
        k = k + 1
    NEXT h
END SUB

SUB recordspec (nbytes, readdata())
' realiza a aquisição dos dados
    FOR i = 1 TO nbytes
        in$ = INPUT$(1, #3)
        readdata(i) = ASC(in$)
    NEXT i
END SUB

SUB runspec
' comando para início da aquisição
    PRINT #3, "S";
END SUB

SUB sendinit
' comando para o envio dos dados
    PRINT #3, "E";
END SUB

SUB smooth (spectrans())
' filtro digital utilizado
    FOR i = 2 TO npoint - 1
        spectrans(i-1) = ((spectrans(i-1) + spectrans(i) + spectrans(i+1)) / 3
    NEXT i
END SUB

SUB waitbyte (as$)
' recebe bytes do sistema mínimo SDK 1020
    as$ = INPUT$(1, #3)
END SUB
```

APÊNDICE 6

PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA

CÓPIA DA TELA GRÁFICA

SUB printscreen (x1%, x2%, y1%, y2%, br%, linv%, fl%, mode\$, dens\$) STATIC

' Este subprograma realiza a cópia da tela gráfica, podendo ser escolhida
' a parte a ser copiada

' Os parâmetros do programa são os seguintes:

' x1% : ordenada inicial esquerda, em pixels, da tela a ser copiada

' x2% : ordenada final direita, em pixels, da tela a ser copiada

' y1% : ordenada inicial do topo, em pixels, da tela a ser copiada

' y2% : ordenada final de baixo, em pixels, da tela a ser copiada

' linv% : linhas em branco no topo do papel

' br% : brancos à esquerda do papel

' fl% : escape de um pixel na vertical (para monitores CGA)

' fl% = 1 o escape é ativado

' mode\$: "p" ou "l" para figura na horizontal ou vertical

' dens\$: controle da densidade da impressão

' "L" densidade simples

' "H" densidade dupla

DIM dpr%(640)

cr\$ = CHR\$(13): esc\$ = CHR\$(27): sp\$ = CHR\$(32)

extn\$ = CHR\$(0): lin1\$ = CHR\$(10)

IF y2% < y1% OR x2% < x1% THEN EXIT SUB

IF dens\$ = "l" OR dens\$ = "L" THEN den = 0

IF dens\$ = "h" OR dens\$ = "H" THEN den = 1

VIEW

WINDOW

WIDTH LPRINT 255

' número de colunas igual a 255

LPRINT esc\$; "@";

' inicializa a impressora

LPRINT esc\$; "3"; CHR\$(11);

' espaçamento da linha 11/216''

FOR N% = 1 TO linv%

 LPRINT lin1\$

' linhas em branco no topo

NEXT

SELECT CASE mode\$

 CASE IS = "l", "L"

 d% = br% + y2% - y1%: A% = x1%: t% = y2% - y1%

 GOSUB numbyte

 DO WHILE A% < x2%

 FOR x% = 0 TO 7

 FOR y% = y2% TO y1% STEP -1

 con% = POINT((x% + A%), y%)


```

        IF con% > 0 THEN
            dpr%(y2% - y%) = dpr%(y2% - y%) + 2 ^ (7 - x%)
        END IF
    NEXT y%
NEXT x%
GOSUB ptrow
GOSUB arow
IF keys$ = "c" OR keys$ = "C" THEN EXIT DO
A% = A% + 8
LOOP
CASE IS = "p", "P"
    d% = br% + x2% - x1%: f1% = 1: A% = y1%: t% = x2% - x1%
    GOSUB numbyte
    DO WHILE A% < y2%
        FOR y% = 0 TO 7
            FOR x% = x1% TO x2%
                con% = POINT(x%, (y% + A%))
                IF con% > 0 THEN
                    dpr%(x% - x1%) = dpr%(x% - x1%) + 2 ^ (7 - y%)
                END IF
            NEXT x%
        NEXT y%
        GOSUB ptrow
        GOSUB arow
        IF keys$ = "c" OR keys$ = "C" THEN EXIT DO
        A% = A% + 8
    LOOP
CASE ELSE
    STOP
END SELECT
LPRINT CHR$(12);
LPRINT esc$; "@";
EXIT SUB

numbyte:
    'numero de bytes gráficos a serem enviados (b%*256 + k%)
    IF f1% = 0 THEN d% = (y2% * 2) + br%
    b% = INT(d% / 256)
    k% = d% MOD 256

RETURN

ptrow:
    'modo gráfico e número de bytes gráficos a serem enviados
    LPRINT esc$; "*"; CHR$(den); CHR$(k%); CHR$(b%);
    OPEN "LPT1:BIN" FOR OUTPUT AS #4
    'abre driver gráfico como
    'binário

    FOR j% = 1 TO br%
        PRINT #4, CHR$(0);
    NEXT
    'número de brancos à esquerda

    FOR prn% = 1 TO t%
        IF f1% = 0 THEN PRINT #4, extn%;
        PRINT #4, CHR$(dpr%(prn% - 1));
    NEXT
    'imprime o byte gráfico
    CLOSE #4

```

```
        LPRINT esc$; "J"; CHR$(11);          '11/216 polegadas
        LPRINT cr$;                          'retorno de carro
RETURN

arow:
        ERASE dpr%
        keys$ = INKEY$
RETURN

END SUB
```

APÊNDICE 7

PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA OS CÁLCULOS COM O PLS

```
SUB plsm(no,nvx,nvy,nf,x,y,w,t,u,p,q,b)
```

```
' Este subprograma realiza os cálculos do PLS para a construção  
' do modelo na fase de treinamento  
' Os parâmetro são os seguintes :  
' no : número de objetos  
' nvx : número de variáveis independentes  
' nvy : número de variáveis dependentes  
' nf : número de componentes principais a serem utilizados  
' x : matriz das variáveis independentes  
' y : matriz das variáveis dependentes  
' w : matriz dos pesos  
' t : matriz dos scores de x  
' u : matriz dos scores de y  
' p : matriz dos loadings de x  
' q : matriz dos loadings de y  
' b : vetor com os coeficientes de regressão
```

```
CONST dimno=50, dimnvx=50, dimnvy=50, dimnf=10  
DIM x(dimno,dimnvx), y(dimno,dimnvy)  
DIM w(dimnvx,dimnf), p(dimnvx,dimnf)  
DIM q(dimnvy,dimnf), DIM b(dimnf)  
DIM t(dimno,dimnf), u(dimno,dimnf)
```

```
FOR in = 1 TO nf  
  FOR i = 1 TO no  
    u(i, in) = y(1, i)  
    t(i, in) = x(1, i)  
  NEXT i  
  cn = 0  
  DO  
    FOR i = 1 TO no  
      o(i, in) = t(i, in)  
    NEXT i  
    wn = 0  
    FOR j = 1 TO nvx  
      w(j, in) = 0  
      uquad = 0  
      FOR i = 1 TO no
```

```

        w(j, in) = w(j, in) + u(i, in) * x(j, i)
        uquad = uquad + u(i, in) * u(i, in)
    NEXT i
    w(j, in) = w(j, in) / uquad
    wn = wn + w(j, in) * w(j, in)
NEXT j
wn = SQR(wn)
FOR j = 1 TO nvx
    w(j, in) = w(j, in) / wn
NEXT j
FOR i = 1 TO no          ' scores bloco-X
    t(i, in) = 0
    wquad = 0
    FOR j = 1 TO nvx
        t(i, in) = t(i, in) + x(j, i) * w(j, in)
        wquad = wquad + w(j, in) * w(j, in)
    NEXT j
    t(i, in) = t(i, in) / wquad
NEXT i
qn = 0                  ' loadings bloco-Y
FOR j = 1 TO nvx
    q(j, in) = 0
    tqquad = 0
    FOR i = 1 TO no
        q(j, in) = q(j, in) + t(i, in) * y(j, i)
        tqquad = tqquad + t(i, in) * t(i, in)
    NEXT i
    q(j, in) = q(j, in) / tqquad
    qn = qn + q(j, in) * q(j, in)
NEXT j
qn = SQR(qn)
FOR j = 1 TO nvx
    q(j, in) = q(j, in) / qn
NEXT j
FOR i = 1 TO no          ' scores bloco-Y
    u(i, in) = 0
    qquad = 0
    FOR j = 1 TO nvx
        u(i, in) = u(i, in) + y(j, i) * q(j, in)
        qquad = qquad + q(j, in) * q(j, in)
    NEXT j
    u(i, in) = u(i, in) / qquad
NEXT i
d1 = 0 : t1 = 0
FOR i = 1 TO no
    d1 = d1 + (t(i, in) - o(i, in)) * (t(i, in) - o(i, in))
    t1 = t1 + t(i, in) * t(i, in)
NEXT i
d1 = SQR(d1): t1 = SQR(t1)
cn = cn + 1
IF cn = 25 THEN EXIT DO
df = d1 / t1
LOOP WHILE df > .000001
pn = 0                  ' loadings bloco-X

```

```

SUB pred(nop,nvx,nvy,nfp,xpred,ypred,w,p,q,b)
' Este subprograma realiza os cálculos do PLS para a previsão
' de amostras desconhecidas na fase de teste
' Os parâmetros são os seguintes:
' nop : número de amostras desconhecidas
' nvx : número de variáveis independentes
' nvy : número de variáveis dependentes
' nfp : número de componentes principais a serem utilizados
' xpred : matriz de variáveis independentes
' ypred : matriz de variáveis dependentes prevista pelo modelo
' w : matriz de pesos determinada na fase de treinamento
' p : matriz de loadings de x determinada na fase de treinamento
' q : matriz de loadings de y determinada na fase de treinamento
' b : vetor dos coeficientes de regressão determinado na fase de
' treinamento
' tp : matriz de scores de xpred

CONST dimnop=50, dimnvx=50, dimnvy=50, dimnfp=10
DIM xpred(dimnop,dimnvx), ypred(dimnop,dimnvy)
DIM w(dimnvx,dimnfp), p(dimnvx,dimnfp)
DIM q(dimnvy,dimnfp), b(dimnfp)
DIM tp(dimnop,dimnfp)

FOR in = 1 TO nfp
  FOR k = 1 TO nop
    FOR j = 1 TO nvx
      'scores de xpred
      tp(k, in) = tp(k, in) + xpred(j, k) * w(j, in)
    NEXT j
  NEXT k
  FOR j = 1 TO nvx
    FOR k = 1 TO nop
      xpred(j, k) = xpred(j, k) - (tp(k, in) * p(j, in))
    NEXT k
  NEXT j
  FOR i = 1 TO nvy
    FOR k = 1 TO nop
      'previsão
      ypred(i, k) = ypred(i, k) + (b(in) * tp(k, in) * q(i, in))
    NEXT k
  NEXT i
NEXT in
END SUB

```

APÊNDICE 8

PROGRAMA EM QUICKBASIC 4.5 PARA O DESENHO DAS SUPERFÍCIES

```
SUB surface (nspec, npoint, ho, vo, vsize, inx, iny, stepx, scr$, y())
' Este é o subprograma principal para o desenho das superfícies
' Requer os seguintes subprogramas auxiliares: axisx, axisy, axisz,
' errorhandle, hide, maxmin, regression, transf
' Os parametros são os seguintes:
' nspec : número de espectros
' npoint : número de pontos por espectro
' ho : posição horizontal inicial em pixels
' vo : posição vertical inicial em pixels
' vsize : altura máxima em pixels dos espectros
' inx : incremento horizontal entre espectros
' iny : incremento vertical entre espectros
' stepx : incremento horizontal em pixels dos pontos em cada espectro
' scr$ : tipo de monitor (cga, ega, vga)
' y : matriz contendo os dados
```

```
    DIM contour(640), lastcontour(640)
    DIM j AS INTEGER, i AS INTEGER, k AS INTEGER
    SELECT CASE LCASE$(scr$)
        CASE IS = "cga"
            scr = 199
        CASE IS = "ega"
            scr = 349
        CASE IS = "vga"
            scr = 479
    END SELECT
    IF ho < 0 OR ho > 639 THEN
        CALL errorhandle(1)
        EXIT SUB
    END IF
    IF vo < 0 OR vo > scr THEN
        CALL errorhandle(2)
        EXIT SUB
    END IF
    IF vsize > vo THEN
        CALL errorhandle(3)
        EXIT SUB
    END IF
    IF stepx > FIX((639 - ho - stepx) / (npoint - 1)) THEN
```

```

    CALL errorhandle(4)
    EXIT SUB
END IF
IF inx > FIX((ho + stepx) / (nspec - 1)) THEN
    CALL errorhandle(5)
    EXIT SUB
END IF
IF iny > FIX((vo - (vo - vsize)) / (nspec - 1)) THEN
    CALL errorhandle(6)
    EXIT SUB
END IF
CALL maxmin(nspec, npoint, y(), ymin, ymax)
FOR i = 1 TO 640
    contour(i) = vo
NEXT i
FOR j = 1 TO nspec
    FOR i = 1 TO npoint - 1
        x1 = ho + (i * stepx)
        x2 = x1 + stepx
        CALL transf(vo, vsize, ymin, ymax, y(j, i), y1)
        CALL transf(vo, vsize, ymin, ymax, y(j, i + 1), y2)
        x1 = x1 - (inx * (j - 1))
        x2 = x2 - (inx * (j - 1))
        y1 = y1 - (iny * (j - 1))
        y2 = y2 - (iny * (j - 1))
        CALL hide(x1, x2, y1, y2, scr$, contour())
    NEXT i
    IF j > 1 THEN
        FOR i = 1 TO npoint
            rx1 = ho + (i * stepx) - (inx * (j - 2))
            rx2 = ho + (i * stepx) - (inx * (j - 1))
            IF rx1 > 1 OR rx1 < 639 OR rx2 > 1 OR rx2 < 639 THEN
                LINE (rx1, lastcontour(rx1))-(rx2, contour(rx2))
            END IF
        NEXT i
    END IF
    FOR k = 1 TO 640
        lastcontour(k) = contour(k)
    NEXT k
NEXT j
CALL axisx(ho, vo, npoint, stepx, 10)           ' eixo x
CALL axisy(ho, vo, stepx, nspec, inx, iny, 10)   ' eixo y
CALL axisz(ho, vo, vsize, stepx, nspec, inx, iny, 10) ' eixo z
END SUB

SUB axisx (ho, vo, npoint, stepx, tickcsx)
' Eixo x
' tickcsx : número de marcadores no eixo
    LINE (ho + stepx, vo)-(ho + stepx + ((npoint - 1) * stepx), vo)
    LINE (ho + stepx, vo)-(ho + stepx, vo + 8)
    LINE (ho + stepx + ((npoint - 1) * stepx), vo)-(ho + stepx + ((npoint - 1)
* stepx), vo + 8)
    IF tickcsx <> 0 THEN
        piece = ((npoint - 1) * stepx) / tickcsx
    ELSE

```

```

        piece = ((npoint - 1) * stepx)
    END IF
    FOR j = ho + stepx TO ho + stepx + ((npoint - 1) * stepx) STEP piece
        LINE (j, vo)-(j, vo + 4)
    NEXT j
END SUB

SUB axisy (ho, vo, stepx, nspec, inx, iny, ticksy)
' Eixo y
' número de marcaadores no eixo
    LINE (ho + stepx, vo)-(ho + stepx - ((nspec - 1) * inx), vo - ((nspec - 1)
* iny))
    LINE (ho + stepx, vo)-(ho + stepx - 10, vo)
    LINE (ho + stepx - ((nspec - 1) * inx), vo - ((nspec - 1) * iny))-(ho +
stepx - ((nspec - 1) * inx) - 8, vo - ((nspec - 1) * iny))
    IF ticksy <> 0 THEN
        piece = nspec / ticksy
    ELSE
        piece = nspec
    END IF
    FOR j = 0 TO (nspec - 1) STEP piece
        LINE (ho + stepx - (j * inx), vo - (j * iny))-(ho + stepx - (j * inx)
- 5, vo - (j * iny))
    NEXT j
END SUB

SUB axisz (ho, vo, vsize, stepx, nspec, inx, iny, ticksz)
' Eixo z
' número de marcadores no eixo
    LINE (ho + stepx - ((nspec - 1) * inx), vo - ((nspec - 1) * iny))-(ho +
stepx - ((nspec - 1) * inx), vo - ((nspec - 1) * iny) - (vo - vsize))
    LINE (ho + stepx - ((nspec - 1) * inx), vo - ((nspec - 1) * iny))-(ho +
stepx - ((nspec - 1) * inx) - 8, vo - ((nspec - 1) * iny))
    LINE (ho + stepx - ((nspec - 1) * inx), vo - ((nspec - 1) * iny) - (vo -
vsize))-(ho + stepx - ((nspec - 1) * inx) - 8, vo - ((nspec - 1) * iny) - (vo
- vsize))
    IF ticksz <> 0 THEN
        piece = (vo - vsize) / ticksz
    ELSE
        piece = (vo - vsize)
    END IF
    FOR j = vo - ((nspec - 1) * iny) TO vo - ((nspec - 1) * iny) - (vo -
vsize) STEP -piece
        LINE (ho + stepx - ((nspec - 1) * inx), j)-(ho + stepx - ((nspec - 1)
* inx) - 4, j)
    NEXT j
END SUB

SUB errorhandle (flag)
' Erros nos parâmetros
    SELECT CASE flag
        CASE 1
            mens$ = "ho é negativo ou maior que 639"
        CASE 2
            mens$ = "vo é negativo ou muito grande"

```



```

CASE 3
    mens$ = "vsize é muito grande"
CASE 4
    mens$ = "stepx é muito grande"
CASE 5
    mens$ = "inx é muito grande"
CASE 6
    mens$ = "iny é muito grande"
END SELECT
PRINT "> "; mens$
END SUB

SUB hide (x1, x2, y1, y2, scr$, contour())
' Faz o desenho das linhas e verifica se aparecem ou não
SELECT CASE LCASE$(scr$)
CASE IS = "cga"
    scr = 199
CASE IS = "ega"
    scr = 349
CASE IS = "vga"
    scr = 479
END SELECT
IF x1 < 1 OR x1 > 639 OR x2 < 1 OR x2 > 639 THEN EXIT SUB
IF y1 < 1 OR y1 > scr OR y2 < 1 OR y2 > scr THEN EXIT SUB
IF x1 = x2 THEN
    FOR i = y1 TO y2
        x = x1
        y = i
        IF y < contour(x) THEN
            PSET (x, y)
            contour(x) = CINT(i)
        END IF
    NEXT i
    EXIT SUB
END IF
CALL regression(x1, x2, y1, y2, a, b)
IF ABS(x1 - x2) >= ABS(y1 - y2) THEN
    FOR i = x1 TO x2
        x = i
        y = a * i + b
        IF y < contour(i) THEN
            PSET (x, y)
            contour(i) = CINT(y)
        END IF
    NEXT i
    EXIT SUB
END IF
IF y1 > y2 THEN
    FOR i = y1 TO y2 STEP -1
        x = ((i - b) / a)
        y = i
        IF y < contour(x) THEN
            PSET (x, y)
            contour(x) = CINT(y)
        END IF
    NEXT i
END IF

```

```

FOR j = 1 TO nvx
  tquad = 0
  FOR i = 1 TO no
    p(j, in) = p(j, in) + t(i, in) * x(j, i)
    tquad = tquad + t(i, in) * t(i, in)
  NEXT i
  p(j, in) = p(j, in) / tquad
  pn = pn + p(j, in) * p(j, in)
NEXT j
pn = SQR(pn)
FOR j = 1 TO nvx
  p(j, in) = p(j, in) / pn
NEXT j
FOR i = 1 TO no
  t(i, in) = t(i, in) * pn
NEXT i
FOR j = 1 TO nvx
  w(j, in) = w(j, in) * pn
NEXT j
b(in) = 0 : ttquad = 0
FOR i = 1 TO no
  b(in) = b(in) + (u(i, in) * t(i, in))
  ttquad = ttquad + t(i, in) * t(i, in)
NEXT i
b(in) = b(in) / ttquad
FOR j = 1 TO nvx
  FOR i = 1 TO no
    x(j, i) = x(j, i) - (t(i, in) * p(j, in))
  NEXT i
NEXT j
FOR j = 1 TO nvx
  FOR i = 1 TO no
    y(j, i) = y(j, i) - ((b(in) * t(i, in)) * q(j, in))
  NEXT i
NEXT j
NEXT in
END SUB

```

```
        NEXT i
    END IF
    IF y2 > y1 THEN
        FOR i = y2 TO y1 STEP -1
            x = ((i - b) / a)
            y = i
            IF y < contour(x) THEN
                PSET (x, y)
                contour(x) = CINT(y)
            END IF
        NEXT i
    END IF
END SUB

SUB maxmin (n1, nc, y(), ymin, ymax)
' Encontra os valores máximo e mínimo
ymin = y(1, 1)
ymax = y(1, 1)
FOR i = 1 TO n1
    FOR j = 1 TO nc
        IF y(i, j) > ymax THEN ymax = y(i, j)
        IF y(i, j) < ymin THEN ymin = y(i, j)
    NEXT j
NEXT i
END SUB

SUB regression (x1, x2, y1, y2, a, b)
' Encontra a equação de uma reta entre dois pontos
' a : coeficiente angular
' b : coeficiente linear
a = (y2 - y1) / (x2 - x1)
b = y1 - (a * x1)
END SUB

SUB transf (vo, vsize, ymn, ymax, yo, yi)
' Transforma os pontos em coordenadas de pixels
yi = vo - ((yo - ymn) * (vo - vsize)) / (ymax - ymn)
END SUB
```